

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий»

На правах рукописи

Сенотрусова Софья Дмитриевна

**Математическое моделирование функционирования системы
биомаркеров дегенеративных заболеваний**

Специальность 05.13.18 —

«математическое моделирование, численные методы и комплексы программ»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель

доктор физико-математических наук

Воропаева Ольга Фалалеевна

Новосибирск – 2021

Оглавление

Введение.....	6
Глава 1. Численное моделирование динамики p53–белок-ингибитор–микроРНК (прямая положительная связь p53–микроРНК)	30
1.1. Математическая модель функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК	30
1.1.1. Математическая модель	31
1.1.2. Обезразмеривание.....	33
1.2. Алгоритмы решения прямых и обратных коэффициентных задач для функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием и их систем	34
1.2.1. Численный алгоритм решения основной начальной задачи (прямой задачи).....	35
1.2.2. Численный алгоритм решения обратной коэффициентной задачи	38
1.2.3 Программная реализация	41
1.3. Методические расчеты основной начальной задачи (прямой задачи)	42
1.3.1. Оценка работоспособности численных методов решения начальной задачи (прямой задачи).....	42
1.3.2. Зависимость решения от начальных данных и значений параметров запаздывания ..	48
1.3.3. Численный анализ динамики системы p53–Mdm2. Сопоставление с результатами расчетов [71, 77].....	50
1.4. Разработка упрощенной базовой модели функционирования системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК	51
1.4.1. Численное моделирование динамики системы p53–Mdm2 в раковых клетках под влиянием этопозида. Механизм «бимодального» переключения.....	52
1.4.2. Численный анализ состояний системы p53–Wip1 в раковых клетках при стрессовом воздействии, вызванном гамма-облучением	61
1.4.3. Численное моделирование динамики системы p53–Sirt1–miR-34a при фиброзе печени у крыс	63
1.4.4. Определение характерных состояний биологической системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК	65
1.4.5. Анализ чувствительности модели к изменению значений параметров	69
1.4.6. Численный анализ качественных свойств решений модели	70
1.4.7. p53-зависимые микроРНК как диагностические биомаркеры дегенеративных заболеваний. Численный анализ характерных патологических состояний	72
1.4.8. Численное моделирование функционирования микроРНК при искусственной активации p53 в терапевтических целях.....	75
Результаты главы 1	78

Глава 2. О связи решений дифференциальных уравнений с запаздыванием и систем ОДУ высокой размерности в моделях функционирования системы p53–ингибитор–микроРНК	81
2.1. Математическая модель динамики системы p53–ингибитор, основанная на уравнении с запаздыванием	83
2.2. Математическая модель динамики системы p53–ингибитор на основе системы ОДУ	84
2.2.1. Постановка задачи. Численные методы решения задачи Коши.....	84
2.3. Реализация вычислительной схемы анализа связи решений системы ОДУ и дифференциальных уравнений с запаздыванием.....	88
2.3.1. Иллюстрация сходимости компонент численных решений.....	88
2.3.2. Сходимость линий нейтральности	91
2.3.3. Численный анализ асимптотического поведения погрешности «предельного» перехода	92
2.3.4. Особенности численной реализации «предельного» перехода от системы ОДУ большой размерности к системе с запаздывающим аргументом. Уточнение схемы вычислительного эксперимента	94
2.3.5. Реализация «предельного» перехода в задаче о функционировании системы p53–Mdm2 в раковых клетках. Численное решение обратной коэффициентной задачи для модели в виде системы ОДУ	102
2.4. Связь решений системы ОДУ высокой размерности и системы уравнений с запаздывающими аргументами в моделях динамики системы p53–ингибитор–микроРНК	104
Результаты главы 2	110
Глава 3. Разработка базовой математической модели функционирования системы p53–белок–ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной обратной связью с p53	112
3.1. Минимальные математические модели функционирования системы p53–белок–ингибитор–микроРНК	112
3.1.1. Постановка задачи. Иерархия моделей 3.1–3.4.....	112
3.1.2. Определение характерных состояний биологической системы p53–микроРНК	116
3.1.3. Анализ чувствительности моделей 3.1–3.4 к изменению значений параметров.....	120
3.2. Численный анализ качественных свойств моделей 3.1–3.4	122
3.3. Сопоставление численных решений моделей 3.1–3.4 с экспериментальными данными. Базовая модель.....	126
3.4. Численный анализ некоторых противораковых стратегий с применением базовой модели. Синергический эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53–микроРНК	130
3.4.1. Воздействие на петлю отрицательной обратной связи p53–белок–ингибитор.....	130
3.4.2. Воздействие на микроРНК как звено петли положительной обратной связи	131

3.4.3. Воздействие на петлю положительной обратной связи p53–микроРНК	132
Результаты главы 3	134
Глава 4. Применение математических моделей для исследования механизмов функционирования, регуляторной функции и диагностического потенциала p53-зависимых микроРНК при дегенеративных заболеваниях.....	135
4.1. Базовая математическая модель	135
4.2. Математическое моделирование функционирования системы p53-Wip1-miR-16 в клетках остеосаркомы человека	137
4.2.1. Математическая модель динамики системы p53-Wip1-miR-16.....	138
4.2.2. Численный анализ функционирования системы p53-Wip1-miR-16. Сопоставление с экспериментальными данными [32].....	139
4.2.3. Численное исследование сверхэкспрессии микроРНК как способа подавления Wip1 в терапевтических целях. Синергический эффект сверхактивации пути p53 под контролем микроРНК	142
4.2.4. Математическая модель динамики системы p53-Wip1-miR-16-мРНК Wip1 (модель 4.1).....	144
4.3. Математическое моделирование функционирования p53-зависимых микроРНК miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215 в клетках множественной миеломы	145
4.3.1. Математическая модель (модель 4.2)	146
4.3.2. Результаты математического моделирования.....	147
4.4. Математическое моделирование ингибирования Sirt1 при оксидативном стрессе в эпителиальных клетках дыхательных путей при ХОБЛ	152
4.4.1. Математическая модель динамики системы p53–микроРНК под влиянием оксидативного стресса (модель 4.3).....	153
4.4.2. Результаты математического моделирования.....	153
4.5. Математическое моделирование дегенеративных процессов при фиброзе печени у крыс: численный анализ роли пути p53–miR-34a	156
4.6. Математическое моделирование активации пути p53, ассоциированной с ранними признаками болезни Альцгеймера при синдроме Дауна	159
4.6.1. Математическая модель динамики системы p53–Sirt1–miR–Вах под влиянием оксидативного стресса (модель 4.4).....	160
4.6.2. Результаты математического моделирования.....	161
4.7. Численный анализ надежности диагностики дегенеративных заболеваний на основе p53-зависимых микроРНК	166
4.7.1. Количественная оценка границ характерных состояний N , C и D системы p53–микроРНК.....	167
4.7.2. О диагностических свойствах микроРНК при нормальном функционировании системы p53–микроРНК.....	170

4.7.3. Математическое моделирование нарушения функционирования системы р53–микроРНК	171
4.7.4. Численный анализ диагностической надежности микроРНК при нарушении функционирования системы р53–микроРНК.....	173
Результаты главы 4	177
Основные результаты диссертации	179
Основные публикации по теме работы	180
Список литературы	185
Приложение. Свидетельство о государственной регистрации программы.....	206

Введение

К основным задачам современной биологии и теоретической медицины относится исследование молекулярно-генетических процессов, определяющих норму и патологические состояния живого организма. Конечной целью является разработка новых пациент-ориентированных методик диагностики, профилактики, лечения и реабилитации. Особое место в этих исследованиях занимают наиболее опасные заболевания, постоянно входящие в первую десятку причин смертности и инвалидизации человека – сердечно-сосудистые (гипертония, ишемическая болезнь и другие), неопластические (в частности, рак) и нейродегенеративные (болезнь Альцгеймера, Паркинсона и другие). Все они сопровождаются дисбалансом процессов размножения и гибели клеток, накоплением в клетках патологических изменений, при которых происходит непрерывное ухудшение структуры и функционирования тканей или органов [1] и, согласно принятой классификации, относятся к группе так называемых дегенеративных заболеваний.

В последнее десятилетие все большее внимание отводится исследованию биомаркеров дегенеративных заболеваний. Под биомаркерами понимают измеряемые количественно биологические параметры состояния организма, которые как индикаторы определяют норму и патологию и, следовательно, с их помощью можно прогнозировать появление заболевания на ранней стадии, еще до проявления его симптомов или вызванных им осложнений, или предсказывать характер, степень тяжести и исход заболевания [2, 3]. Биомаркеры сами служат в качестве возможных мишеней при разработке новых современных терапевтических стратегий и помогают оценить результат терапевтического воздействия.

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 [3]. Поэтому поиск современных общедоступных и эффективных способов обнаружения и терапии дегенеративных заболеваний с помощью биологических маркеров требует изучения и все более глубокого понимания клеточно-молекулярных механизмов функционирования белковых сетей.

Одними из наиболее перспективных биомаркеров дегенеративных заболеваний считаются белок p53 и ряд связанных с ним белков и микроРНК, поскольку белок p53 регулирует

транскрипцию многих генов, контролируя тем самым множество биологических процессов, включая репарацию ДНК, клеточный цикл, апоптоз, старение и метаболизм [4–7].

Белок p53 был открыт в 1979 году А. Левиным, Д. Лейном и У. Олдом и получил свое название по его молекулярной массе (53 килодальтона). За 40 лет ему посвящено, по меньшей мере, 40 тысяч научных работ, экспериментальные исследования проводятся в большинстве университетов и лабораторий мира, среди них Harvard Medical School и Systems Biology Harvard University (Cambridge, USA); Institute for Advanced Study, Princeton (New Jersey, USA); Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel); Ludwig Institute for Cancer Research Oxford Branch, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford (Oxford, UK); Laboratory of Transcriptional Networks, Center for Integrative Biology, CIBIO, University of Trento (Trento, Italy); Center for Quantitative Systems Biology and Department of Physics, Hong Kong Baptist University (Hong Kong, China); p53 Laboratory (A-Star) 8A Biomedical Grove Immunos (Singapore) и многие другие. Серьезный вклад в понимание различных аспектов функционирования p53 в норме и патологии вносят исследования, которые проводятся в подавляющем большинстве российских научно-исследовательских институтов, университетов, онкологических медицинских центров и лабораторий, среди них Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; МГУ им. М. В. Ломоносова; Институт экспериментальной медицины РАН; Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна; Московский физико-технический институт; Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН; Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина; Институт белка РАН; Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева; Казанский (Приволжский) федеральный университет; Новосибирский государственный университет; Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины; Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН; Институт проблем химической физики РАН (Черноголовка); Сколковский институт науки и технологий; Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» и многие другие.

Большой интерес исследователей к p53 обусловлен, в первую очередь, важной ролью этого белка в защите от рака [7, 8]. Согласно многочисленным исследованиям, функции белка p53 связаны с регуляцией таких процессов, как репарация ДНК, клеточное деление и клеточная смерть, координация метаболических процессов, взаимодействия между клетками. Белок p53 является ключевым элементом сигнального пути, образованного последовательностью белковых молекул, которые за счет биохимических реакций обеспечивают контроль и обмен

информационными сигналами о состоянии, условиях и процессах внутри клетки и между ними для координации биохимических процессов и поддержания нормального функционирования организма. Самым важным является то, что белок p53 не только получает сигналы об отклонении от оптимума в перечисленных процессах, но и обеспечивает адекватные ответы, предоставляющие скоординированную коррекцию этих процессов, дальнейшее поведение и судьбу клеток с повреждениями [6, 7].

Уровень p53 и его активность в нормальных клетках незначительны [9], однако под воздействием стрессов, приводящих к повреждениям ДНК, происходит активация p53, что сигнализирует о необходимости запуска подконтрольных ему генетических программ, обеспечивающих ликвидацию повреждения [10]. Как правило, в лабораторных исследованиях факторами стресса, инициирующими реакцию сигнального пути p53 на повреждение ДНК, являются ультрафиолетовое и другие варианты облучения клеток, а также варианты воздействия химическими препаратами, например, нутлином, этопозидом и др. (см., например, [11–13]). Поскольку практически любое воздействие, угрожающее целостности генома клетки, способно вызывать активность p53, Д. Лейном было сформулировано удачное символическое определение функции p53 как «стража генома» [14]. Задачей белка p53 является предотвратить размножение неполноценных клеток за счет остановки клеточного цикла на любом из его этапов до исправления дефекта или запуска программы самоуничтожения клетки (апоптоза) [15]. В первом случае в ответ на стрессовое воздействие наблюдаются периодические колебания уровня этого белка около значений, близких к нормальным, во втором случае происходит существенное увеличение уровня активности p53 [16–20].

В раковых клетках часто фиксируется нарушение функционирования p53, которое даже при достаточно сильных повреждениях ДНК не позволяет p53 активироваться и ликвидировать дефектную клетку [21]. С другой стороны, при сбое в функционировании p53 возможна сверхактивация данного белка, которая приводит к преждевременной смерти здоровых клеток в тканях и органах. Чрезмерно высокий уровень p53 отмечается при различных дегенеративных заболеваниях, таких как фиброз печени и легких, ишемические повреждения разных органов и большинство нейродегенеративных заболеваний [22–25].

Сигнальный путь p53 включает в себя сложнейшую сеть белков, кодирующих их генов, микроРНК и других регуляторов, характер связей, мишени и функции которых постоянно уточняются [26–28]. Функционирование белка p53 регулируется системой положительных и отрицательных прямых и обратных связей, все особенности которых еще до конца не изучены и находятся под пристальным вниманием исследователей [6, 7]. Известно [29–38], что ряд белков (например, Mdm2, Sirt1, Wip1, Pirh2, COP1, Ninj1, RNPC1) способны подавлять активность p53, в том числе через усиление его деградации, а p53 положительно регулирует эти белки, образуя

с ними петлю отрицательной обратной связи. Согласно подавляющему большинству работ, белки Mdm2, Sirt1 и Wip1 относят к одним из главных регуляторов (ингибиторов) p53 [7, 26, 27, 36, 37]. Среди наиболее важных белков-мишеней p53, активирующихся в ответ на активацию p53 (положительная прямая связь), выделяют белки p21 и Вах, которые участвуют в функционировании системы p53, а также обладают собственными функциями в регуляции клеточных процессов [12, 39].

Известно, что нарушения функций p53 и белков-ингибиторов могут быть обнаружены *in vitro* и *in vivo* инструментально и даже выражены количественно с некоторой доступной степенью точности, которая определяется применяемым методом детектирования. Исследования показывают, что в клетках большинства форм рака уровни белков-ингибиторов p53, функционирующих как онкогены, оказываются достаточно высокими, а уровни p53, наоборот, существенно ниже нормы [13, 32]. 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 [39–41]. Поэтому функционирование сигнального пути p53 интенсивно изучается в связи с поиском эффективных биомаркеров и терапевтических целей при дегенеративных заболеваниях. При этом все новые данные свидетельствуют о важной роли p53-зависимых микроРНК в этих регуляторных контурах.

МикроРНК (miR) – это новые претенденты на роль биомаркеров многих, в том числе дегенеративных заболеваний. МикроРНК представляют собой небольшие молекулы РНК, которые, не участвуя в синтезе белка, выполняют внутри клетки важнейшую функцию контроля экспрессии генов за счет связывания с соответствующими мРНК [42]. Особый интерес к микроРНК возник в связи с тем, что, как выяснилось, клетки и ткани обмениваются между собой сигналами не только на гормональном, но и на более тонком уровне – посредством визикул (Нобелевская премия 2013 г.), в которые заключена генетическая информация в форме микроРНК. В настоящее время обнаружено уже несколько тысяч микроРНК, которым отводится фундаментальная роль в обеспечении нормального функционирования организма человека и в развитии заболеваний [43–45].

Известно, что белок p53 взаимодействует с различными семействами микроРНК [42, 46–49]. Большой интерес вызывают микроРНК, связанные с p53 прямой положительной связью и способные воздействовать на ингибиторы p53, формируя таким образом с p53 петлю положительной обратной связи. Подобное взаимодействие показано для p53 и таких его мишеней, как let-7 [50], miR-15b [51], miR-16 [11, 52], miR-29 [53, 54], miR-34a [55–57], miR-143/145 [58], miR-192, -194 и -215 [12], miR-221 [48, 59] и других. Важно отметить, что некоторые из упомянутых микроРНК способны подавлять развитие опухолей как через p53-

зависимые, так и через p53-независимые механизмы (к ним относятся, в частности, let-7, miR-15b, miR-16, miR-29, miR-34a, miR-145, miR-192 и miR-215 [12, 53, 57]). Интерес к таким микроРНК, помимо прочего, связан с тем, что для систем с положительной обратной связью характерен особый режим функционирования, известный как синергия (сверхаддитивный эффект, когда результат действия двух и более элементов системы вместе превышает результат от их действия по отдельности). Известно, что синергический эффект в медицине обычно рассматривается как основной механизм лекарственной терапии. В случае p53 и его мишеней также есть сообщения экспериментаторов [40, 60–62] о подобном свойстве – оно приводит к запуску программы апоптоза или необратимому прекращению деления (старению) и может быть использовано для терапевтического воздействия на раковые клетки. Кроме того, микроРНК вызывают большой интерес у исследователей и занимают особое место среди биомаркеров, поскольку в отличие от белков более стабильны в биологических жидкостях, методы их измерения проще и менее дорогостоящи (см., например, [63]).

Следует отметить, что конкретные механизмы воздействия на сигнальный путь p53–микроРНК 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. Кроме того, экспериментальные данные часто представляются взаимоисключающими, что затрудняет понимание основных механизмов взаимодействия в этой системе. Поэтому требуется проведение все новых экспериментов, планирование которых может быть существенным образом упрощено предварительными оценками, основанными на результатах математического моделирования функционирования системы p53–микроРНК.

Для моделирования механизмов функционирования сигнального пути p53 применяются самые различные подходы [64–68]. В настоящей работе предпочтение отдается химико-кинетическому методу, с помощью которого, начиная с 2000-х годов, создано уже несколько десятков математических моделей, обладающих определенным прогностическим эффектом [69–130]. Общие подходы и методология моделирования трудноформализуемых задач биологии и медицины достаточно хорошо проработаны и накоплен большой объем теоретических результатов (см., например, работы [131–146] и библиографию к ним).

Для формализации знаний о моделируемых биохимических процессах используются, главным образом, известные биокинетические модели. Наибольшим доверием и популярностью пользуется кинетическая модель действующих масс, и вытекающие из нее кинетические модели Михаэлиса–Ментен и Хилла. Закон действующих масс (ЗДМ), как правило, описывает кинетику (т.е. изменение во времени концентрации веществ) простых химических реакций, а в случае сложных реакций он применяется избирательно. В

математической биологии его используют, преимущественно, для описания конститутивных процессов синтеза и распада веществ. Кинетические модели Михаэлиса–Ментен, Хилла и более современные обобщения модели Хилла отражают сложные процессы, наблюдаемые в ходе ферментативных реакций, в том числе с учетом аллостерических и кооперативных эффектов. Существенно менее часто используется биокинетическая модель Гольдбетера–Кошланда, классический вариант которой можно найти в пионерской работе [140]. Она предложена впервые для описания равновесной концентрации белка в двух – модифицированной и немодифицированной – формах. Предполагалось, что взаимопревращение между ними (например, между белком в фосфорилированной и дефосфорилированной формах) происходит за счет двух ферментов (молекул, ускоряющих химическую реакцию, но не расходующихся в ходе нее) с противоположным эффектом; скорость ферментативных реакций моделируется с использованием кинетики Михаэлиса–Ментен, а равновесное состояние предполагает, что скорости фосфорилирования и дефосфорилирования одинаковы [140]. В литературе модель Гольдбетера–Кошланда сравнивается по чувствительности с функциями Хилла с высоким показателем степени. В [80, 140] отмечается, что данная модель сходна с линейными и гиперболическими функциями по ряду свойств, которые имеют крайне важное значение с точки зрения управления взаимосвязью белок–ингибитор, в которой, согласно наблюдениям, отклик должен увеличиваться с увеличением мощности входного сигнала, причем небольшое усиление сигнала должно вызывать соответствующий воздействию ответ, а критически высокий уровень сигнала – угасание чувствительности как результат нарушения связи белок–ингибитор. Выбор биологической модели и степень ее детализации, а также выбор аппроксимаций для описания взаимодействий элементов системы позволяют разрабатывать разнообразные математические модели, каждая из которых обладает крайне высоким уровнем неопределенности и поэтому нуждается как в строгом теоретическом анализе качественных свойств решений, так и в надежной валидации.

За годы активных исследований, выполнявшихся во многих научных группах в ведущих лабораториях мира, было предложено значительное количество математических моделей динамики сигнального пути p53, которые представляли биологические модели разной степени сложности. К настоящему моменту при выборе биологической модели, подходящих аппроксимаций биологических связей и оценке адекватности моделей одним из главных критериев считается получение таких решений, которые на качественном уровне воспроизводят некоторые базовые механизмы функционирования сигнального пути p53, наблюдавшиеся в лабораторных исследованиях. В первую очередь, речь идет о выраженной временной задержке реакции регуляторов на изменение состояния p53, возникновении колебаний уровня белков p53, Mdm2 и других ингибиторов p53 в ответ на стрессовое воздействие. Важным свойством

для современных моделей является способность описать так называемый механизм «бимодального» переключения (bimodal switch, см., например, [13, 64, 68, 96, 148]) – кардинальную смену состояния системы в условиях сильного стрессового воздействия, которое приводит к выраженному росту уровня или активности p53.

Одной из первых работ по математическому моделированию, рассматривающей p53, по-видимому, является [69], опубликованная в 2000 г. Авторы [69] разработали математическую модель функционирования петли отрицательной обратной связи p53–Mdm2 для исследования механизма взаимодействия между этими белками. В рамках этой модели Mdm2 способствует подавлению генерации и стимулированию деградации p53, а активированный p53 регулирует Mdm2, усиливая транскрипцию гена *mdm2*. Для описания этих взаимодействий с использованием кинетики действующих масс и Хилла была разработана система ОДУ, включающая в себя 5 нелинейных уравнений. Возможность временной задержки между активацией p53 и p53-зависимой индукцией Mdm2 заложена в модель в виде гипотетического посредника, который связывает p53 и Mdm2. Эта задержка имеет важное значение для описания в рамках математической модели колебательного поведения системы p53–Mdm2, которое наблюдается в лабораторных экспериментах при воздействии стрессовыми факторами. Авторы в своей работе продемонстрировали описание отрицательной обратной связи в системе p53–Mdm2 в виде скоординированных затухающих колебаний компонент численных решений, отметив тем самым качественное согласие результатов численного анализа с некоторыми результатами лабораторных измерений уровней p53 и Mdm2.

В ряде работ [70–73] разработаны и исследованы минимальные (малоразмерные) математические модели системы p53–Mdm2, которые содержат системы дифференциальных уравнений с одним или несколькими параметрами запаздывания, а для аппроксимации взаимодействий используется кинетика действующих масс и Хилла [70, 72, 73], а также кинетическая модель типа Гольдбетера–Кошланда [71]. Следует отметить, что в данных работах на основе анализа фазовых портретов решений математических моделей сделан вывод о качественном согласии с экспериментальными данными, в которых наблюдаются затухающие или периодические колебания уровней p53 и Mdm2. Дополнительные серии численных экспериментов с привлечением модели [71] проведены в работах [73–79]. Отметим, что в работе [80] приведены результаты исследования математической модели динамики белковых сетей, которая содержит кинетическую модель типа Гольдбетера–Кошланда, а авторы [81] используют данную кинетическую модель в одном из 22 дифференциальных уравнений своей модели для описания функционирования системы белка p53.

Интересная работа представлена группой авторов в [17]. Ими было разработано несколько малоразмерных математических моделей, описывающих функционирование петель обратной

связи p53–Mdm2, и предприняты попытки количественного сопоставления численных решений с экспериментальными измерениями [17]. При построении этих математических моделей использовались кинетические модели действующих масс и Хилла, кроме того, некоторые из предложенных моделей включают в себя уравнения с запаздыванием. По результатам численного анализа решений в [17] был сделан вывод о том, что источником изменчивости амплитуды и периода колебаний уровня p53 в клетках при сходных условиях может служить низкочастотный шум в скорости производства белка, а не шум в других параметрах, таких как скорость деградации. В [147] одна из минимальных моделей [17] используется для изучения базовых механизмов, влияющих на колебания уровня p53 при стрессовом воздействии. Опираясь на результаты численного и лабораторного анализа, авторы сформулировали следующий вывод: период колебания p53 в клетках мышей меньше, чем в клетках человека из-за более сильной транскрипции Mdm2 и более быстрой деградации p53 [147].

Новые математические модели и результаты моделирования динамики p53 в одной (индивидуальной) клетке под влиянием Mdm2 и белка ATM приведены в работах [74, 82, 83]. В [82] представлена модель, разработанная на основе модели [72], в которой помимо положительного воздействия ATM на p53 и петли отрицательной обратной связи p53–Mdm2 учитывается влияние мРНК Mdm2. В продолжение данной работы в [83] модель из [82] расширяется до 8 дифференциальных уравнений и дополняется стохастическими эффектами. В стохастической (основанной на применении метода Монте-Карло) математической модели [74] динамики системы белков p53–Mdm2 получено, что периодические колебания устойчивы к собственному шуму компонентов белков и внешнему шуму, связанному с сигналами повреждения. В [84] выполнен глубокий теоретический анализ модели из работы [74]. Интересные примеры стохастических моделей динамики сигнального пути p53 в отдельных клетках, которые качественно согласуются с экспериментальными данными о периодическом колебании уровня p53 при повреждении ДНК, приведены также в работах [85–87].

Одна из популярных моделей [85] представляет собой систему ОДУ, включающую в себя кинетические модели ЗДМ, Хилла и Михаэлиса–Ментен. В рамках представленной в [85] математической модели описывается функционирование белков p53 и Mdm2 в ядре и цитоплазме клетки, и учитывается комбинация петли отрицательной обратной связи p53–Mdm2, а также петли положительной обратной связи. Последняя возникает из двух противоположных негативных эффектов: Mdm2 в ядре индуцирует деградацию p53, в то время как p53 ингибирует внутриядерный Mdm2, через подавление фосфорилирования Mdm2 в цитоплазме. Выполненный в [85] теоретический анализ качественных свойств решений показал, что решения модели [85] согласуются с наблюдаемым в лабораторных экспериментах

[16] увеличением частоты периодических колебаний уровня p53 при увеличении уровня облучения (повреждения ДНК).

В целом ряде работ рассматриваются существенно более подробные биологические идеализации состава и структуры сигнального пути p53. Речь идет, в первую очередь, о работах (см., например, [81, 88–90]), где представлены математические модели, включающие в себя системы дифференциальных уравнений, которые описывают функционирование не только петли отрицательной обратной связи p53–Mdm2, но и учитывают влияние ATM, взаимодействия Wip1, p21 и ряда других белков и мРНК. Так, в работе [88] разработана математическая модель из 12 нелинейных уравнений с запаздыванием для описания базальной (т.е. в случае нормального функционирования) динамики p53. Адекватность модели доказывает качественное согласие с лабораторными данными: при базальном функционировании возможны спонтанные импульсы p53, недостаточные для индукции p21, а вот обширные повреждения ДНК генерируют импульсы p53, которые индуцируют высокий уровень p21. Важной особенностью данной модели является ее способность описывать не только состояния системы p53 при нарушении функционирования, но и состояние нормы, и, следовательно, гипотетически модель может претендовать на роль инструмента для оценки терапевтических стратегий, связанных с воздействием на систему p53 при условии ее более детальной проверки (валидации).

С этой же целью в работе [91] исследуется модификация модели [88], которую авторы расширили до 20 уравнений, описывающих новые взаимодействия. Показано, что модель может воспроизводить серию повторяющихся импульсов в стрессовых условиях, которые авторы связывают с соответствующей индукцией остановки клеточного цикла, и один или два спонтанных импульса (базальная динамика) в случае отсутствия стресса – оба режима достаточно часто наблюдаются в лабораторных экспериментах и рассматриваются как одно из базовых свойств системы p53 («бимодальное» переключение).

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 достаточно полной модели может послужить, в частности, система уравнений из работы [92] (она описывает динамику 32 компонент сигнального пути p53 и имеет 115 кинетических параметров), в рамках которой сделана интересная попытка моделирования функции p53 как регулятора апоптоза и клеточного цикла. Другим интересным примером математической модели p53-сети является модель, сформулированная с учетом отрицательной обратной связи и запаздывания транскрипции в работе [93], в рамках которой исследуется роль пространственных закономерностей в определении динамики сигнального пути p53,

характеризующегося способностью демонстрировать колебательное поведение. Основываясь на теоретическом анализе качественных свойств решений, авторы [93] утверждают, что в рамках их математической модели уровень плотности белка p53 может зависеть от формы клетки, положения ядра и скорости диффузии белка, и кроме того, уровень повреждения ДНК, вызывающий устойчивые колебания, зависит от размера и формы клетки.

В работе [94] представлена математическая модель, включающая в себя систему дифференциальных уравнений в частных производных, которая описывает динамику системы p53–Mdm2–ATM–Wip1 в двух взаимосвязанных компартментах – в ядре и цитоплазме клетки. В [94] показано, что решения разработанной модели качественно согласуются с наблюдаемыми в лабораторных экспериментах колебаниями p53 при различных уровнях стрессового воздействия. В результате проведенных исследований математической модели авторы [94] делают вывод о том, что структурные изменения в клетках могут быть еще одним потенциальным источником изменчивости p53 в отдельных клетках.

В работе [95] предложена модель, описывающая совместное функционирование двух петель отрицательной обратной связи p53–Mdm2 и p53–Wip1. Данная модель использовалась, в первую очередь, как инструмент для описания сложной динамики уровней белков, наблюдаемой в серии лабораторных экспериментов, выполненных ее авторами. Поэтому в уравнения модели дополнительно включены слагаемые, позволяющие рассматривать воздействие нутлина – вещества, используемого для ингибирования взаимодействия p53 и Mdm2 в терапевтических целях. В уравнения данной модели входит два параметра запаздывания, а для аппроксимации взаимодействий использовалась, как и в большинстве существующих моделей, кинетика действующих масс и Хилла. Это одна из немногих моделей, которую авторы применили к описанию наблюдаемой в лабораторном эксперименте динамики уровня p53 в раковой клетке в условиях стресса (под воздействием облучения и нутлина) и представили количественные доказательства адекватности модели.

Другим примером одновременного моделирования двух петель отрицательной обратной связи p53–Mdm2 и p53–Wip1–ATM является система из 10 уравнений динамики ключевых белков сети p53 с учетом 28 биохимических реакций [96], которые считаются наиболее важными (в рамках принятой биологической модели) в механизме, обеспечивающем ответ сигнального пути p53 на стресс. Уровень этопозида рассматривается как входной параметр, инициирующий стресс (повреждение ДНК), и предполагается, что этопозид как источник стресса может активировать белок ATM. В результате моделирования получено качественное согласие с известными экспериментальными наблюдениями изменения уровня белка p53 при достаточно низкой и высокой дозе этопозида.

Попытка сопоставления моделей [95–97] и их модификаций на основе количественных сопоставлений с экспериментальными измерениями предпринималась в работах [98–100]. Для оценки адекватности математических моделей численные решения сопоставлялись с экспериментальными данными, описывающими не только характерные состояния системы p53–Wip1, но и их динамику. Было показано, что модели [95, 97] имеют недостаточно широкую область применимости из-за несовершенства в описании отрицательной обратной связи p53–ингибитор, и поэтому не могут быть использованы в качестве инструмента для диагностики критических состояний p53 и его ингибиторов. В то же время, указанным свойством обладают модель [96] и модификация модели [95]. Показано дополнительно, что решения модели [95] и ее модификации в биологически значимом диапазоне параметров обладают весьма интересными качественными свойствами, которые гипотетически могут оцениваться как весьма сложная реакция сигнального пути p53 на сильное стрессовое воздействие, приводящее к повреждению ДНК. В [98–100] особое внимание уделено валидации рассматриваемых моделей, которая базируется на описании широкого набора экспериментальных данных.

До сих пор речь шла о моделях, в которых решалась важная задача – изучение (с разной степенью детализации и, главным образом, посредством теоретического анализа качественных свойств решений) особенностей функционирования ключевого сегмента сигнального пути p53 в норме и при стрессовом воздействии. Однако в целом ряде работ рассматривалась существенно более широкая задача – построение моделей для исследования механизмов запуска генетических программ, находящихся под контролем p53. Так, в работах [81, 101–105] методами математического моделирования исследуются механизмы запуска апоптоза и остановки клеточного цикла. Интересные примеры моделей, в которые уже упомянутые выше модели входят как отдельный блок, представлены в работе [97]. Модель [97] разделена на два блока. Исходя из принятой биологической модели, в первом блоке моделируется функционирование петли отрицательной обратной связи p53–Mdm2, а во втором описывается система белков-мишеней, которые (в рамках принятых моделей) запускают механизм принятия решения о судьбе клетки. В этой работе рассматривались несколько вариантов моделей первого блока, из которых предпочтение отдается модели [85]. В работе [101] для изучения p53-индуцированной клеточной реакции на повреждение ДНК приведена и численно исследована математическая модель, в которую входит система из 38 обыкновенных дифференциальных уравнения. По-видимому, одна из самых сложных математических моделей, описывающих достаточно полно механизмы принятия решений о судьбе клеток, представлена в работе [106]. Модель основана на подходе, предложенном в [107, 108], имеет модульную структуру, где один из модулей представляет проапоптотный сигнальный путь p53. Наряду с разработкой наиболее полной модели, в [106] поставлена и успешно решена задача ее редуцирования. Полученная в

результате редукции более лаконичная модель согласуется с известными экспериментальными данными по 11 (из более чем 80) компонентам вектора решений.

Следует отметить, что ответом на повышенный интерес экспериментаторов стала разработка моделей, в которых в той или иной степени учитываются и микроРНК. В первую очередь, сюда следует отнести попытки с формальной точки зрения описать сложнейшие процессы, лежащие в основе регуляторной функции микроРНК, на геномном уровне. Соответствующие математические модели общего вида (т.е. не относящиеся к конкретным микроРНК или белкам) представлены, например, в работах [109–115]. В данных работах мотивация и уровень рассмотрения биологической системы обусловлены, как правило, необходимостью разработки комплексных моделей регуляции генов как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях. Так, в [109] приведена простая модель посттранскрипционной регуляции генов с помощью микроРНК, в рамках которой связывание микроРНК с мРНК приводит к накоплению мРНК в ее обработанном состоянии. В [110] предложены две математические модели, состоящие из систем обыкновенных дифференциальных уравнений, для исследования механизмов, задействованных в подавлении трансляции белка за счет микроРНК. Дальнейшее исследование данных моделей представлено в [111]. А в работе [114] для той же цели, что и в [110], разработана более полная математическая модель, учитывающая девять известных механизмов воздействия микроРНК на трансляцию белка. Заметим, что такие модели остаются за рамками данного обзора, поскольку основное внимание будет сосредоточено на моделях, предназначенных для описания взаимодействий типа белок–микроРНК на более высоких уровнях организации системы, которые рассматриваются в биомедицинских исследованиях, связанных с биомаркерами дегенеративных заболеваний.

Анализ математических моделей взаимодействия белка с некодирующими РНК (нкРНК), к которым относятся и микроРНК, приведен в цикле работ [112, 113, 115]. В [113] в рамках проводимого анализа минимальных математических моделей рассматриваются два основных механизма взаимодействия нкРНК–белок. Первый основан на предположении, что скорости синтеза мРНК и нкРНК не зависят от концентрации нкРНК–белкового комплекса, который, однако, может прикрепляться к ДНК и регулировать одну из этих скоростей. В рамках второго механизма скорость синтеза нкРНК (микроРНК) считалась напрямую зависящей от уровня нкРНК–белкового комплекса. В [113] отмечается, что вероятные проявления этих двух механизмов обратных связей схожи, потому что скорость синтеза белка пропорциональна скорости синтеза мРНК. Данный факт существенно упрощает математические модели, поскольку достаточно тщательно изучить свойства только одного из них (белка или его мРНК). В результате исследования представленных моделей в [113] классифицированы основные

сценарии кинетики экспрессии генов, включая гены микроРНК. В [115] в рамках трех достаточно общих минимальных математических моделей показано, как эти модели могут быть использованы для анализа последствий доставки (в терапевтических целях) внутриклеточной нкРНК, ее влияние на экспрессию генов в клетке. Отметим ценность такого рода моделей общего вида и выполненных в [112, 113, 115] исследований, которые создают основу для принятия некоторых решений в ходе построения математических моделей функционирования систем типа белок–микроРНК на клеточно-молекулярном или даже органном уровнях в разного рода патологических процессах.

Группой авторов представлен цикл работ [116–123], в которых с использованием системно-биологического подхода определяется структура математических моделей для изучения механизмов, регулирующих генные сети с участием микроРНК. В частности, в работах [117, 121] приведена математическая модель динамики системы типа мРНК–белок–микроРНК в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений, основанной на кинетической модели действующих масс. Разработанная модель состоит из 32 уравнений и 64 параметров и применяется авторами для исследования механизмов совместного подавления белка p21 несколькими микроРНК. Результаты моделирования качественно согласуются с экспериментальными измерениями уровня p21 при эндогенной экспрессии miR-572 и miR-93, сверхэкспрессии только одного из этих микроРНК, а также при их одновременной сверхэкспрессии. В [117, 121] получено, что модель описывает существенное снижение p21 при совместной сверхэкспрессии miR-572 и miR-93. Авторы указывают на то, что полученные результаты не только иллюстрируют адекватность разработанного подхода к моделированию, но и демонстрируют способность модели определять кооперативные пары микроРНК для p21. Минимальная математическая модель функционирования системы общего вида белок–мРНК–микроРНК, основанная на дифференциальных уравнениях с запаздыванием и кинетической модели Хилла, предложена в работе [119]. Бифуркационный анализ и исследование роли параметров запаздывания в стабильности рассматриваемой системы показало, что амплитуда колебаний микроРНК существенно зависит от значений параметров запаздывания. В [118, 122] с использованием кинетических моделей действующих масс и Хилла и дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами разработаны математические модели для исследования механизмов регуляции miR-34a в сегменте сигнального пути, включающего в себя белки p53 (активная и неактивная формы), Mdm2, Sirt1 и DBC1. В работе [118] приведены данные о количественном согласии решений моделей с экспериментальными измерениями уровней p53, Sirt1 и miR-34a. В рамках разработанных моделей авторами [118] получено, что белок DBC1 и miR-34a играют роль положительных регуляторов активного p53 благодаря способности каждого из них ингибировать Sirt1. В продолжение данных работ в [123] для

минимальной модели, представленной в [118, 122], анализируется гипотеза о биологическом смысле коэффициента Хилла в рассматриваемой модели и его влиянии на динамику взаимодействия p53–miR-34a, при этом сопоставление численных решений с экспериментальными данными не проводилось.

В работе [124] представлена модификация модели [83] для описания динамики системы p53–Mdm2–микроРНК с учетом способности микроРНК прямо и/или косвенно регулировать биохимический процесс апоптоза, индуцированного p53. Авторы используют принципы теории управления для формирования критериев контроля обратной связи для достижения желаемого состояния p53.

В [125] предложена математическая модель сигнального пути p53 с тремя микроРНК-опосредованными петлями положительной обратной связи с участием miR-192, miR-34a и miR-29a. Разработанная модель представляет собой систему из 22 обыкновенных дифференциальных уравнений, полученных при использовании кинетических моделей действующих масс, Хилла и Михаэлиса–Ментен. Основное внимание уделено анализу функциональной роли микроРНК, которая, предположительно, состоит в том, что микроРНК придают устойчивость определенным биологическим процессам. Более конкретно, в этой работе приведены результаты математического моделирования и лабораторных исследований роли петель положительной обратной связи p53–Mdm2–микроРНК в регуляции функционирования p53 при стрессовом воздействии. В рамках представленной математической модели получено, в частности, что при подавлении Mdm2 за счет микроРНК возможно затухание периодических колебаний уровня белка p53. Важное место отводится следующему обстоятельству: в математической модели miR-192 напрямую регулирует Mdm2, в то время как miR-34a и miR-29a регулируют еще и некоторые промежуточные узлы, так что образуемые этими микроРНК петли обратной связи оказались длиннее, чем петля p53–miR-192. На основе бифуркационного анализа делается вывод: среди трех групп микроРНК – miR-192, miR-34a и miR-29a, образующих петли положительной обратной связи с p53, miR-192 и связанная с ним петля обратной связи, вероятно, оказывают наибольшее влияние на поддержание устойчивости колебаний p53 в ответ на повреждение ДНК. Эти и некоторые другие выводы на качественном уровне подтверждаются результатами лабораторных исследований, представленных этими авторами в [125].

Сложная биокинетическая стохастическая модель определения клеточной судьбы после индукции повреждения ДНК, учитывающая множество участников сигнального пути p53, включая miR-16, представлена в работе [126]. Следует отметить, что основное внимание в данной работе направлено на исследование роли белка Wip1 в определении судьбы клетки, а не на изучение микроРНК. Показано, что предложенная модель на качественном уровне

описывает ряд известных из лабораторных наблюдений свойств биологической системы. В частности, показано, что Wip1, играя роль регулятора апоптоза, влияет на поведение клеток, способствующее выживанию – уровень Wip1 увеличивается, чтобы блокировать решение об апоптозе в случае восстановления ДНК. Что касается роли miR-16 в регуляции Wip1, то в работе прямо указывается: введение в модель miR-16, в значительной мере, обеспечило согласие с экспериментальными данными по динамике численности выживших и апоптозных клеток, которое следует рассматривать как прямое свидетельство состоятельности модели.

В [127] приведены результаты математического моделирования функционирования сигнального пути p53 в ответ на повреждение ДНК, полученные с использованием подхода [97], причем развитие указанного подхода связано именно с введением в модель микроРНК. Работа посвящена изучению регуляции клеточного ответа с участием двух факторов транскрипции p53 и E2F1 и двух микроРНК miR-34 и miR-449. Модель основана на представлении основных биохимических реакций законом действующих масс и моделью Хилла. Как и в большинстве перечисленных здесь моделей, параметры были выбраны, по возможности, на основе анализа литературных источников и с учетом биохимических и математических ограничений, обеспечивающих согласие с известным динамическим поведением этой сети. Теоретические результаты, полученные в результате однопараметрического бифуркационного анализа, показывают согласие с существующими биологическими фактами и численными решениями модели. В рамках принятой модели удалось продемонстрировать различия в решении судьбы клеток, которые возникают при изменении уровня воздействия miR-449 на Sirt1. Интересно, что в работе [128] предложена биоинформационная логическая модель, с использованием которой проведен анализ регуляторных функций miR-449a в процессах, определяющих судьбу клетки с повреждениями ДНК. В модели предполагается, что в ответ на повреждение, вызванное ионизирующим излучением, начинают действовать одновременно два механизма – активация p53 и активация miR-449a. При этом, в согласии с экспериментальными исследованиями, оба эти механизма связаны с Sirt1: функционирование Sirt1 регулируется miR-449a, и это может опосредовано изменить динамику p53. Авторы отмечают согласованность результатов моделирования с экспериментальными измерениями miR-449a в клетках в ответ на ионизирующее излучение. С использованием разработанной модели в [128] показано, что miR-449a активирует несколько петель обратной связи, которые создают колебания и бистабильность в рассматриваемой системе.

В [129] с использованием разработанной математической модели, включающей в себя систему ОДУ, исследуется регуляторная сеть трансляции, которая контролирует экспрессию p53 в ответ на повреждения ДНК. Решения модели функционирования петли обратной связи

p53–Mdm2 (без учета других связей) количественно согласуются с экспериментальными измерениями уровня p53 при воздействии УФ-облучением. Однако, как отмечают авторы [129], эта схема обратной связи учитывает только стабилизацию p53 и не учитывает изменения в синтезе белка p53 в ответ на повреждение ДНК. Поэтому в рамках математической модели было дополнительно учтено влияние белка Nur, который активирует трансляцию мРНК p53 после УФ-облучения в клетках карциномы молочной железы, и miR-125b, который является негативным регулятором синтеза белка p53. Таким образом, в рамках данной работы построена модель, описывающая функционирование системы, в которой p53 (в отличие от предыдущих исследований) является мишенью микроРНК miR-125b и Nur (при этом система p53–Mdm2 пассивна по отношению к miR-125b–Nur). Особенностью модели является также то, что для описания динамики микроРНК привлекается аналитически заданная функция, зависящая только от времени и аппроксимирующая экспериментальный временной ряд данных. Достоинством данной работы является то, что в ней предпринята попытка количественного сопоставления численных решений с экспериментальными измерениями уровня p53 и Nur. Так, проведенный в рамках принятой математической модели анализ результатов численных экспериментов показал, что для согласования с лабораторными данными динамики белков p53 и Nur при воздействии УФ-облучением необходимо учитывать не только воздействие miR-125b, но и некоторый отрицательный регулятор Nur. Интересно, что на эту роль, согласно экспериментальным данным, может претендовать E3 убиквитинлигаза TRIM21.

Роль петли положительной обратной связи p53–miR-34a в регуляции сигнального пути p53 при повреждении ДНК средствами математического моделирования изучается в работе [130]. С использованием модели динамики p53–Mdm2 [83], кинетических моделей действующих масс, Михаэлиса–Ментен и Хилла разработана и исследована математическая модель, состоящая из системы семи дифференциальных уравнений с запаздыванием, описывающих функционирование системы белков p53 (инактивированная и активная формы), Sirt1 и Mdm2, miR-34a, мРНК sirt1 и комплекса sirt1–miR-34a. Предполагается, что miR-34a оказывает влияние на p53, действуя через мРНК sirt1. Выполнен большой объем исследований качественных свойств решений. В рамках разработанной математической модели получено, что петля положительной обратной связи, опосредованная miR-34a, может контролировать вызванные стрессом колебания уровня активной формы p53. Кроме того, результаты моделирования указывают на то, что определенное количество miR-34a может индуцировать более высокую экспрессию p53.

Подводя итог, отметим следующее. За последние четыре десятилетия изучению разных аспектов функционирования p53 посвящены десятки тысяч научных работ; исследования проводятся в большинстве университетов, лабораторий, клиник и медицинских центров России

и мира. Это приводит к исключительно высоким темпам накопления экспериментальной информации, требующей систематизации и формализации, в том числе с помощью создания эффективных математических моделей на основе технологии математического моделирования и вычислительного эксперимента, которая сформулирована в работах А. Н. Колмогорова, А. Н. Тихонова, А. А. Самарского, Г. И. Марчука, С. К. Годунова, Н. Н. Яненко, О. М. Белоцерковского, Л. Бергаланфи, П. Эйкхоффа, Д. С. Чернавского, их учеников и коллег.

Анализ известных работ показывает, что при создании математических моделей функционирования такой большой сложной системы с крайне высоким уровнем неопределенностей, как сигнальный путь р53, применяются различные подходы. Наиболее востребованным остается классический биокинетический подход, в рамках которого разработано уже несколько десятков математических моделей, представляющих биологические модели разной степени детализации состава и структуры системы и обладающих определенным прогностическим эффектом. Доказательство адекватности большей части моделей основано на сходстве качественных свойств решений и выявленных при этом динамических режимов с лабораторными наблюдениями. Проблемы валидации моделей и оценки области их применения остаются одними из самых острых, в частности, из-за чрезвычайной сложности исследуемой молекулярно-генетической системы и дефицита достаточно полных лабораторных измерений. Основные направления моделирования связаны с такими важными проблемами, как изучение реакции сигнального пути р53 на воздействия и его роль в решении судьбы клеток с повреждениями. Особо следует отметить, что на момент начала настоящих исследований математическому моделированию функционирования р53-зависимых микроРНК уделялось крайне мало внимания (в первую очередь потому, что микроРНК – это относительно новый объект исследования). К настоящему времени биокинетические модели представляют два направления – это либо модели общего вида белок–микроРНК, либо модели функционирования конкретных сегментов сигнального пути р53 и конкретных микроРНК; известны единичные попытки связать их между собой в рамках одного исследования.

Процессы, связанные с функционированием р53, крайне сложны, они характеризуются многообразием известных р53-зависимых микроРНК с одним и тем же типом связей с р53 и наличием сразу нескольких ключевых белков-ингибиторов р53. Несмотря на достаточно большое количество опубликованных работ по обсуждаемой тематике до сих пор не используются в полной мере возможности применения обобщенного системно-биологического подхода в сочетании с широким кругом экспериментальных данных, определяющих кинетику и характерные состояния системы, интересные для клинической практики (при дегенеративных заболеваниях); при рассмотрении минимальных (малоразмерных) математических моделей не рассматривается их гипотетическая связь с многостадийным процессом функционирования

сигнального пути p53; в известных моделях крайне редко применяются кинетические модели из семейства функций Гольдбетера–Кошланда, отсутствуют соответствующие базовые модели; тематика исследований достаточно разнообразна, но она практически не затрагивает тему использования p53-зависимых микроРНК в качестве биомаркеров дегенеративных заболеваний. Более широкое использование математических моделей для количественного описания экспериментальных данных должно облегчить анализ этих данных и способствовать более глубокому пониманию как достаточно общих закономерностей и механизмов функционирования системы, так и свойств, присущих конкретным сегментам сигнального пути p53, а также повышению доверия к результатам применения p53, его ингибиторов и связанных с ними микроРНК в качестве терапевтических целей и биомаркеров, по уровню которых производится диагностика, контроль эффективности лечения и прогноз исхода дегенеративных заболеваний в рамках соответствующих пациент-ориентированных методик.

Цель работы заключается

- в разработке в рамках системно-биологического подхода новой базовой минимальной математической модели функционирования системы биомаркеров дегенеративных заболеваний p53–белок-ингибитор–микроРНК (отрицательная обратная связь p53–белок-ингибитор и положительная обратная связь p53–микроРНК, реализующаяся через воздействие микроРНК на белок-ингибитор) и создании на ее основе иерархии более полных математических моделей, описывающих широкий круг состояний биологической системы и экспериментальных данных;
- в создании численных моделей, проведении комплексного исследования механизмов и наиболее общих закономерностей функционирования системы типа p53–белок-ингибитор–микроРНК в норме и при дегенеративных заболеваниях, анализе терапевтического и диагностического потенциала p53-зависимых микроРНК (в рамках принятого подхода к моделированию).

Основные задачи исследования, которые требуется решить:

- разработка и реализация в виде программного комплекса эффективных численных алгоритмов решения прямых и обратных коэффициентных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием и систем ОДУ высокой размерности;
- разработка новой базовой модели функционирования системы биомаркеров дегенеративных заболеваний p53–белок-ингибитор–микроРНК; тестирование, калибровка и валидация модели на основе экспериментальных данных, численный анализ качественных свойств

решений, анализ чувствительности модели к малым изменениям параметров и оценка границ ее применимости;

- численный анализ связи минимальных моделей, основанных на использовании функционально-дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами, с моделями в виде систем ОДУ высокой размерности, описывающими явно многостадийный процесс передачи биохимического сигнала в системе типа p53–белок-ингибитор–микроРНК (для систем с положительной прямой связью p53–микроРНК);
- использование базовой модели и широкого круга экспериментальных данных для создания более полных математических моделей, комплексного исследования конкретных механизмов и общих закономерностей функционирования систем типа p53–белок-ингибитор–микроРНК, уточнения роли микроРНК в патогенезе дегенеративных заболеваний, при реализации гипотетических терапевтических стратегий (для систем с положительной обратной связью p53–микроРНК) и как диагностического маркера.

На защиту выносятся следующие положения, соответствующие пунктам 1 («Разработка новых математических методов моделирования объектов и явлений»), 3 («Разработка, обоснование и тестирование эффективных вычислительных методов с применением современных компьютерных технологий»), 4 («Реализация эффективных численных методов и алгоритмов в виде комплексов проблемно-ориентированных программ для проведения вычислительного эксперимента»), 5 («Комплексные исследования научных и технических проблем с применением современной технологии математического моделирования и вычислительного эксперимента»):

1. новая базовая модель функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК (отрицательная обратная связь p53–белок-ингибитор и положительная обратная связь p53–микроРНК, реализующаяся через воздействие микроРНК на белок-ингибитор), а также разработанная на ее основе иерархия математических моделей функционирования ряда ключевых сегментов проапоптозного сигнального пути p53;
2. разработанные и реализованные в виде комплекса программ численные алгоритмы, ориентированные на решение прямых и обратных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами и систем ОДУ высокой размерности ($n \gg 10$);
3. результаты численного анализа связи решений систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием и соответствующих им систем ОДУ высокой размерности в разработанных математических моделях функционирования систем типа p53–белок-

ингибитор и p53–белок-ингибитор–микроРНК (с прямой положительной связью p53–микроРНК);

4. результаты численного моделирования функционирования конкретных сегментов проапоптозного сигнального пути p53, включающих p53, белки-ингибиторы Mdm2, Wip1 или Sirt1, белки-мишени p21 и Bax, одно или несколько известных семейств p53-зависимых микроРНК, при дегенеративных заболеваниях, стрессовых воздействиях облучением и химиопрепаратами;
5. полученные с привлечением иерархии математических моделей и широкого круга экспериментальных данных результаты численного анализа общих закономерностей функционирования системы вида p53–белок-ингибитор–микроРНК, определяющих особую роль и значение p53-зависимых микроРНК как диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней при дегенеративных заболеваниях.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в том, что в нем:

1. разработаны, реализованы в виде программного комплекса и применены к решению широкого круга задач, связанных с моделированием биохимических процессов и гипотетических генных сетей, эффективные численные алгоритмы решения прямых и обратных коэффициентных задач. Для численного решения задачи Коши для системы ОДУ высокой размерности разработана неявная схема 1-го порядка, которая сводит решение нелинейной системы ОДУ специального вида к аналитическому решению трех СЛАУ и решению нелинейного алгебраического уравнения. Алгоритмы демонстрируют высокую работоспособность как при решении начальных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами и систем ОДУ 1-го порядка размерности $n \gg 1000$, так и при определении оптимальных значений параметров, в том числе в условиях структурной неопределенности уравнений;
2. в рамках системно-биологического подхода разработана новая базовая минимальная математическая модель функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК (положительная обратная связь p53–микроРНК, реализующаяся через регуляторное воздействие микроРНК на белок-ингибитор p53). Выполнены тестирование, калибровка и валидация модели на основе экспериментальных данных, численный анализ качественных свойств решений, анализ чувствительности модели к малым возмущениям параметров. Показано, что модель, в которой взаимосвязь белок–ингибитор и белок–микроРНК аппроксимируется кинетической функцией типа Гольдбетера–Кошланда, обеспечивает необходимую широту состояний биологической системы и наблюдаемые в экспериментах

механизмы «бимодального» переключения системы из нормального состояния в состояния риска рака или массовой гибели клеток;

3. для ряда упрощенных математических моделей функционирования системы p53–белок–ингибитор и системы p53–белок–ингибитор–микроРНК, основанных на функционально-дифференциальных уравнениях с запаздыванием, численно показана связь с моделями в виде системы ОДУ высокой размерности, которые явно описывают функционирование той же самой системы как многостадийный процесс с линейным представлением промежуточных стадий. Впервые показано, что в численных экспериментах с ростом числа промежуточных стадий «предельный» переход от решения системы ОДУ к решению уравнения с запаздыванием характеризуется асимптотическим степенным законом n^{-q} (где $q > 0$), согласующимся с известной теоретической оценкой, только если $h \leq C\tau/n$, где n – количество промежуточных стадий, τ – параметр запаздывания, h – шаг расчетной сетки;
4. с привлечением базовой модели выполнено комплексное исследование функционирования ряда наиболее важных сегментов сигнального пути p53, которое включает в себя разработку иерархии новых более полных моделей и численное моделирование функционирования системы при терапевтических воздействиях на раковые клетки и при дегенеративных заболеваниях, сопровождающихся оксидативным стрессом;
5. с привлечением иерархии математических моделей и широкого круга лабораторных экспериментов выполнен численный анализ общих закономерностей функционирования системы p53–белок–ингибитор–микроРНК, определяющих диагностический и терапевтический потенциал p53, его ингибиторов и p53-зависимых микроРНК. Показана особая роль p53-зависимых микроРНК, которая состоит в обеспечении синергического эффекта гиперактивации петли положительной обратной связи p53–микроРНК в условиях стрессового или терапевтического воздействия на клетки-мишени. Продемонстрирован аддитивный эффект гиперактивации p53 несколькими микроРНК (включая miR-34a), важный с точки зрения повышения точности микроРНК-диагностики и эффективности возможных терапевтических воздействий при дегенеративных заболеваниях. Выполнена оценка вероятности рассогласования результатов микроРНК-диагностики дегенеративных заболеваний с результатами диагностики, основанной на анализе уровня p53. Результаты анализа согласуются с данными лабораторных исследований.

Научная и практическая значимость. Разработанная новая базовая математическая модель и основанная на ней иерархия моделей, а также результаты численного анализа представляют интерес в связи с решением актуальных задач исследования механизмов функционирования проапоптозного сигнального пути p53 и регуляторной функции p53-зависимых микроРНК при

широком круге дегенеративных заболеваний. Установленные в ходе моделирования базовые закономерности дают теоретическое обоснование важной роли p53-зависимых микроРНК как регулятора p53-зависимых процессов, диагностического маркера и терапевтической мишени при дегенеративных заболеваниях. Предложенные математические модели могут применяться для создания более полных моделей функционирования сигнального пути p53. Разработанный подход к математическому моделированию, полученные с его применением модели, численные алгоритмы и их программные реализации, основанная на результатах математического моделирования методология оценки экспериментальных данных могут быть использованы при проведении исследований общих закономерностей функционирования больших систем с высоким уровнем неопределенностей в биологии, медицине, химии, экологии и др.

Отдельные этапы работы выполнялись в рамках программы Президиума РАН № 2016-PRAS-0014 «Математическое моделирование функционирования сети онкомаркеров» (2016-2017г.), поддерживались грантом Президента РФ для государственной поддержки ведущей научной школы академика Ю. И. Шокина № НШ-7214.2016.9 (2016–2017), стипендиальными программами Правительства РФ (2019–2020, приказ Минобрнауки РФ № 661 от 30.08.19) и международной технологической компании Baker Hughes (2017, 2018), отмечались стипендией им. академика Н. Н. Яненко (2016).

Методы исследования. При разработке математических моделей биомедицинских систем, характеризующихся высоким уровнем неопределенностей, привлекаются элементы теории систем и системного анализа, известные биокинетические модели, методы анализа чувствительности моделей. Используется общепринятая методология математического моделирования и вычислительного эксперимента. Основу алгоритмов составляют метод последовательного интегрирования (метод шагов) дифференциальных уравнений с запаздыванием и конечно-разностные методы численного решения задач Коши для нелинейных систем ОДУ, в том числе предназначенные для систем ОДУ сверхвысокой размерности. Для решения обратных коэффициентных задач применяется стохастический генетический алгоритм BGA и классический инструментарий математической статистики. Численные эксперименты проводились с использованием программного комплекса, разработанного автором.

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается привлечением иерархии математических моделей, детальным тестированием и проведением больших серий методических расчетов, контролем сходимости решений на последовательности сеток, сопоставлением численных решений с известными экспериментальными данными, аналитическими решениями и расчетами других авторов.

Представление работы. Результаты, вошедшие в диссертационную работу, были представлены и обсуждались на семинарах ИГиЛ СО РАН «Прикладная гидродинамика» под руководством чл.-корр. РАН д.ф.-м.н. В. В. Пухначева и «Гемодинамика» под руководством д.ф.-м.н. А. П. Чупахина, на объединенном научном семинаре ФИЦ ИВТ, кафедры математического моделирования НГУ и кафедры вычислительных технологий НГТУ «Информационно-вычислительные технологии (численные методы механики сплошной среды)» под руководством академика РАН Ю. И. Шокина и д.ф.-м.н. В. М. Ковени, а также на Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики» (Воронеж, 2015, 2016, 2018, 2019, 2020), Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, 2016, 2020), Международной научно-технической конференции «Информационные технологии и математическое моделирование систем» (Одинцово, 2016), Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2016, 2017, 2018), Всероссийской конференции молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям (Новосибирск, 2016, 2019, 2020, 2021), Международной конференции «Марчуковские научные чтения» (Новосибирск, 2017, 2019, 2020), Международной школе молодых ученых «Systems biology and bioinformatics» (Ялта, 2017), Всероссийской конференции «Распределенные информационно-вычислительные ресурсы. Наука – цифровой экономике» (Новосибирск, 2017, 2019), Международной научной конференции «Актуальные проблемы прикладной математики» (Нальчик – Эльбрус, 2018, 2021), The 11-th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology — BGRS\SB-2018 (Новосибирск, 2018), International Conference on the Methods of Aerophysical Research (Новосибирск, 2018), 27th EADV Congress (France, Paris, 2018), Школе молодых ученых MolMod-2018 (Новосибирск, 2018), Международной конференции «Актуальные проблемы вычислительной и прикладной математики» (Новосибирск, 2019), Международной научно-практической конференции «Computational and Information Technologies in Science, Engineering and Education (CITech-2020)» (Казахстан, Алматы, 2020).

Личный вклад. Во всех опубликованных работах автор принимал непосредственное участие в обсуждении постановок задач, разработке и реализации вычислительных алгоритмов, проведении численных экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке и представлении статей и докладов в части, касающейся исследований динамики системы р53–микроРНК. В совместной работе [1] А. О. Козлова участвовала в подготовительной фазе численных экспериментов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 40 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 17 тезисов докладов и 15 статей в трудах международных и всероссийских конференций, 1 свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Полный объем диссертации составляет 206 страниц с 72 рисунками, 7 таблицами и списком литературы из 250 наименований.

Глава 1. Численное моделирование динамики p53–белок-ингибитор–микроРНК (прямая положительная связь p53–микроРНК)

Глава посвящена рассмотрению основных вопросов методологии математического моделирования динамики системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК, для которой такие системы как p53–Mdm2, p53–Wip1, p53–miR-34a и другие являются частными случаями. На этом этапе рассматривается упрощенный тип связей, когда изменение состояния p53 приводит к согласованному с ним изменению состояния микроРНК, а сами микроРНК пассивны по отношению к p53 и к отрицательному регулятору p53 (белку-ингибитору). Лабораторные исследования показывают, что для целого ряда конкретных микроРНК указанный вид зависимости от p53 может быть принят как достаточно достоверный или как модельный.

1.1. Математическая модель функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК

Сложность и запутанность реального сигнального пути p53, а также разнообразие уже известных и вновь открываемых p53-зависимых микроРНК с прямой положительной зависимостью от p53 создает потребность в математической модели достаточно общего вида, которая может быть использована как базовая при создании новых более полных математических моделей. Такая модель должна описывать как наиболее общие закономерности функционирования биологической системы с указанным типом связей, так и конкретные примеры лабораторных и/или клинических наблюдений конкретных микроРНК и белков-ингибиторов.

Рассматривается упрощенная система p53–белок-ингибитор–микроРНК, в которую включена петля отрицательной обратной связи p53–белок-ингибитор, микроРНК являются мишенями p53. Схема взаимодействий представлена на рисунке 1.1. С учетом этих взаимодействий ставится задача построения минимальной математической модели, описывающей наиболее общие закономерности функционирования данной биологической системы.

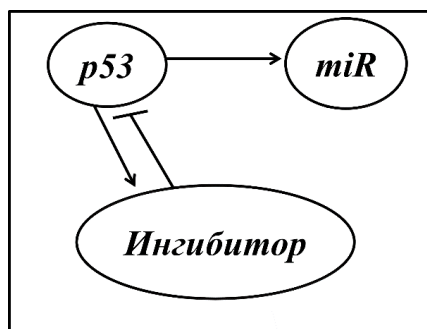


Рисунок 1.1. Схема рассматриваемых в математической модели биологических взаимодействий: *заостренные стрелки* иллюстрируют положительное воздействие (повышение уровня или активация), *тупые* – отрицательное воздействие (ингибирование).

1.1.1. Математическая модель

Для описания динамики системы p53–белок-ингибитор–микроРНК предложена минимальная модель в виде системы функционально-дифференциальных уравнений. Каждое уравнение представляет собой балансное соотношение, отражающее вклад в динамику соответствующего элемента системы p53–белок-ингибитор–микроРНК механизмов генерации и деградации (в рамках модели эти термины подразумевают как конститутивные спонтанные процессы генерации и деградации, так и обусловленные влиянием каких-либо не описанных явно участников сигнального пути p53), а также особо выделяемых процессов взаимодействия элементов системы (это p53-зависимая генерация/активация белка-ингибитора и микроРНК и деградация/инактивация p53 под влиянием белка-ингибитора). Модель имеет следующий вид:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (1.1)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t), \quad (1.2)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 y_1(t - \tau_2) - c_3 y_3(t), \quad (1.3)$$

где y_1 , y_2 , y_3 – уровни белка p53, белка-ингибитора p53 и микроРНК соответственно; a_1 и c_1 – константы скорости генерации белка p53 и микроРНК; a_2 – константа скорости деградации p53 под влиянием белка-ингибитора; a_3 , b_2 , c_3 – константы скорости деградации p53, белка-ингибитора и микроРНК; b_1 и c_2 – константы скорости p53-зависимой генерации белка-ингибитора и микроРНК; параметрам k_f и k_g в рамках данной модели отводится роль регуляторов, обеспечивающих «тонкую настройку» уровней взаимосвязи участников сети; параметры τ_1 и τ_2 определяют время запаздывания реакции белка-ингибитора и микроРНК на изменение уровня белка p53. Здесь для описания обратной связи системы p53–белок-ингибитор

использовались аппроксимации, основанные на биокинетической модели типа Гольдбетера–Кошланда

$$f(u, v, k) = \frac{1}{2} \left(u + v + k - \sqrt{(u + v + k)^2 - 4uv} \right), \quad (1.4)$$

причем изменение уровня белка-ингибитора под влиянием p53 моделируется с привлечением известной биокинетической модели Михаэлиса–Ментен:

$$g(u, v, k_g, k_f) = \frac{u - f(u, v, k_f)}{u + k_g - f(u, v, k_f)}. \quad (1.5)$$

Математическая модель (1.1)–(1.5) сформулирована на основе известной модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5), которая предложена в [71] для описания динамики белков p53 и Mdm2 при их взаимодействии. Модель [71] представляет интерес, прежде всего, потому, что ее ядро составляет достаточно редко используемая в практике моделирования кинетика Гольдбетера–Кошланда, сходная по чувствительности с функциями Хилла с высоким показателем степени [80]. Авторы [71] дают достаточно ясную биологическую интерпретацию принятых аппроксимаций механизма взаимодействия молекул p53 и Mdm2: комплексы, составленные из связанных с Mdm2 молекул p53, вызывают деградацию p53 (по пути убиквитинирования) с постоянной скоростью; скорость генерации Mdm2 пропорциональна вероятности создания комплекса p53–Mdm2-ген, в котором могут участвовать только свободные молекулы p53. Запаздывающий аргумент τ_1 отражает наблюдаемый в лабораторных экспериментах (см., например, [69]) факт задержки реакции Mdm2 на изменение p53. В численных экспериментах настоящей работы, как правило, возникает потребность в том, чтобы динамика системы p53–ингибитор–микроРНК рассматривалась с более общих позиций, чем в [71], а именно – с точки зрения функционирования большой системы (сигнального пути p53). Это позволяет абстрагироваться от конкретного механизма взаимодействия белок–белок и сосредоточиться на достаточно общих свойствах этой системы и типах связей между ее ключевыми элементами, которые имеют значение при исследовании функционирования системы при нормальном функционировании организма (базальное состояние) и при дегенеративных заболеваниях.

Уравнение (1.3), определяющее динамику уровня микроРНК, представляется в достаточной мере общепринятым. Уравнение такого вида часто применяется при описании динамики уровней белков в разных биологических системах и процессах (см., например, [17]). Оно основано на использовании закона действующих масс, а наличие запаздывающего аргумента отражает естественную задержку отклика микроРНК на изменение состояния p53. Отметим, что уравнение вида (1.3), описывающее именно динамику уровня p53-зависимых микроРНК, по-видимому, впервые использовалось в работе [117]. Можно видеть, что уравнение

(1.3) играет пассивную роль по отношению к системе (1.1)–(1.2), что существенно упрощает процесс изучения свойств этой модели.

В качестве начала отсчета времени в данной задаче принимается момент $t = t_0 = 0$. Поскольку система (1.1)–(1.5) содержит функции с запаздывающими аргументами, то начальные данные задаются в виде функций «истории»:

$$y_q(\theta) = \varphi_q(\theta), \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2), \quad q = 1, 2, 3. \quad (1.6)$$

1.1.2. Обезразмеривание

Обезразмеривание системы (1.1)–(1.6) производится 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 ($q = 1, 2, 3$); * – знак обезразмеривания.

В дальнейшем выбор значения T , определяющего масштаб времени, будет зависеть от условий конкретного рассматриваемого лабораторного эксперимента. Этот подход учитывает то, что характерное время исследуемых процессов и параметры τ_1 и τ_2 , определяющие время запаздывания реакции белка-ингибитора и микроРНК на изменение состояния р53, согласно наблюдениям, могут варьироваться от нескольких минут до десятков часов в зависимости от фактора стресса.

В согласии с общепринятым в лабораторных экспериментах подходом к оценке уровня белков относительно некоторого контрольного значения, полагаем, что $C_1 = C_2 = C$. Учитывая положительную связь р53 и микроРНК, в дальнейшем удобно будет полагать $C_1 = C_3 = C$. Вид системы (1.1)–(1.6), записанной относительно безразмерных переменных, будет совпадать с ее видом до обезразмеривания, если:

$$a_1^* = a_1 \frac{T}{C}, \quad a_2^* = a_2 T, \quad a_3^* = a_3 T, \quad b_1^* = b_1 \frac{T}{C}, \quad b_2^* = b_2 T,$$

$$k_g^* = \frac{k_g}{C}, \quad k_f^* = \frac{k_f}{C}, \quad c_1^* = c_1 \frac{T}{C}, \quad c_2^* = c_2 T, \quad c_3^* = c_3 T.$$

Ниже, если это не оговорено особо, будем иметь дело с обезразмеренными уравнениями и переменными, при этом знак обезразмеривания * будет опускаться.

Особо отметим, что при выборе масштабов C_q возникают серьезные трудности, потому что в разных лабораторных экспериментах используются разные масштабы, но установить их значения не представляется возможным. Кроме того, в разных лабораторных экспериментах применяются разные подходы к обработке данных. Все это является частью общепринятой технологии проведения лабораторных измерений во всех лабораториях мира и, по-видимому,

связано с чрезмерной сложностью объекта исследования и с различиями в инструментальном оснащении разных лабораторий. Использование аналогичного подхода при математическом моделировании сильно ограничивает возможности анализа и систематизации результатов. Поэтому масштабы $C_q = C$ в дальнейшем будут связаны только с одной серией в достаточной мере универсальных лабораторных измерений [32], в которых представлен (в условных единицах) большой объем данных о наблюдаемых уровнях p53 и его ингибитора Wip1 в раковых клетках с p53 дикого типа после их облучения. При этом для сопоставления результатов расчетов с данными других лабораторных экспериментов будет проводиться дополнительная обработка численных решений по той же самой схеме, которая использовалась в этих экспериментах.

1.2. Алгоритмы решения прямых и обратных коэффициентных задач для функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием и их систем

Разработка базовой минимальной модели функционирования системы p53–белок–ингибитор–микроРНК, создание на ее основе новых более полных моделей, описание с их помощью широкого круга экспериментальных данных, проведение больших серий численных экспериментов для формирования достаточно представительных статистических выборок и ряд других задач, связанных с задачей структурной и параметрической идентификации моделей, требуют создания эффективного и надежного вычислительного инструмента. Таким инструментом должны стать реализованные в виде программного комплекса численные алгоритмы решения прямых и обратных коэффициентных задач, ориентированные на работу с системами функционально-дифференциальных уравнений, для которых характерно наличие одного или сразу нескольких запаздывающих аргументов, нелинейность и жесткость, проявляющаяся при определенных комбинациях значений параметров (теоретические и вычислительные аспекты решения соответствующих классов задач рассматривались в широком круге работ, среди которых выделим работы [131, 142–146, 149–169]). Дополнительно отметим, что в ходе исследований возникает также потребность в том, чтобы предложенные алгоритмы одновременно могли стать эффективным инструментом решения еще одного класса задач – систем ОДУ высокой размерности $n \gg 10$ (расширение алгоритма и соответствующие методические расчеты будут представлены в главе 2).

1.2.1. Численный алгоритм решения основной начальной задачи (прямой задачи)

В общем виде основную начальную задачу [142, 143] для определения решения $y(t)$ уравнения с запаздывающим аргументом можно представить следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dy}{dt} &= F(t, y(t), y(t - \tau)) \quad \text{при } t \geq t_0, \\ y(t) &= \Psi_0(t) \quad \text{при } t_0 - \tau \leq t \leq t_0, \end{aligned} \quad (1.7)$$

где $\tau > 0$ – параметр запаздывание, $\Psi_0(t)$ – заданная непрерывная функция, называемая начальной (или функцией «истории»). Обычно предполагается, что $y(t_0 + 0) = \Psi_0(t_0)$ [142].

В основе алгоритма решения основной начальной задачи (1.7) лежит известный метод шагов (или метод последовательного интегрирования) [142, 143]. Идея метода состоит в том, что решение $y(t)$ основной начальной задачи (1.7) определяется последовательно на интервалах времени равных величине запаздывания τ из решения дифференциальных уравнений без запаздывания. Поскольку при $t_0 \leq t \leq t_0 + \tau$ решение $y(t - \tau)$ равно начальной функции $\Psi_0(t - \tau)$, то решение задачи (1.7) на этом интервале сводится к решению задачи Коши

$$\frac{dy}{dt} = F(t, y(t), \Psi_0(t - \tau)) \quad \text{при } t_0 \leq t \leq t_0 + \tau, \quad y(t_0) = \Psi_0(t_0).$$

Далее, предполагая существование решения $y(t) = \Psi_j(t)$ начальной задачи (1.7) последовательно на каждом отрезке $[t_0 + (j - 1)\tau; t_0 + j\tau]$, получаем, что решение $y(t)$ задачи (1.7) на интервале $[t_0 + j\tau; t_0 + (j + 1)\tau]$ находится как решение следующей задачи Коши:

$$\frac{dy}{dt} = F(t, y(t), \Psi_j(t - \tau)) \quad \text{при } t_0 + j\tau \leq t \leq t_0 + (j + 1)\tau, \quad y(t_0 + j\tau) = \Psi_j(t_0 + j\tau),$$

где $j = 1, 2, 3, \dots$, $\Psi_j(t)$ – решение начальной задачи на отрезке $[t_0 + (j - 1)\tau; t_0 + j\tau]$. С применением метода шагов в [142] доказана теорема о существовании и единственности решения основной начальной задачи (1.7) при условии, что функции F и Ψ_0 непрерывны, а функция $F(t, y, z)$ удовлетворяет условию Липшица по второму аргументу. Таким образом, метод шагов открывает возможность для решения задачи вида (1.7) с привлечением широко известных численных методов решения задачи Коши. Он является надежным и удобным инструментом для исследования и численного решения дифференциальных уравнений с запаздыванием. Следует отметить, что идея последовательного интегрирования одновременно оказывается полезной и с точки зрения более экономичной организации компьютерных вычислений, что особенно важно при численном решении на достаточно подробных конечно-разностных сетках и/или больших интервалах по времени.

Для решений уравнений с запаздывающим аргументом известен следующий важный теоретический факт [142, 143]: в общем случае решение начальной задачи имеет разрыв первого рода у производной порядка l в точке $t_0 + (l - 1)\tau$ (даже в случае существования у функций F и Ψ_0 непрерывных производных сколь угодно высокого порядка), но производные более низких порядков в этой точке будут уже непрерывны. С учетом этого факта, а также того, что рассматриваемые в работе системы уравнений типа (1.7) могут включать не одну, а сразу несколько функций с запаздывающими аргументами, что они существенно нелинейны и могут быть жесткими (по крайней мере, известно [71, 75–79], что в некоторых постановках при определенных комбинациях значений параметров могут проявляться релаксационные эффекты), задача выбора оптимального численного метода решения задачи Коши оказывается весьма нетривиальной. Она решалась путем сопоставительного численного анализа ряда одношаговых методов – явного метода Эйлера, метода предиктор-корректор 2-го порядка и метода Рунге-Кутты 4-го порядка, а также многошаговых методов Адамса–Бэшфорта–Моултона и Гира теоретического 4-го порядка, которые, как и метод предиктор-корректор 2-го порядка, (в общем случае) имеют повышенный запас устойчивости (см., например, [149]). Все они были реализованы в рамках разработанного программного комплекса. Ниже перечисленные методы представлены более подробно.

Пусть на отрезке $t_0 + j\tau \leq t \leq t_0 + (j + 1)\tau$ требуется найти решение $y(t)$ дифференциального уравнения первого порядка

$$\frac{dy}{dt} = F(t, y(t), \Psi_j(t - \tau)),$$

удовлетворяющее при $t = t_0 + j\tau$ начальному условию $y(t_0 + j\tau) = \Psi_j(t_0 + j\tau)$, $j = 0, 1, 2, \dots$. Предполагается, что условия существования и единственности решения данной задачи Коши выполнены, и функция F в некоторой области изменения ее аргументов обладает достаточной гладкостью. Для решения данной задачи на интервале $t \in [t_0 + j\tau, t_0 + (j + 1)\tau]$ вводится сетка с узлами $\{t_i = (t_0 + j\tau) + ih, i = 0, \dots, M\}$ и, следовательно, $\tau = Mh$. Функция u_i – приближенное решение в узлах сетки t_i , если погрешность численного решения стремится к нулю при уменьшении шага сетки $h \rightarrow 0$. При использовании метода шагов для решения основной начальной задачи (1.7) функции $\Psi_j(t_i)$ – приближенные решения $y(t_i)$ на отрезке $t_0 + (j - 1)\tau \leq t_i \leq t_0 + j\tau$ ($j = 0, 1, 2, \dots$), поэтому обозначим $u_{i-M} = \Psi_j(t_i - \tau)$ и $F_i = F(t_i, u_i, u_{i-M})$. Дополнительные погрешности и временные затраты могут возникать из-за несовпадения значений $t - \tau$ с узлами расчетной сетки, где определены дискретные функции с запаздывающими аргументами. Поэтому во всех расчетах шаг сетки выбирался постоянным и таким, чтобы $\tau = Mh$, где $M \gg 1$ – натуральное число.

Достоинство явного метода Эйлера (метода 1-го порядка точности)

$$u_{i+1} = u_i + hF_i \quad (1.8)$$

состоит в том, что он чрезвычайно прост в реализации, однако из-за условной устойчивости может применяться только на весьма подробных сетках.

Расчетные формулы метода предиктор-корректор 2-го порядка

$$\tilde{u}_{i+1} = u_i + hF_i, \quad (1.9a)$$

$$u_{i+1} = u_i + h \frac{F_i + \tilde{F}_{i+1}}{2}, \quad \text{где } \tilde{F}_{i+1} = F(t_{i+1}, \tilde{u}_{i+1}, u_{i+1-M}) \quad (1.9b)$$

основываются на неявной схеме улучшенного метода Эйлера (1.9б). Следует отметить, что схема-корректор (1.9б) совпадает с неявной формулой Адамса 2-го порядка [144]. В случае нелинейной правой части схема предиктор-корректор вида (1.9) – один из наиболее простых, надежных и экономичных вариантов реализации улучшенного метода Эйлера.

Многошаговый метод типа предиктор–корректор Адамса–Бэшфорта–Моултона (АБМ)

$$\begin{aligned} \tilde{u}_{i+1} &= u_i + \frac{h}{24}(55F_i - 59F_{i-1} + 37F_{i-2} - 9F_{i-3}), \\ u_{i+1} &= u_i + \frac{h}{24}(9\tilde{F}_{i+1} + 19F_i - 5F_{i-1} + F_{i-2}), \end{aligned} \quad (1.10)$$

$$\text{где } F_i = F(t_i, u_i, u_{i-M}), \quad \tilde{F}_{i+1} = F(t_{i+1}, \tilde{u}_{i+1}, u_{i+1-M}),$$

использует в качестве предиктора и корректора явную и неявную схемы из семейства Адамса соответственно, каждая из них имеет теоретически на достаточно гладких решениях четвертый порядок точности.

Метод Гира

$$u_{i+1} = \frac{1}{25}(12hF_{i+1} + 48u_i - 36u_{i-1} + 16u_{i-2} - 3u_{i-3}) \quad (1.11)$$

относится к методам, основанным на формуле дифференцирования назад (ФДН), которым обычно отдается предпочтение при решении жестких задач. Данный метод теоретически на достаточно гладких решениях сходится с 4-м порядком точности. Для решения нелинейного уравнения (1.11) использовалась стандартная функция пакета программ MATLAB.

При применении многошаговых методов для решения обыкновенных дифференциальных уравнений дополнительно требуется определять значения решения в первых нескольких узлах сетки на интервале $[t_0; t_0 + \tau]$, где многошаговые методы еще «не работают». Рассматривались два способа решения этой вычислительной проблемы. Наиболее простой состоит в том, что при условии продолжения начальных условий (функций «истории») на три узла влево перечисленные многошаговые методы могут использоваться для численного интегрирования уравнений с запаздыванием во всех узлах расчетной сетки, начиная с $t = t_0 + h$. Ниже будет показано, что такой подход, особенно в случае постоянной функции «истории», не приводит к потере точности решения и упрощает алгоритм. Другой общепринятый способ состоит в том, чтобы решение в точках $t_1 = t_0 + h$, $t_2 = t_0 + 2h$, $t_3 = t_0 + 3h$ вычислялось с привлечением

одношагового метода того же самого, что у основного метода, или близкого порядка точности. В настоящей работе привлекается предложенная Л. Н. Белых [146] модификация метода Рунге–Кутты 4-го порядка, которая заключается в использовании результатов вычисления коэффициентов k_j в точке $t_i - \tau$:

$$\begin{aligned}
 k_1^i &= hF(t_i, u_i, u_{i-M}), \\
 k_2^i &= hF\left(t_i + \frac{h}{2}, u_i + \frac{k_1^i}{2}, u_{i-M} + \frac{k_1^{i-M}}{2}\right), \\
 k_3^i &= hF\left(t_i + \frac{h}{2}, u_i + \frac{k_2^i}{2}, u_{i-M} + \frac{k_2^{i-M}}{2}\right), \\
 k_4^i &= hF(t_i + h, u_i + k_3^i, u_{i-M} + k_3^{i-M}), \\
 u_{i+1} &= u_{i+1} + (k_1^i + 2k_2^i + 2k_3^i + k_4^i)/6.
 \end{aligned} \tag{1.12}$$

Таким образом, алгоритм численного решения основной начальной задачи вида (1.7) состоит в разбиении расчетного интервала на подинтервалы, равные величине запаздывания и последовательном решении задачи Коши одним из перечисленных методов, которые реализуются с привлечением идеи метода Зейделя: при вычислении решения на новом слое по времени привлекаются уже полученные на данном слое значения компонент решения. Конкретный выбор численного метода задачи Коши определяется свойствами конкретной задачи и целью проводимого исследования. В разделе методических расчетов будет показано, что для решения рассматриваемых задач наиболее эффективными являются методы из семейства Адамса, а именно метод предиктор-корректор 2-го порядка (схема-корректор совпадает с неявной формулой Адамса 2-го порядка) и метод Адамса–Бэшфорта–Моултона 4-го порядка.

1.2.2. Численный алгоритм решения обратной коэффициентной задачи

В данной работе численное моделирование динамики системы р53–белок-ингибитор–микроРНК в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов, как правило, связано с решением обратной коэффициентной задачи. Отметим, что решение обратных задач используется при моделировании различных процессов во многих областях естественных наук, а теоретические и численные аспекты решения таких задач представлены, в частности, в работах [170–180].

В настоящей работе в качестве инструмента решения обратной коэффициентной задачи привлекался стохастический генетический алгоритм Breeder Genetic Algorithm (BGA) [181–184]. Этот метод был разработан и с успехом применялся при решении задач, связанных с оптимизацией гидротехнических устройств [181–183]. В [183] для целого ряда тестовых

функций показана высокая вероятность сходимости процесса минимизации функционала, зависящего от 20 переменных. В [184] BGA был, по-видимому, впервые применен для структурной и параметрической идентификации биокинетических моделей в задачах биомедицины. Было показано удобство использования и эффективность данного метода при решении задачи оптимизации с достаточно большим количеством определяемых параметров и рассмотрены методические вопросы применения BGA к решению задач того же класса, что и в настоящей работе. В частности, на примере решения модельной обратной коэффициентной задачи с 9 неизвестными коэффициентами (параметрами модели) показано хорошее согласие результатов, полученных с помощью алгоритма BGA, градиентного [185] и овражного Гельфанда–Цетлина [170] методов оптимизации. В [184] продемонстрирована также высокая эффективность алгоритма BGA при решении обратной коэффициентной задачи для 19 параметров модели биохимических реакций при инфаркте миокарда.

Генетический алгоритм формулируется обычно в терминах популяционной биологии и сводится к поиску «идеального» (по заданным свойствам) индивидуума из множества «лучших» индивидуумов нескольких поколений. Индивидуумы (под индивидуумом имеют в виду набор значений параметров модели) каждого поколения подвергаются оценке, селекции, рекомбинации, мутации и клонированию. В ходе перечисленных процедур происходит формирование нового поколения. При удачном выборе регулирующих работу BGA параметров и нулевого поколения итерационный процесс поиска минимума функционала должен сходиться в себе, а также должны сходиться в себе последовательности значений каждого неизвестного параметра модели.

На начальном этапе BGA формируется начальное поколение из $z = z_0$ индивидуумов π_1, \dots, π_z , где $\pi_l = (p_1, \dots, p_\mu)$ – набор значений параметров, подлежащих определению ($\mu \leq M$, где M – число параметров модели); $l = 1, \dots, z$. Значения параметров для каждого π_l определяются случайным образом из значений, определенных на некоторых достаточно больших интервалах вещественных чисел. Выбор данных интервалов играет важную роль, в значительной степени влияя на эффективность работы алгоритма BGA. В настоящей работе оценки границ интервалов основывались на известных биологических соображениях, теоретических оценках и/или результатах предыдущих серий численных экспериментов.

Работа с каждым новым поколением начинается с оценки каждого индивидуума сформированного поколения. При этом для каждого из z индивидуумов π_1, \dots, π_z должна быть решена прямая задача и вычислено значение функционала, который определяет близость численного решения к экспериментальным данным в фиксированные моменты времени проведения лабораторных измерений. Функционал представлялся в следующем виде:

$$\Phi = \left(\sum_q \frac{\sum_j (y_q^{norm}(t_j) - y_q^{exp}(t_j))^2}{\max_j (y_q^{exp}(t_j))^2} \right)^{1/2},$$

где y_q^{exp} ($q = 1, 2, 3$) – экспериментальные данные, y_q^{norm} ($q = 1, 2, 3$) – численные решения, обработанные в соответствии с нормировкой, принятой в экспериментах. На основании этого анализа производится селекция: в новое поколение войдут только $Z < z$ «лучших» (в смысле минимума функционала) индивидуумов. Остальные индивидуумы отбрасываются.

На этапе рекомбинации случайным образом выбираются два индивидуума-родителя из предыдущего поколения $\mathbf{v} = (v_1, \dots, v_\mu)$, $\mathbf{w} = (w_1, \dots, w_\mu)$, которые порождают нового индивидуума $\pi = (p_1, \dots, p_\mu) = (v_1 + \alpha_1(w_1 - v_1), \dots, v_i + \alpha_i(w_i - v_i), \dots, v_n + \alpha_\mu(w_\mu - v_\mu))$, где $\alpha_i \in [-d; 1 + d]$ – случайное число, $i = 1 \dots \mu$. Таким образом, происходит восстановление численности популяции до z индивидуумов.

Затем следует этап мутации, который обеспечивает определенное разнообразие индивидуумов: $p_i = p_i \pm \beta(p_{L,i} - p_{R,i}) * 2^{-16\gamma}$, где $\beta \in [0; 1]$ – мутационный параметр, $\gamma \in [0; 1]$ – случайное число, $p_{L,i}$ и $p_{R,i}$ – заданные границы i -й компоненты индивидуума. При этом важно, чтобы «лучшие» индивидуумы в каждом поколении не были потеряны в ходе рекомбинации и мутации. Поэтому на этапе клонирования «лучшие» индивидуумы предыдущего поколения переходят в новое поколение без изменений. Новое поколение сформировано.

Далее следует переход на этап оценки индивидуумов, т.е. к решению серий прямых задач для новой популяции и вычислению функционала. Данный итерационный процесс продолжается до тех пор, пока функционал не выйдет (с достаточно высокой точностью) на постоянное значение, а последовательность соответствующих значений параметров модели не начнет сходиться в себе. Как правило, для этого требуется рассчитать N_{gen} поколений, конкретное значение N_{gen} определяется из практики расчетов.

Важно отметить, что при реализации алгоритма BGA дополнительно проводилась строгая проверка выполнения условий о положительной определенности параметров и неотрицательности компонент решений прямой задачи, которые связаны с биологическим смыслом принятой математической модели. В случае невыполнения первого условия для некоторого индивидуума он может быть заменен на ближайший по значению функционала индивидуум. При нарушении второго условия полученное решение обратной задачи признавалось неудачным и проводился новый запуск алгоритма. В настоящей работе в некоторых сериях численных экспериментов одновременно решались задачи структурной и параметрической идентификации новой модели или отдельных уравнений, дополняющих уже существующую базовую модель. Поэтому в случае регулярных нарушений представленных

выше условий это считалось сигналом о необходимости дополнительной модификации уравнения или модели в целом.

Отметим, что, обратные коэффициентные задачи некорректны по Адамару и характеризуются отсутствием единственности решения. В силу стохастичности BGA при каждом новом запуске алгоритма определяется новый набор параметров, являющийся (гипотетически) искомым оптимальным решением обратной задачи. Поэтому окончательный выбор определения оптимального набора значений параметров (решения обратной коэффициентной задачи) осуществлялся с учетом данных статистического анализа выборок, составленных из результатов от 20 до 750 равноценных запусков алгоритма BGA: при выборе оптимального набора оценивались значения функционалов, полученных для центральных 50% индивидуумов выборки. С учетом выполнения всех этих условий основными критериями выбора являлись соответствие качественных свойств полученного решения прямой и обратной задачи известным биологическим представлениям о моделируемом процессе. Для восполнения недостающих данных в экспериментальных временных рядах, используемых в задаче минимизации функционала, привлекались результаты монотонной сплайн-интерполяции. При решении обратной задачи выдвигалось требование близости модельных данных к усредненным результатам измерений. При этом принимались во внимание допустимые погрешности лабораторных экспериментов, в том числе обусловленные естественной ограниченностью выборок, из которых формировались экспериментальные данные.

В настоящих численных экспериментах управляющие параметры генетического алгоритма BGA варьировались в следующих диапазонах значений: $z_0 \in [200, 1600]$, $z \in [200, 1600]$, $N_{gen} \in [20, 60]$. Остальные параметры BGA равны следующим значениям: $Z = 0.3z$, $d = 0.1$, $\beta = 0.1$. Следует отметить, что данные значения согласуются с величинами, полученными в ходе методических расчетов в работе [184] для биокинетической модели, описывающей динамику факторов воспаления в ядре инфаркта миокарда.

1.2.3 Программная реализация

В настоящей работе математическое моделирование функционирования системы р53–белок-ингибитор–микроРНК связано с проведением больших серий расчетов прямых задач, а также решением задач структурной и параметрической идентификации моделей. Для решения возникающих задач был разработан программный комплекс, включающий в себя реализацию описанных выше численных алгоритмов решения прямых и обратных коэффициентных задач для систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием, а также систем ОДУ высокой размерности $n \gg 10$ (задачи данного типа рассматриваются в главе 2) и

«прямого» локального метода для анализа чувствительности моделей к малому изменению значений параметров.

Программный комплекс состоит из нескольких компонент, которые реализованы на языках программирования C++ и Fortran 77. Центральной компонентой разработанного комплекса является программная реализация численного алгоритма решения задач с начальными условиями для систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием (представлен в разделе 1.2.1) и систем ОДУ высокой размерности (соответствующий численный алгоритм представлен в главе 2), на которую получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Программа для расчета динамики онкомаркеров p53 и Mdm2 и оценки реакции p53-зависимых микроРНК на стрессовые воздействия» № 2018612326 (см. приложение). Дополнительно как часть программного комплекса реализован стохастический генетический алгоритм BGA для решения обратных коэффициентных задач, в рамках которого решение прямой задачи проводится методом предиктор-корректор 2-го порядка.

1.3. Методические расчеты основной начальной задачи (прямой задачи)

1.3.1. Оценка работоспособности численных методов решения начальной задачи (прямой задачи)

В данном параграфе представлены результаты методических расчетов, в рамках которых рассматривается частный случай системы общего вида – система p53–Mdm2–микроРНК. Тогда целесообразно воспользоваться результатами работы [71]. В этой работе впервые система (1.1)–(1.2) предложена как модель динамики системы p53–Mdm2, поскольку значения целого ряда параметров определены из анализа экспериментальных данных, соответствующих состоянию условной нормы, а в ходе численного и теоретического анализа получены периодические решения, для которых найдены аналогии с наблюдаемыми в лабораторных экспериментах режимов функционирования системы p53–Mdm2 в условиях стресса. Так, значения параметров a_2 (константа скорости деградации p53 по пути убиквитинирования, т.е. под воздействием Mdm2) и a_3 (константа скорости спонтанной деградации p53) принимались на основе анализа экспериментальных данных [186, 187]; параметры k_f и k_g , которым придавался смысл констант диссоциации между белками p53 и Mdm2 и между p53 и геном mdm2 соответственно, оценивались приближенно числом молекул в ядре клетки (для ядра принимался объем 0,6 мкм³)

на основе [188]. Для остальных параметров модели (1.1)–(1.5) в настоящей работе, так же как в [71], ввиду отсутствия детальных оценок задавались «типичные» значения, которые должны

а) обеспечить совместную динамику компонент решения задачи, не противоречащую установленным биологическим связям p53, Mdm2 и микроРНК – отрицательной обратной связи p53–Mdm2 и положительной прямой связи p53–микроРНК,

б) до определенной степени скомпенсировать воздействие факторов, не учтенных явно в модели p53–Mdm2–микроРНК,

в) обеспечить состояние всех компонент моделируемой системы на относительно низком стационарном уровне, приблизительно соответствующем лабораторным наблюдениям и представлениям о базальном состоянии системы.

Таким образом, в качестве обезразмеренного набора параметров, обеспечивающего в рамках принятой модели описание состояния условной нормы (или базального состояния) для системы p53–Mdm2–микроРНК принимается следующий (здесь масштаб времени T полагался равным 1 сек.):

$$a_1 = 1, b_1 = 1, c_1 = 1, a_2 = 3 \cdot 10^{-2}, b_2 = 10^{-2}, c_2 = 1, \quad (1.13)$$

$$a_3 = 10^{-4}, c_3 = 1, k_f = 180, k_g = 28.$$

Методические расчеты, направленные на выбор оптимального численного метода решения задачи (1.1)–(1.6) и соответствующих сеточных параметров, осуществлялись с использованием методов (1.8)–(1.12) на последовательности конечно-разностных сеток. Интервал времени в различных численных экспериментах составлял от 17τ до 2000τ ($\tau = \max(\tau_1, \tau_2)$) в зависимости от характера решения задачи и числа шагов сетки, необходимых для выяснения асимптотических свойств решения. Погрешность Δu численного решения задачи (1.1)–(1.6) оценивалась в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, с привлечением правила Рунге.

На начальном этапе полученное с использованием параметров (1.13) численное стационарное решение сопоставлялось с аналитическим решением задачи:

$$y_2^{(1)} = \frac{b_1}{b_2} \cdot \frac{(a_2 + a_3)y_1 - a_1}{(a_2 + a_3)y_1 - a_1 + a_2k_g}, \quad (1.14)$$

$$y_2^{(2)} = \frac{(a_1 - a_3y_1)((a_2 + a_3)y_1 + a_2k_f - a_1)}{a_2((a_2 + a_3)y_1 - a_1)} \quad (1.15)$$

$$y_3 = \frac{c_1 + c_2y_1}{c_3} \quad (1.16)$$

Следует отметить, что формулы (1.14)–(1.15) получены в [71]. На рисунке 1.2 можно видеть, что при значениях параметров (1.13) точка пересечения аналитических кривых (1.14)–(1.16) $y_1^* \approx 154.635$, $y_2^* \approx 81.31$, $y_3^* \approx 155.635$ практически совпадает с полученной в расчетах

неподвижной точкой (y_1^0, y_2^0, y_3^0) решения системы (1.1)–(1.5). Для наглядности соответствующие этому решению графики зависимости компонент численного решения от времени представлены на рисунке 1.3. Расчет проводился методом Адамса–Бэшфорта–Моултона. Другие численные методы дали аналогичный результат. Отметим, что область значений y_1, y_2, y_3 , где стационарное решение (1.14)–(1.16) имеет особые точки, не включает в себя точку (y_1^*, y_2^*, y_3^*) и не представляет интереса из-за нефизичности значительной части этих решений.

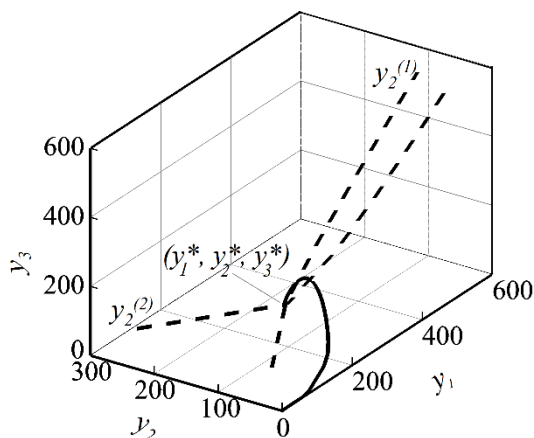


Рисунок 1.2. Решение задачи (1.1)–(1.6) при значениях параметров (1.13): *сплошная линия* – численное решение, *пунктирные линии* – фрагмент аналитического стационарного решения (1.14)–(1.16).

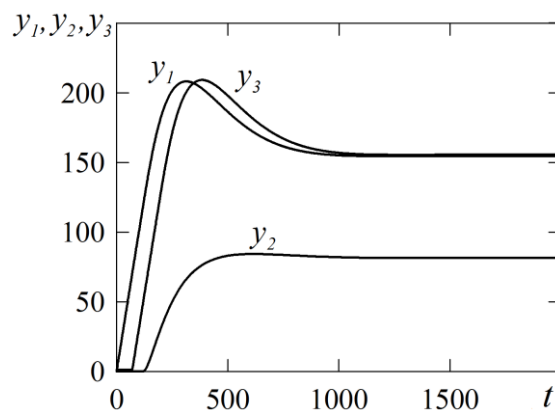


Рисунок 1.3. Численное решение задачи (1.1)–(1.6) при значениях параметров (1.13), полученное методом АБМ (1.10) на сетке с шагом $h = 1.25$.

В методических целях значения параметров запаздывания сначала полагались нулевыми: $\tau_1 = 0$ и $\tau_2 = 0$. В этом случае задача (1.1)–(1.6) существенно упрощается и состоит в решении задачи Коши для системы ОДУ на интервале $t_0 < t \leq T$. Начальные данные задаются в точке $t = t_0$ равными нулю. Параметры принятой модели определяются значениями (1.13). Отметим, что при численном решении системы (1.1)–(1.5) в случае $\tau_1 = 0$ и $\tau_2 = 0$ с использованием многошаговых методов АБМ (1.10) и Гира (1.11) решение в первых трех точках вычислялось методом Рунге–Кутты 4-го порядка. На рисунке 1.4 приведены графики погрешностей некоторых решений. Анализ этих данных показывает, что порядок точности решений, полученных методами предиктор-корректор 2-го порядка (1.9), АБМ (1.10), Гира (1.11) и Рунге–Кутты 4-го порядка близки к соответствующим теоретическим значениям. Среди рассмотренных численных методов решения задачи (1.1)–(1.6) при $\tau_1 = 0$ и $\tau_2 = 0$ наиболее точным оказался метод Рунге–Кутты 4-го порядка. Наибольшая погрешность у решения, полученного методом предиктор-корректор 2-го порядка. Следует отметить, что значения

погрешностей решений, вычисленных методами Рунге–Кутты и АБМ (1.10) на сетках даже с относительно умеренной величиной шага h , весьма близки к машинной точности.

Основные серии численных экспериментов проводились, если это особо не оговорено, при $\tau_1 = 120$, $\tau_2 = 70$ и значениях параметров модели (1.13), в качестве функций «истории» использовали функцию $\varphi_k(\theta) = 0$, $\theta \in [-\tau, 0]$, где $\tau = \max(\tau_1, \tau_2)$, $q = 1, 2, 3$ (исследование влияния выбора начальных условий на численное решение будет проведено ниже). Для сопоставления эффективности численных методов (1.8)–(1.12) проанализированы значения относительной погрешности численного решения задачи (1.1)–(1.6) в зависимости от размера шага конечно-разностной сетки. Рассматривались, в частности, два характерных решения – с выходом на стационарный режим и на режим периодических колебаний.

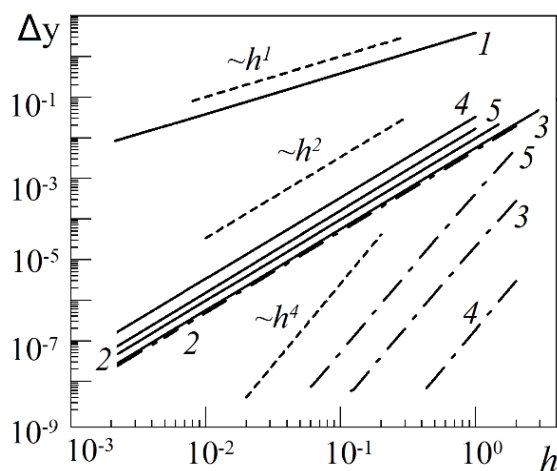


Рисунок 1.4. Зависимость погрешности численного решения задачи (1.1)–(1.6) от шага расчетной сетки: 1 – явный метод Эйлера, 2 – метод предиктор-корректор 2-го порядка, 3 – метод Адамса–Бэшфорта–Моултона 4 порядка, 4 – метод Рунге–Кутты 4 порядка, 5 – метод Гира, *сплошные линии* – расчеты при $k_f = 0.067k_f^0$, $\tau_1 = 1200$, *штрихпунктирные линии* – расчеты при (1.13) и $\tau_1 = 0$, $\tau_2 = 0$, *пунктирные линии* – приближенные степенные зависимости.

Выполнен анализ погрешностей численных решений, полученных с привлечением методов (1.8)–(1.12) на последовательности сеток (рассматривается случай с асимптотически устойчивым решением при (1.13)). Как и ожидалось, погрешность численного решения, вычисленного методом Эйлера (1.8), существенно больше соответствующих значений погрешностей Δy для методов предиктор-корректор 2-го порядка (1.9), АБМ (1.10), Гира (1.11) и Рунге–Кутты (1.12). Анализ полученных результатов выявил существенный разброс в значениях погрешностей решений, вычисленных методами (1.9)–(1.12). При этом наименьшая погрешность у решений, полученных методами предиктор-корректор 2-го порядка (1.9) и Адамса–Бэшфорта–Моултона (1.10).

В ходе следующей серии расчетов получено, что по сравнению с асимптотически устойчивым решением, продемонстрированным на рисунке 1.3 ($k_f = 180$), погрешность Δu периодического решения ($k_f = 4$, $\tau_1 = 120$) несколько выше (при одинаковых значениях h). Так, например, на сетке с шагом $h = 0.02$ относительная погрешность численного решения, вычисленного методом АБМ, при (1.13) $\Delta u = 5.42 \cdot 10^{-8}$, а при $k_f = 4$, $\tau_1 = 120$ $\Delta u = 1.03 \cdot 10^{-7}$.

Особое внимание уделялось таким вариантам периодических решений, при которых могут наблюдаться релаксационные эффекты, указывающие на жесткость задачи. Релаксационные эффекты характеризуются резким изменением значений одной компоненты решения на фоне слабого изменения другой. Один из вариантов такого решения получен при $k_f = 0.067k_f^0$, $\tau_1 = 1200$ (остальные параметры равны значениям (1.13)) и представлен на рисунке 1.5.

Результаты анализа погрешности численных решений, вычисленных методами (1.8)–(1.12) на последовательности сеток, можно видеть на рисунке 1.4 (рассматривается случай $k_f = 0.067k_f^0$, $\tau_1 = 1200$). Видно, что при одинаковых значениях h наименьшей погрешностью обладает численное решение, полученное с применением метода АБМ (1.10), близкие значения погрешности решения получены при использовании метода предиктор-корректор 2-го порядка (1.9). Фактический порядок сходимости методов низкого порядка – метода Эйлера (1.8) и метода предиктор-корректор (1.9) – для всех рассмотренных вариантов решений достигает теоретических значений 1 и 2 соответственно. Для методов АБМ (1.10), Гира (1.11) и Рунге–Кутты (1.12) фактический порядок точности p численного решения практически не превышал значения 2, что существенно ниже теоретического значения ($p = 4$). Эти оценки оказались справедливыми для численных решений, полученных при значениях параметров (1.13), при которых, как видно на рисунке 1.3, компоненты численного решения задачи (1.1)–(1.6) выходят на стационарные значения. Точно так же потеря порядка точности при использовании методов высокого (теоретического) порядка имела место в случае периодических колебаний, которые можно наблюдать, в частности, при $k_f = 4$, $\tau_1 = 120$. Потеря порядка точности решений, вычисленных методами высокого порядка, характерна для уравнений с запаздыванием и связана с нарушением гладкости решения в точке $t = 0$ и разрывами производных в точках, кратных величине запаздывания.

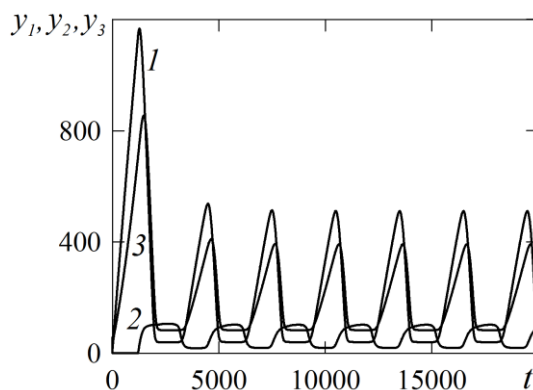


Рисунок 1.5. Численное решение задачи (1.1)–(1.6) при $k_f = 0.067k_f^0$, $\tau_1 = 1200$ (остальные параметры равны значениям (1.13)), полученное методом АБМ (1.10) на сетке с шагом $h = 0.1$: 1 – y_1 , 2 – y_2 , 3 – y_3 .

Отметим, что дополнительно исследовался вопрос о способе вычисления решения в первых трех узлах разностной сетки при использовании многошаговых методов АБМ (1.10) и Гира (1.11) для численного решения задачи (1.1)–(1.6) с запаздыванием (при $\tau_1 \neq 0$ и $\tau_2 \neq 0$). Рассматривалось три способа: вычисления с привлечением метода Рунге–Кутты 4-го порядка (1.12), метода предиктор-корректор 2-го порядка (1.9) и использование «точных» значений функций «истории» (1.6). Получено, что рассмотренные подходы слабо влияют на погрешность численного решения и ее асимптотические свойства, поскольку значения погрешностей на одинаковых сетках отличаются не более чем на 0.2%. Исходя из этого, при использовании многошаговых методов для решения задачи (1.1)–(1.6) с запаздыванием для определения решения в первых трех точках в дальнейшем привлекались начальные условия (1.6).

Таким образом, приведенные результаты численных экспериментов указывают на то, что последовательности численных решений, полученных методом предиктор-корректор 2-го порядка (1.9), Адамса–Бэшфорта–Моултона (1.10), Гира (1.11) или Рунге–Кутты (1.12) на последовательности конечно-разностных сеток, сходятся при $h \rightarrow 0$ со вторым порядком. Для методов (1.10)–(1.12) фактическое значение порядка точности в два раза меньше теоретического, что, как отмечалось выше, по-видимому, связано со свойствами решений уравнений с запаздыванием. Анализ погрешностей Δu численных решений, полученных методами (1.8)–(1.12) на последовательности конечно-разностных сеток, показал, что на сетках с одинаковым шагом наибольшей точностью обладает решение, вычисленное методом АБМ (1.10). Несколько неожиданным результатом является тот факт, что точность решения, вычисленного с применением метода предиктор-корректор 2-го порядка (1.9), не уступает точности методов более высокого порядка, а уровень погрешности близок к погрешности решения, полученного методом АБМ (1.10). Этот результат, по-видимому, можно рассматривать как свидетельство того, что для проведения больших серий численных расчетов

рассматриваемых в данной работе прямых задач наиболее предпочтительными являются методы типа предиктор-корректор, основанные на методах из семейства Адамса.

Следует отметить также, что выбор метода для решения системы (1.1)–(1.5) с начальными данными (1.6) зависит от цели проводимых численных экспериментов. Так, при исследовании качественных свойств решений модели (1.1)–(1.6) и численном определении линий нейтральности (см. раздел 1.4.4), в ходе которых значения параметров варьировались в широком диапазоне значений, важным критерием выбора численного метода является его точность и эффективность решения жестких систем уравнений. Поэтому расчеты проводились преимущественно методом АБМ (1.10) на достаточно подробных сетках $h \in [0.005, 0.1]$. При проведении больших серий расчетов прямой задачи (1.1)–(1.6) (например, в ходе решения обратной коэффициентной задачи) наиболее предпочтительным оказывается метод предиктор-корректор 2-го порядка (1.9), позволяющий проводить вычисления с удовлетворительной точностью за приемлемое время.

1.3.2. Зависимость решения от начальных данных и значений параметров запаздывания

Данная серия численных экспериментов направлена на то, чтобы иметь более полное представление о решении задачи, полученном при значениях параметров (1.13). Проведена серия численных экспериментов, в которых в качестве функций «истории» $\varphi_k(\theta)$ ($\theta \in [-\tau, 0]$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2)$, $q = 1, 2, 3$) задавались следующие:

а) $\varphi_k(\theta) = 0$ (это наиболее интересный вариант с точки зрения исследований, представленных в главе 2),

б) стационарные значения решений при (1.13) с внесением возмущений от 10% до 2 порядков (в сторону увеличения и убывания, для каждой компоненты решения отдельно или одновременно для всех трех),

в) периодические функции.

На рисунке 1.6 приведены некоторые результаты данной серии расчетов, в которых в качестве $\varphi_k(\theta)$ рассматривались постоянные значения концентраций в диапазоне от 0 до 180 (линии 1–4) и периодическое решение, полученное в расчетах при $k_f = 0.18$, $\tau_1 = 120$, $\tau_2 = 70$. Получено, что начальные условия практически не влияют на асимптотическое поведение решения системы (1.1)–(1.6), (1.13). Так, на рисунке 1.6 можно видеть, что компоненты решения задачи (1.1)–(1.6) y_1 , y_2 сходятся к одним стационарным значениям, установленным ранее.

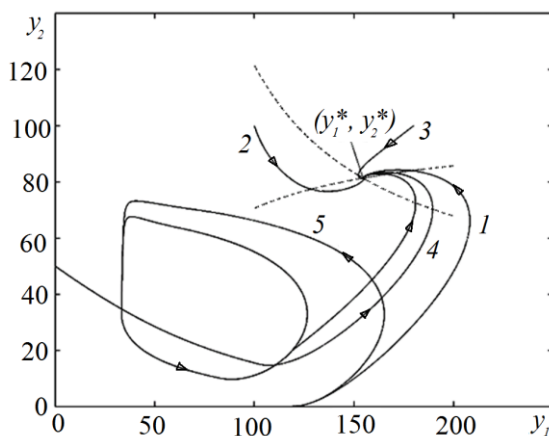


Рисунок 1.6. Фазовый портрет решений задачи (1.1)–(1.6) при значениях параметров (1.13) в зависимости от начальных данных: 1 – $\varphi_k(\theta) = 0$; 2 – $\varphi_k(\theta) = 100$; 3 – $\varphi_1(\theta) = 180$, $\varphi_2(\theta) = 100$; 4 – $\varphi_1(\theta) = 0$, $\varphi_2(\theta) = 50$; 5 – $\varphi_k(\theta)$ – периодическое решение при $k_f = 0.18$, $\tau_1 = 120$; пунктирные линии – фрагмент аналитического стационарного решения при (1.13).

Решение задачи устойчиво и к вариациям начального условия для компоненты y_3 в случае параметров (1.13). Дополнительная проверка устойчивости решения задачи по отношению к малым вариациям начальных данных проводилась в некоторых методически важных случаях периодического решения задачи, например, при уменьшении значения k_f (по сравнению с принятым в (1.13)) для сопоставления с решением [71].

Таким образом, в методических целях, а также в расчетах, направленных на изучение асимптотических свойств решения модели (1.1)–(1.6) в биологически значимом диапазоне параметров модели, удобно использовать функции «истории» в следующем виде $\varphi_k(\theta) = 0$, $\theta \in [-\tau, 0]$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2)$, $q = 1, 2, 3$ (всюду ниже, если не оговорено особо). В других случаях начальные условия выбирались согласованными с экспериментальными данными.

Дополнительные представления о решении задачи (1.1)–(1.6) при значениях параметров (1.13) дает численное исследование зависимости решения от значений параметров запаздывания. На рисунке 1.7 приведено численное решение, которое получено при нулевых начальных условиях и различных значениях параметра запаздывания τ_1 (при этом $\tau_2 = 70$). Можно видеть, что численное решение при $\tau_1 = 0$ монотонно увеличивается с нулевого значения до стационарного уровня, которое было приведено ранее. При увеличении значения запаздывания τ_1 наблюдаются затухающие колебания компонент решений $y_1(t)$, $y_2(t)$ и $y_3(t)$, которые сходятся к соответствующим стационарным значениям.

Аналогичные численные эксперименты были проведены при варьировании значений параметра $\tau_2 \in [0, 25000]$. Для иллюстрации результатов данной серии расчетов на рисунке 1.8 приведены численные решения задачи (1.1)–(1.6), (1.13), полученные при $0 \leq \tau_2 \leq 1000$. Можно видеть, что при изменении значения τ_2 происходит фазовый сдвиг функции $y_3(t)$ по

временной оси на величину, равную запаздыванию τ_2 . При этом значение τ_2 практически не влияет на характер решения компонент $y_1(t)$, $y_2(t)$ и $y_3(t)$, которые при (1.13) с течением времени выходят на стационарные значения.

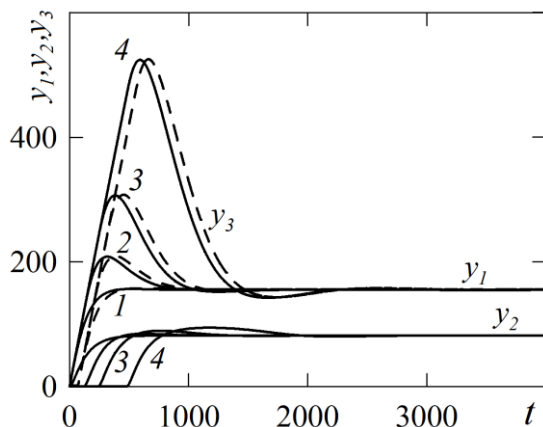


Рисунок 1.7. Изменение численных решений задачи (1.1)–(1.6) во времени в зависимости от значений параметра запаздывания τ_1 : линии 1–4 соответствуют $\tau_1 = 0, 120, 240, 480$. Штриховые линии – y_3 .

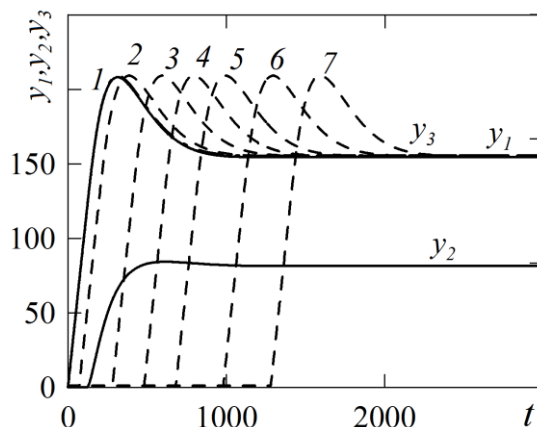


Рисунок 1.8. Изменение численных решений задачи (1.1)–(1.6) во времени в зависимости от τ_2 : линии 1–7 соответствуют $\tau_2 = 0, 70, 280, 480, 680, 980, 1280$. Штриховые линии – y_3 .

Следует отметить, что в [76] для системы (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5), описывающей динамику системы р53–Mdm2, показано, что при достаточно малых значениях k_f или больших k_g увеличение параметра запаздывания может приводить к возникновению периодических решений (бифуркации Андронова–Хопфа). Ниже этот вопрос будет рассмотрен более подробно.

1.3.3. Численный анализ динамики системы р53–Mdm2. Сопоставление с результатами расчетов [71, 77]

В методических целях проведено сопоставление численного решения задачи, полученного с привлечением разработанного алгоритма, с известными результатами расчетов [71, 77]. Выше отмечалось, что в работе [71] система (1.1)–(1.2) представлена как модель динамики р53–Mdm2.

В качестве удачного примера для сравнения, как в [77], принят рассмотренный подробно в [71] вариант возникновения периодических колебаний в системе (1.1)–(1.2) при $\tau_1 = 1200$, $k_f = 12$ (остальные параметры принимали значения из (1.13)). Особенность постановки задачи в [71] заключается в организации численного эксперимента: при $t < 20000$ решение проводилось при значениях параметров (1.13), а при $t = 20000$, когда решение выходило на стационарный режим, вносилось изменение в виде снижения значения k_f в 15 раз относительно (1.13) (то есть полагалось $k_f = 12$), которое авторы интерпретируют как стрессовое воздействие. В [77]

показано, что в рамках именно такого сценария решение, соответствующее $k_f = 12$, не зависит от начальных условий, а то же самое периодическое решение может быть получено в расчете при нулевых начальных условиях, что, до определенной степени, снижает биологическую значимость предложенного в [71] сценария ответа системы p53–Mdm2 на стресс.

В настоящей работе задача в той же постановке, что и в [77], рассматривалась как тестовая для алгоритма и программного кода. На рисунке 1.9 представлены результаты сопоставления настоящих расчетов, которые проводились с использованием метода предиктор-корректор 2-го порядка при $\varphi_k(\theta) = 0$, $\tau_1 = 1200$ и $k_f = 12$, с численным решением [71] и [77], полученными методом Адамса 4-го порядка. Можно видеть, что при $t \geq 25000$ все решения весьма близки друг к другу и описывают периодические колебания уровней белков, происходящие в противофазе (из лабораторных наблюдений [17] известно, что так работает отрицательная обратная связь в системе p53–Mdm2). Таким образом, численные эксперименты демонстрируют хорошую работоспособность алгоритма и программного кода. Можно констатировать также, что данный эксперимент иллюстрирует устойчивость численного решения к изменению начальных условий для системы (1.1)–(1.2).

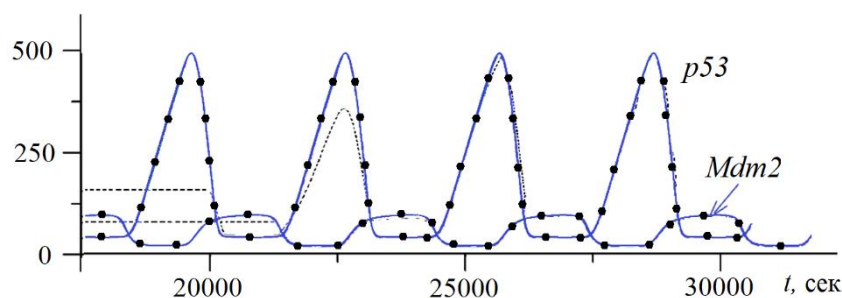


Рисунок 1.9. Сопоставление с численным решением [71, 77] при $\tau_1 = 1200$, $k_f = 12$: сплошные линии – расчет [77] при $\varphi_k(\theta) = 0$; линии, маркированные кругами, – настоящий расчет при $\varphi_k(\theta) = 0$; штриховые линии – расчет [71].

1.4. Разработка упрощенной базовой модели функционирования системы общего вида p53–белок–ингибитор–микроРНК

Цель настоящего раздела состоит в определении параметров и валидации модели общего вида (1.1)–(1.5), а также в том, чтобы на основании численного анализа расчетных и экспериментальных данных дать количественное определение состояний системы p53–ингибитор–микроРНК, характеризующих состояния условной нормы, риска рака или дегенерации. Впервые будет показано, что известная модель динамики системы p53–Mdm2 из работ [71, 75–79] может привлекаться для количественного описания экспериментальных

данных. Будет показано также, что представленные в разделе методических расчетов результаты оценки параметров модели динамики p53–Mdm2, а значит и результаты численного анализа полученных решений, применимы и для количественного описания динамики системы p53–Wip1 (с учетом различий в интерпретации биологических фактов). Особое внимание уделено анализу адекватности принятого подхода к моделированию динамики уровня p53-зависимых микроРНК. Результаты численных экспериментов демонстрируют возможность использования модели как инструмента диагностики дегенеративных заболеваний по микроРНК и оценки эффективности воздействия на микроРНК через активацию p53 в терапевтических целях. Важное место отводится анализу работоспособности генетического алгоритма BGA.

Для краткости на графиках уровни белков и микроРНК (результаты лабораторного измерения и математического моделирования) будут обозначаться их биологическими названиями, написанными курсивом, например, *p53*, *Mdm2*, *miR-34a*.

1.4.1. Численное моделирование динамики системы p53–Mdm2 в раковых клетках под влиянием этопозида. Механизм «бимодального» переключения

Одним из фундаментальных механизмов функционирования системы p53–белок-ингибитор в условиях стресса является так называемый механизм «бимодального» переключения: при относительно слабом стрессовом воздействии уровень p53 остается достаточно низким, близким к базальному (это характерно для нормальных клеток, но еще более выражено в раковых клетках с p53 дикого типа), а при высоком уровне стрессового воздействия система переключается на режим монотонного увеличения уровня p53. Оценка адекватности многих современных математических моделей включает, как правило, проверку способности описывать этот базовый механизм (см., например, [91, 96, 101, 105]).

Известно [189], что легкое повреждение ДНК обычно вызывает умеренное повышение уровня p53 и приводит к временной остановке клеточного цикла, что позволяет восстановить повреждение, в то время как тяжелое и, возможно, непоправимое повреждение ДНК приводит к большому повышению уровня p53 с последующей гибелью клеток. Исследование влияния уровня повреждения ДНК, вызванного, в том числе и химиотерапевтическими препаратами, на динамику p53 представляет интерес для разработки эффективной противораковой терапии. Таким образом, механизм «бимодального» переключения имеет особо важное значение с точки зрения реализации различных стратегий запуска генетических программ уничтожения раковых клеток.

В рамках настоящего исследования проведены численные эксперименты, целью которых является следующее:

1. оценка работоспособности генетического алгоритма BGA,
2. сопоставление решений принятой модели с экспериментальными данными [13], иллюстрирующими «бимодальное» переключение уровня p53,
3. анализ (в рамках принятой модели) динамики системы p53–Mdm2 при слабом повреждении ДНК,
4. сопоставление с решениями системы (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5), полученными в рамках работ [71, 77], моделирующими динамику системы p53–Mdm2.

В экспериментальной работе [13] изучалась динамика p53 при воздействии на раковую клетку (линия U2OS с p53 дикого типа, клетки остеосаркомы человека) этопозидом. Этопозид является известным противоопухолевым химическим препаратом, вызывающим повреждение ДНК и, тем самым, активацию p53-зависимого апоптоза клетки-мишени. Для последующего анализа важное значение имеют следующие сведения, известные из лабораторных исследований [13, 190]: воздействие на клетку этопозидом вызывает ослабление функции Mdm2 как отрицательного регулятора p53, а также ускоряет саморазрушение Mdm2. Результатом такого воздействия является повышение уровня p53.

В [13] выполнен сравнительный анализ динамики p53 и Mdm2 при воздействии на клетку относительно низкой (1 мкмоль/л) и высокой (100 мкмоль/л) дозами этопозида. Интересно при этом, что в обоих случаях данные [13] демонстрируют монотонное увеличение p53, особенно ярко выраженное при высокой дозе этопозида. Следует отметить, что многие лабораторные исследования (см., например, [13, 17, 32, 95, 190]) показали, что при малой дозе воздействующего вещества чаще наблюдается импульсный режим изменения уровня p53, который, однако, характеризуется всего лишь одним или несколькими «всплесками».

Первый этап численных экспериментов посвящен анализу работы стохастического генетического алгоритма BGA. Математическое моделирование функционирования системы белков p53–Mdm2 в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов [13], осуществляется с привлечением модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5). Начальные условия задавались согласованными с экспериментальными данными [13], характерный масштаб времени устанавливался равным $T = 1$ мин. Ввиду отсутствия более конкретных данных об условиях проведения лабораторного эксперимента предполагалось, что уровень этопозида остается постоянным в течение всего эксперимента. Это позволяет свести задачу описания экспериментальных данных [13] к определению значений параметров модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5), т.е. решению обратной коэффициентной задачи. Обратная коэффициентная задача решалась для 8 параметров модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5): $a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, k_f, k_g, \tau_1$.

В ходе методических расчетов численность индивидуумов в каждом поколении BGA поочередно полагалась равной $z = 200, 400, 800, 1600$, а количество поколений варьировалось в диапазоне $20 \leq N_{gen} \leq 60$. При выборе начального диапазона изменения значений каждого параметра (множество интервалов I_0) учитывались данные об условиях проведения экспериментов [13], а также то, что представленные ранее значения параметров (1.13) уже приняты (в рамках математической модели) как соответствующие базальному состоянию для системы p53–Mdm2. Для каждого варианта расчетов проводился анализ статистических выборок, состоящих из результатов от 40 до 750 равноценных запусков стохастического алгоритма BGA. В таблице 1.1 представлен набор параметров Opt , который принят в качестве оптимального для описания результатов лабораторного эксперимента [13] при воздействии достаточно большой дозы этопозида. Здесь же для каждого параметра приведены медианные значения Med (нижние индексы указывают на значение z в BGA) и квартили Q_1 и Q_3 (объемы исследуемых выборок равны от 40 до 60).

Таблица 1.1 – Начальные диапазоны I_0 и статистика решений обратной коэффициентной задачи для модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5), применяемой к описанию экспериментальных данных [13]. Opt – оптимальные значения; Med_q – медианные значения параметров на выборках объемом q элементов ($q=200, 400, 800, 1600$); $\pm 5\%$ – внесенный уровень «шума» в экспериментальных данных; $Q_1; Q_3$ – квартили, ограничивающие центральные 50% элементов всей выборки.

	a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	k_f	k_g	τ_1
Этопозид 100 мкмоль/л								
I_0	[0.5; 2]	$[10^{-3}; 10^{-1}]$	$[10^{-5}; 10^{-3}]$	[0.5; 2]	$[10^{-3}; 0.3]$	[150; 350]	[20; 52]	[100; 300]
Opt	1.36	$3.5 \cdot 10^{-2}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	1.1	$6 \cdot 10^{-2}$	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
$[Q_1; Q_3]$	[1.28; 1.48]	$[1.82 \cdot 10^{-2}; 3.54 \cdot 10^{-2}]$	$[4.14 \cdot 10^{-4}; 6.96 \cdot 10^{-4}]$	[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]
$Med_{200} (+5\%)$	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
$[Q_1; Q_3] (+5\%)$	[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]
$Med_{200} (-5\%)$	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
$[Q_1; Q_3] (-5\%)$	[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

В дополнение к данным таблицы 1.1 статистические выборки были расширены до 750 элементов (результатов запусков BGA). Проведенная с использованием критерия согласия Колмогорова проверка показала, что выборочная плотность вероятности для параметра a_1 достаточно близка к логнормальному распределению, для параметров a_2 , b_1 и τ_1 – к вейбулловскому распределению, для параметра b_2 – к гамбеловскому распределению, для

параметров a_3 , k_f , k_g – к нормальному распределению. На рисунке 1.10 приведены для примера плотности распределения вероятностей $f(x)$ для выборок параметров a_2 , k_g , τ_1 и графики плотностей теоретических распределений. Отметим, что в результате статистического анализа получено, что медианные значения при увеличении размера выборки с 40 до 750 меняются не более чем на 4%. Статистический анализ выполнялся с использованием инструментов пакета программ MATLAB (описание и примеры статистических функций MATLAB приведены в [191]).

График решения прямой задачи (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5) при оптимальных значениях параметров Opt , а также экспериментальные данные [13] представлены на рисунке 1.11а. Видно, что численные решения достаточно хорошо согласуются с лабораторными измерениями динамики белков p53 и Mdm2 в раковых клетках при воздействии относительно высокой дозы этопозида (100 мкмоль/л).

Проведен анализ устойчивости решения обратной задачи к «шуму» в экспериментальных данных [13], который моделировался 5-процентным изменением каждого измеренного в экспериментах значения в сторону роста и убывания. Его результаты также показаны в таблице 1.1. Полученные данные указывают на достаточно слабую зависимость от выбора значений параметров BGA и малых изменений экспериментальных данных.

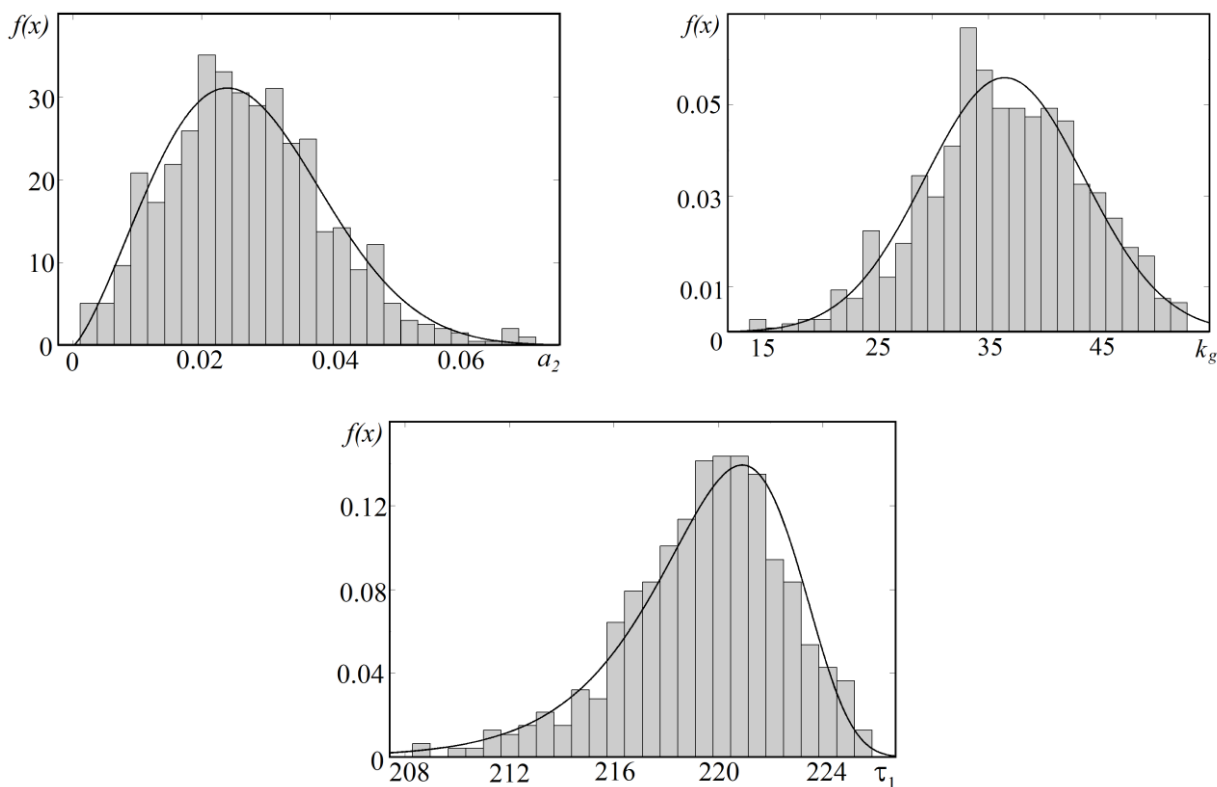


Рисунок 1.10. Статистика решений обратной коэффициентной задачи для параметров a_2 , k_g и τ_1 , *линии* – близкие (по критерию Колмогорова) теоретические распределения.

Таким образом, с использованием алгоритма BGA получен оптимальный набор значений параметров Opt , при котором компоненты численного решения модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5) (прямой задачи) согласуются с лабораторными измерениями динамики системы p53–Mdm2 [13]. Кроме того, как будет показано ниже, значения параметров Opt соответствуют нашим оценкам параметров модели и представлениям о состояниях системы p53–Mdm2. Расчеты показали, что оптимальное число поколений составляет $N_{gen} = 40$, анализ которых гарантирует с достаточно высокой степенью точности сходимость процесса минимизации функционала, а также сходимость последовательности значений каждого из параметров модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5). Кроме того, по результатам этих экспериментов в дальнейшем, если это не оговорено особо, полагалось $z = 400$.

Целью второго этапа численных экспериментов является анализ способности модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5) воспроизвести механизм «бимодального» переключения, т.е. переход от (условно) нормального функционирования системы с весьма низким уровнем p53 на режим резкого повышения уровня p53 в ответ на сильное повреждение ДНК, наблюдаемое в экспериментах [13]. Для этого решались две серии обратных коэффициентных задач, направленных на описание лабораторных измерений [13] при воздействии двух различных доз этопозида: 1 мкмоль/л и 100 мкмоль/л.

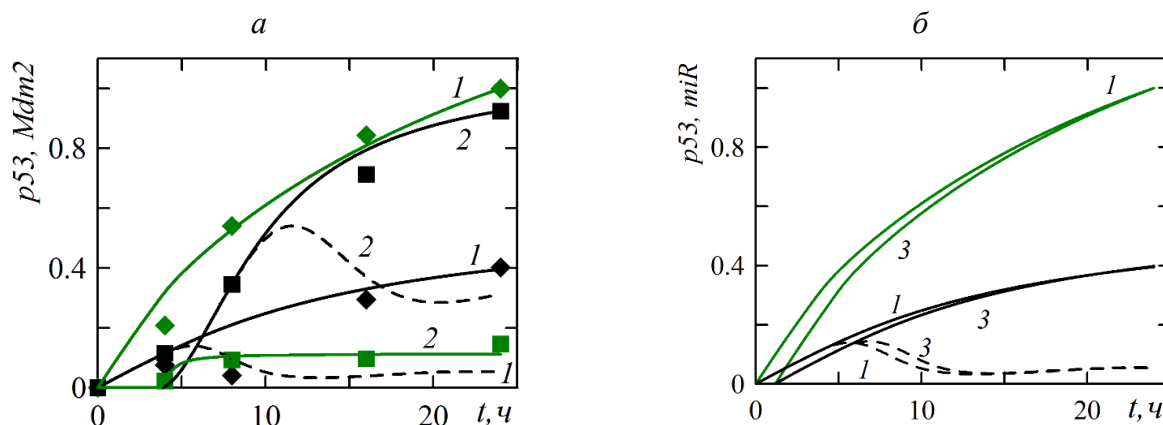


Рисунок 1.11. Относительное изменение уровней белков p53 (линии 1 – модель, ромбы – экспериментальные данные [13]), Mdm2 (линии 2 – модель, квадраты – экспериментальные данные [13]) и микроРНК (линии 3) под воздействием этопозида: черные линии и маркеры – доза 1 мкмоль/л, зеленые – 100 мкмоль/л.

На рисунке 1.11а представлены данные об изменении уровней p53 и Mdm2 с течением времени, полученные в расчетах и в экспериментах [13], а в таблице 1.2 – соответствующие оптимальные наборы значений параметров ($Opt = 100$ мкмоль/л, $Opt_{mon} = 1$ мкмоль/л). Видно, что хотя уровень p53 был повышенным в обеих сериях расчетов, но при низкой дозе препарата

он был существенно ниже, чем при высокой дозе, что согласуется с наблюдениями за живыми клетками в [13]. При этом уровень Mdm2 возрастал под воздействием 1 мкмоль/л этопозида и был существенно снижен при высокой дозе (100 мкмоль/л).

Отметим, что результаты численного анализа решений модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5) согласуются с выводами лабораторных исследований о том, что усиление деградации Mdm2 (в рамках модели за счет увеличения значения параметра b_2) при обработке клеток высокой дозой этопозида является одним из основных механизмов, отвечающих за ослабление регуляции p53 со стороны Mdm2. Под воздействием высокой дозы этопозида происходит ослабление Mdm2-зависимой регуляции p53 и усиление саморазрушения Mdm2. При этом формируется двойной отрицательный контроль Mdm2, который не скомпенсирован положительным влиянием p53 на Mdm2 (в рамках модели параметр скорости p53-зависимой генерации Mdm2 – b_1 – не изменился), поэтому Mdm2 сохраняется на достаточно низком уровне. В этом случае отсутствие «сдерживания» со стороны Mdm2 способно запустить монотонное увеличение p53 в клетках U2OS в ответ на высокий уровень препарата. Таким образом, получено согласование результатов расчетов и лабораторных исследований в том, что ослабление регуляторной функции Mdm2 при сильном повреждении ДНК может привести к монотонному накоплению p53 до весьма высокого уровня, что отличается от динамики p53 в случае низкого повреждении ДНК.

Таблица 1.2 – Оптимальные значения параметров модели (1.1)–(1.2), (1.4)–(1.5) для описания экспериментальных данных [13], полученные в ходе решения обратной коэффициентной задачи: Opt – 100 мкмоль/л, Opt_{mon} – монотонный режим при 1 мкмоль/л, Opt_{puls} – импульсный режим при 1 мкмоль/л.

	a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	k_f	k_g	τ_1
Этопозид 100 мкмоль/л								
<i>Opt</i>	1.36	$1.83 \cdot 10^{-2}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	1.1	$3.20 \cdot 10^{-2}$	271.34	33.76	220
Этопозид 1 мкмоль/л								
<i>Opt_{mon}</i>	0.49	$2.2 \cdot 10^{-3}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	1.1	$5 \cdot 10^{-3}$	271.34	130	220
<i>Opt_{puls}</i>	0.49	$7 \cdot 10^{-2}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	1.1	$5 \cdot 10^{-3}$	271.34	130	220

Как уже отмечалось ранее, в случае слабого повреждения ДНК (например, при воздействии относительно малой дозы этопозида) возможно два режима динамики p53 [13]: умеренное монотонное увеличение уровня и импульсный режим с одним или несколькими «всплесками». Поэтому представляет интерес провести в рамках принятой математической модели анализ реакции системы на слабое повреждение ДНК. В экспериментальной работе [13] представленные лабораторные измерения уровня белков p53 и Mdm2 после обработки клеток

низкой дозой этопозиды (1 мкмоль/л) соответствуют режиму с монотонным ростом уровня p53. Анализ значений параметров Opt_{mon} , полученных в ходе решения обратной задачи, а также численных решений прямых задач позволил определить набор значений параметров Opt_{puls} (представлен в таблице 1.2), который соответствует импульсному режиму динамики p53 при воздействии малой (1 мкмоль/л) дозы этопозиды. График решения прямой задачи при Opt_{puls} продемонстрирован на рисунке 1.11а. Видно, что при Opt_{puls} после небольшого пика уровень p53 может сохраняться на достаточно низком уровне (пунктирные линии на рисунке 1.11а), а при Opt_{mon} решение описывает режим монотонного увеличения уровня p53 (сплошные черные линии на рисунке 1.11а). Отметим, что наборы Opt_{mon} и Opt_{puls} отличаются только значениями параметра a_2 (остальные значения параметров модели совпадают), который описывает скорость деградации p53 под влиянием Mdm2. Таким образом, проведенный численный анализ позволил выдвинуть гипотезу о вероятной причине возникновения двух режимов динамики p53 при слабом повреждении ДНК: в клетках с более сильной регуляцией p53 со стороны Mdm2 может наблюдаться небольшой «всплеск» уровня p53, после которого p53 выходит на достаточно низкий уровень, а в случае более слабой регуляции возможно умеренное монотонное увеличение уровня p53.

Следует отметить следующее: хотя в экспериментальной работе нет данных об изменении уровня p53-зависимых микроРНК, расчеты модели (1.1)–(1.6) показали, что микроРНК изменяется так же, как и p53 (в этом случае для параметров, описывающих динамику уровня микроРНК, как и при проведении методических расчетов, принимались значения (1.13)): при моделировании сильного стрессового воздействия уровень микроРНК монотонно возрастает, при моделировании слабого стресса наблюдается слабый монотонный рост или снижение уровня микроРНК (см. рисунок 1.11б).

Выше отмечалось, что все расчеты проводятся с использованием обезразмеренной системы уравнений, причем во всех численных экспериментах обезразмеривание компонент вектора решения проводится с использованием одних и тех же масштабов, согласованных с принятыми при обработке экспериментальных данных [32]. Однако сопоставление с экспериментальными данными, как правило, требует дополнительной нормировки (вычисления относительных величин по определенному правилу), согласованной с принятой в каждом лабораторном эксперименте. В частности, в работе [13] данные нормировались так: уровень каждого белка нормировался на максимальное значение этого же белка, полученное в двух сериях лабораторного эксперимента (при обработке клеток высокой и низкой дозой этопозиды). Проанализируем теперь полученные данные в исходных безразмерных величинах, отказавшись от нормировки.

В работе [77] в рамках модели (1.1)–(1.2) при поочередном варьировании в достаточно широком диапазоне значений параметров относительно (1.13) получено множество численных решений, которые соответствуют ряду наиболее характерных состояний системы p53–Mdm2: 1) весьма высокий уровень p53 при достаточно низком уровне белка Mdm2; 2) существенное накопление Mdm2 при низком уровне p53; 3) затухающие колебания уровней p53 и Mdm2, выходящие на стационарные значения; 4) периодические колебания уровней белков. При этом авторами [77] было получено, что при варьировании одного из параметров a_1 , a_3 , k_f и a_2 стационарные точки численного решения формируют возрастающую кривую, которая весьма близка к точкам кривой аналитического решения $y_2^{(1)}(y_1)$ (1.14), соответствующего базальным значениям параметров (см. рисунок 1.12). Стационарные точки численных решений, вычисленных при поочередном варьировании параметров b_1 , b_2 , k_g , образуют кривую, которая практически совпадает с кривой $y_2^{(2)}(y_1)$ (см. рисунок 1.12).

Отметим, что данные в [77] не имели отношения к конкретному лабораторному эксперименту, а базальное и другие состояния были приняты во всех предыдущих исследованиях, включая [71, 77], лишь на основе качественного анализа и подходящего выбора значений параметров модели (1.1)–(1.2). Тем интереснее сопоставить их с полученными при описании экспериментов [13], в рамках которого все полученные биологические состояния системы p53–Mdm2 ясны. Поэтому предполагается, что такое сопоставление результатов поможет оценить адекватность принятого в рамках принятой модели базального и других состояний.

На рисунке 1.12 приведены характерные решения модели (1.1)–(1.2), соответствующие уровню белков в момент последнего лабораторного измерения в [13] (т.е. эти значения не являются стационарным решением задачи, а только отражают одно из фазовых состояний системы), а также неподвижные (стационарные) предельные точки и характерные предельные циклы решений модели (1.1)–(1.2) при поочередном варьировании параметров из набора (1.13). Из анализа [13] известно, что характерное значение решения при Opt соответствует типичному состоянию, наблюдаемому при запуске программы клеточной смерти из-за высокого уровня повреждения (при высоком уровне активации p53 и относительно низком уровне Mdm2). Таким образом, окрестность решения системы (1.1)–(1.2), соответствующего Opt , можно рассматривать как характерные состояния D (от: «Degeneration») системы p53–Mdm2 с высоким риском гибели клетки. Окрестность решений системы (1.1)–(1.2), соответствующего Opt_{mon} и Opt_{puls} , можно условно рассматривать как характерные состояния, весьма близкие к норме (состояние N от: «Normal»), поскольку уровень стрессового воздействия в [13] был весьма низким.

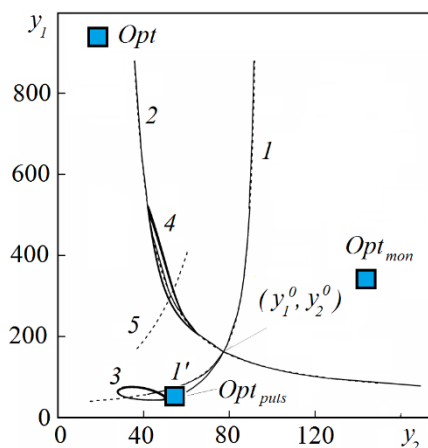


Рисунок. 1.12. Неподвижные точки и предельные циклы решений системы (1.1)–(1.2): *сплошные линии* соответствуют варьированию параметров a_1 , a_2 , a_3 (линия 1), k_f (линия 1'), b_1 , b_2 , k_g (линия 2), $k_f = 0.02k_f^0$ при $\tau_1 = 120$ (линия 3), $k_g = 7.3k_g^0$ при $\tau_1 = 25000$ (линия 4); *пунктирные линии* – аналитическое стационарное решение при базальных параметрах. *Маркеры* – характерные значения решений системы (1.1)–(1.2) при Opt , Opt_{mon} или Opt_{puls} .

Дополнительно рассмотрены статистические распределения уровней p53 и Mdm2 при варьировании значений параметров относительно наборов Opt , Opt_{mon} и Opt_{puls} . Случайные изменения каждого параметра из наборов Opt , Opt_{mon} или Opt_{puls} производились в 10–50-процентных интервалах. Анализ статистических выборок, составленных из результатов 9000 расчетов прямой задачи (для каждого набора параметров), указывает на тенденцию к выделению трех компактных кластеров в окрестности каждого из отмеченных состояний системы p53–Mdm2. При этом ярко выраженными оказались два характерных состояния биологической системы p53–Mdm2, наблюдаемых также в эксперименте [13] в зависимости от дозы вещества: состояния с относительно низкими уровнями белков p53 и Mdm2 при слабом воздействии (в [13] доза этопозида – 1 мкмоль/л) и состояния с высоким уровнем p53 и сниженным уровне Mdm2 при сильном воздействии (в [13] – 100 мкмоль/л этопозида).

Таким образом, проведена оценка работоспособности генетического алгоритма BGA и выполнены методические расчеты, на основе которых выбраны значения параметров алгоритма, и получена достаточно слабая зависимость результатов работы BGA от малых изменений экспериментальных данных. В рамках модели (1.1)–(1.2) проиллюстрирован механизм «бимодельного» переключения сценария нормального функционирования системы с весьма низким уровнем p53 на режим резкого повышения уровня p53 в ответ на сильное повреждение ДНК [13]. Результаты численного анализа подтверждают точку зрения о том, что модель (1.1)–(1.2) является моделью функционирования системы p53–Mdm2, а набор

параметров (1.13) может быть принят как базальный, т.е. описывающий состояние условной нормы в системе p53–ингибитор, где в качестве ингибитора рассматривается белок Mdm2.

1.4.2. Численный анализ состояний системы p53–Wip1 в раковых клетках при стрессовом воздействии, вызванном гамма-облучением

Для оценки адекватности и анализа области применимости модели (1.1)–(1.6) как инструмента исследования функционирования обратной связи p53–ингибитор проведено сопоставление численных решений с лабораторными данными [32]. Группой авторов E. Batchelor et al. [32] из Гарвардской медицинской школы проведены достаточно уникальные по полноте измерения уровня p53 и его белка-ингибитора Wip1 в раковых клетках при стрессовом воздействии, вызванном гамма-облучением [32]. Облучение, которое, как известно, приводит к повреждению ДНК, выполнялось с важной целью – вызвать клеточный ответ в виде активации генетических программ, отвечающих за ликвидацию повреждения при сохранении клетки либо гибель самой клетки. Последнее особенно важно с точки зрения проблемы уничтожения раковых клеток.

Математическое моделирование проводилось в предположении, что в модели (1.1)–(1.6) u_2 – уровень белка Wip1, который является отрицательным регулятором активности p53. В качестве первого приближения мы предполагаем, что значения (1.13) могут быть использованы при описании функционирования системы p53–Wip1. Известно [11], что повреждение ДНК облучением вызывает повышение уровня активного p53 за счет снижения регуляторной функции белка-ингибитора Wip1. В рамках принятой модели этот механизм воздействия гамма-излучением моделировался за счет изменения значения параметра a_2 , который описывает скорость деградации p53 за счет влияния Wip1. Для моделирования функционирования системы p53–Wip1 в раковых клетках с повышенным уровнем Wip1, который сдерживает активацию p53, одновременно с a_2 изменяли значения параметра b_2 , описывающего скорость деградации Wip1. На рисунке 1.13 представлены полученные стационарные состояния системы p53–Wip1 (отмечены зелеными маркерами) при изменении $8 \cdot 10^{-3} \leq a_2 \leq 5 \cdot 10^{-1}$ и $10^{-3} \leq b_2 \leq 5 \cdot 10^{-2}$. Здесь же представлены результаты поочередного варьирования параметров a_1 , a_2 , a_3 , b_1 , b_2 , k_f , k_g относительно (1.13) (красные маркеры и линии на рисунке 1.13), а также результаты лабораторных экспериментов [32] (черные маркеры на рисунке 1.13). Полученные в лабораторных экспериментах данные демонстрируют широкий диапазон изменения фазовых состояний системы p53–Wip1. Пунктирными линиями на рисунке 1.13 выделены средние значения уровней белков p53 и Wip1, отмеченные в экспериментальной работе [32]. Эти линии в дальнейшем будут использованы для определения количественных границ областей

состояний системы p53–Wip1 с относительно низким уровнем p53 и Wip1, которое наблюдается в случае нормального функционирования системы (как и прежде, обозначим данное состояние N от: «Normal»), состояний с достаточно высоким уровнем p53 при низком уровне Wip1 (состояние D от: «Degeneration»), при котором отмечается повышение риска массовой клеточной смерти, и наоборот, область состояний системы p53–Wip1 с весьма низким уровнем p53 при достаточно высоком уровне Wip1 (состояние C от: «Cancer»), которое исследователи связывают с повышением риска развития рака.

Интересно, что среди наблюдаемых в эксперименте [32] состояний системы p53–ингибитор практически не оказалось таких, при которых одновременно наблюдались бы высокие уровни p53 и белка-ингибитора (Wip1). На рисунке 1.13 видно, что численные решения достаточно хорошо согласуются с экспериментальными данными [32] и описывают перечисленные выше характерные состояния системы p53–Wip1.

На фазовой плоскости (p53, Wip1) видно (см. рисунок 1.13), что неподвижные точки решений модели (1.1)–(1.6), как и экспериментальные данные, иллюстрируют зависимость, близкую к гиперболической – $p53 \sim 1/Wip1$. При этом полученные в расчетах фазовые состояния системы p53–Wip1 характеризуются тем же диапазоном величин, что и экспериментальные данные [32].

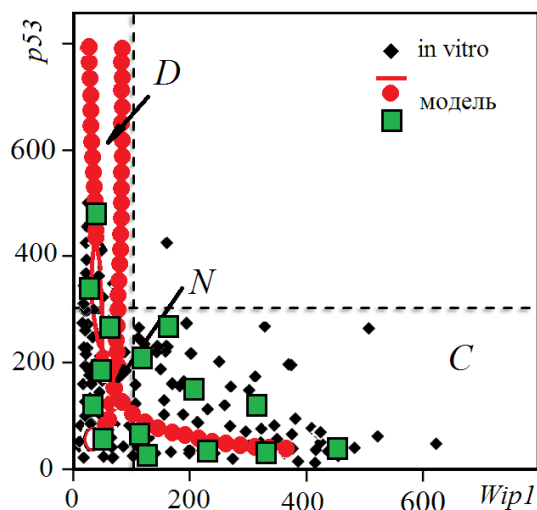


Рисунок 1.13. Сопоставление численных решений модели (1.1)–(1.6) с экспериментальными данными о состоянии системы p53–Wip1 [32]. Красные маркеры – расчеты при поочередном варьировании параметров относительно (1.13), зеленые маркеры – при одновременном варьировании значений параметров a_2 и b_2 (моделирование функционирования системы p53–Wip1 в раковых клетках после облучения), черные маркеры – экспериментальные данные [32].

Важно отметить, что полученные данные, включая диапазоны изменения значений уровня p53 в рамках принятой модели и иллюстрацию «бимодального» переключения уровня p53 нормального функционирования системы с весьма низким уровнем p53 на режим активации

p53 в ответ на сильное повреждение ДНК, согласуются также с результатами лабораторных экспериментов [148]. В [148] в клетках, обработанных низкой дозой генотоксического препарата доксорубин, получен достаточно низкий уровень p53, а в клетках после воздействия высокой дозой – монотонный рост уровня p53 и высокая вероятность запуска апоптоза.

1.4.3. Численное моделирование динамики системы p53–Sirt1–miR-34a при фиброзе печени у крыс

Представляет интерес рассмотреть вопрос о применении модели (1.1)–(1.6) для описания функционирования еще одного ингибитора p53, а именно Sirt1, и характерного состояния системы p53–Sirt1. Для этого с использованием лабораторных данных [41] и модели (1.1)–(1.6) выполнено численное моделирование динамики системы p53–Sirt1–miR-34a у крыс при фиброзе печени, который характеризуется массовым апоптозом гепатоцитов (основных функциональных клеток печени). Исходя из гипотезы, что сегмент p53–Sirt1–miR-34a сигнального пути p53 является одним из регуляторов апоптоза гепатоцитов, в биомедицинских исследованиях [41] именно этот сегмент изучается как потенциальная терапевтическая мишень при фиброзе. В этом лабораторном исследовании фиброз печени крыс инициировали внутрибрюшинным введением препарата *CCL4* (0.2 мл/кг), который вызывает оксидативный стресс и, как следствие, апоптоз подвергнутых воздействию гепатоцитов. При этом отмечается, что белок Sirt1 ингибирует p53 посредством его деацетилирования, однако подавление Sirt1 может способствовать усилению ацетилирования p53, то есть увеличению уровня активной формы белка p53. В [41] приведены данные, указывающие на то, что после введения препарата *CCL4* наблюдается рост ацетилированной формы p53 и сверхактивация miR-34a.

В данной серии расчетов принимается упрощенная биологическая модель, в рамках которой p53 способствует экспрессии miR-34a, но miR-34a не влияет на Sirt1. Для описания динамики сигнального пути p53–Sirt1–miR-34a использовалась модель (1.1)–(1.5), в которой полагаем, что y_1 – уровень ацетилированной формы белка p53, y_2 – уровень белка Sirt1, y_3 – уровень miR-34a. Начальные условия (1.6) задаются согласованными с данными [41]. При обезразмеривании уравнений модели характерный масштаб времени полагался равным $T = 1$ час, что согласуется с условиями лабораторного исследования [41]. Для решения обратной коэффициентной задачи привлекался генетический алгоритм BGA, а оптимальный набор значений параметров выбирался на основе анализа результатов выборки, состоящей из 40 равноценных запусков BGA (принцип отбора оптимальных значений тот же, что и в п. 1.4.1): $a_1 = 4.5$, $a_2 = 1.8 \cdot 10^{-2}$, $a_3 = 4.7 \cdot 10^{-4}$, $b_1 = 1$, $b_2 = 1.6 \cdot 10^{-2}$, $c_1 = 35$, $c_2 = 3.8$, $c_3 = 1.25$,

$k_f = 200$, $k_g = 60$, $\tau_1 = 270$, $\tau_2 = 50$. Следует отметить, что, как и в п. 1.4.1, отклонения оптимальных значений параметров от значений (1.13), соответствующих условной норме, не противоречат характеру стрессового воздействия и общему смыслу лабораторного эксперимента.

На рисунке 1.14 показано, что полученные численные решения согласуются с лабораторными измерениями уровня p53, Sirt1 и miR-34a [41] (здесь численные данные дополнительно подвергались той же обработке, что и лабораторные данные [41] – они нормировались на характерные значения, которые соответствуют уровням белков и miR-34a в состоянии условной нормы в тот же момент времени, когда проводилось последнее лабораторное измерение в [41]). Как и в экспериментальной работе [41], в рамках модели (1.1)–(1.6) наблюдается рост уровней p53 и miR-34a при достаточно низком уровне Sirt1. Отметим также, что при оптимальном наборе значений параметров характерные значения численного решения до указанной дополнительной обработки составляют $y_1 \approx 4628.52$ и $y_2 \approx 60.2$. Это находится в полном согласии с описанными в п. 1.4.1–1.4.2 (см. рис. 1.12 и 1.13) тенденциями изменения уровней p53 и его белков-ингибиторов в состоянии D системы p53–белок-ингибитор, т.е. в условиях массовой гибели клеток.

Более подробный анализ лабораторных данных [41] и результаты моделирования с привлечением более полных математических моделей, в которых учитывается отрицательное воздействие miR-34a на Sirt1, будут представлены в параграфе 4.5.

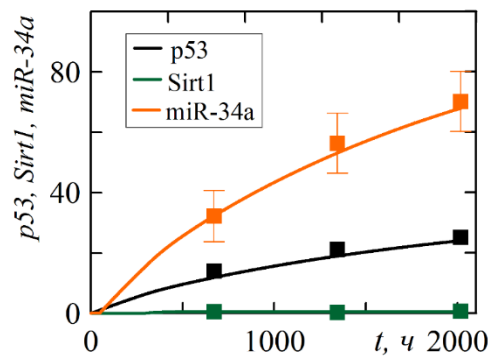


Рисунок 1.14. Динамика системы p53–Sirt1–miR-34a в гепатоцитах крыс после введения препарата *CCL4* (инициация фиброза печени): *маркеры* – экспериментальные данные [41], *сплошные линии* – модель (1.1)–(1.6).

Таким образом, в разделах 1.4.1–1.4.3 выполнено численное моделирование динамики систем p52–Mdm2, p53–Wip1 и p53–Sirt1–miR-34a в условиях, реализованных в трех разных биологических процессах и независимых лабораторных экспериментах [13, 32, 41]. Результаты моделирования показывают, что а) минимальная модель (1.1)–(1.5) дает адекватное описание

динамики этих систем, б) соответствующие наборы положительных значений параметров располагаются в окрестности набора значений (1.13), что обеспечивает достаточную согласованность результатов моделирования характерных состояний p53, Mdm2, Wip1 и Sirt1 в рамках принятой модели и их ясный медико-биологический смысл. Это позволяет в дальнейшем существенно расширить область применимости предложенной в [71] модели динамики системы онкомаркеров p53–Mdm2, предлагая ее в качестве новой базовой модели, которая в рамках системно-биологического подхода описывает функционирование петли отрицательной обратной связи в системе общего вида p53–белок-ингибитор.

1.4.4. Определение характерных состояний биологической системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК

Вопрос о выборе значений параметров, соответствующих нормальному (или базальному) состоянию организма, имеет большое значение для дальнейшего исследования разработанной математической модели функционирования системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК и особенно для ее применения. Базальный набор значений параметров и соответствующие ему характерные значения компонент вектора решения задачи позволяют не только описать в рамках принятой модели состояние системы в условно здоровой клетке, ткани или органе, но и дают «точку отсчета» при исследовании основных закономерностей функционирования биомаркеров в важных для клинической практики состояниях. Последнее связано, прежде всего, со свойствами рассматриваемых участников системы p53 как биомаркеров дегенеративных заболеваний, которые, как предполагается, способны быть количественными индикаторами состояний нормы и патологических процессов, позволяющими также оценить результат терапевтического воздействия.

Далее будут изложены основные соображения, позволяющие определить конкретные значения параметров в системе (1.1)–(1.5), соответствующие базальному состоянию моделируемой биологической системы общего вида. Хорошо известно [9], что в норме, т.е. при отсутствии повреждения ДНК, для p53 и его белков-ингибиторов дикого типа (т.е. без мутаций) характерен достаточно низкий уровень, однако конкретные значения зависят от методологии проведения конкретных лабораторных измерений. Так, с использованием экспериментальных данных [32] для p53 в качестве условной нормы могут быть приняты обезразмеренные значения из интервала [0, 300 у.е.], а для Wip1 – из интервала [0, 100 у.е.] (здесь и далее «у.е.» – безразмерные условные единицы, принятые в конкретном эксперименте). Авторы [32] отмечают, что при выходе за указанные границы можно говорить об уровне белков выше нормальных значений. В экспериментальной работе [148] приведены данные, указывающие на

то, что в условно здоровых клетках уровень p53 изменялся в интервале [0, 300 у.е.]. Интересно, что, по-видимому, независимо от этого в модели [71] базальное состояние системы p53–Mdm2 определяется стационарными значениями 155.6 у.е. – для уровня p53 и 81.1 у.е. – для уровня Mdm2. Таким образом, учитывая принятый при обезразмеривании системы (1.1)–(1.5) подход к выбору характерных масштабов, при определении базального состояния системы p53–белок-ингибитор и выборе базальных значений параметров уравнений (1.1) и (1.2) удобно использовать результаты численного моделирования [71], а также результаты экспериментальной работы [32].

Отметим, что для количественной оценки базального состояния p53-зависимых микроРНК используется несколько иной подход. При этом определяющим является следующее обстоятельство: анализ результатов известных лабораторных экспериментов (см., например, [48]) указывает на то, что при нормальном функционировании уровень микроРНК изменяется, как правило, пропорционально уровню p53. Поскольку в [13, 32] отсутствуют данные о микроРНК, то для определения параметров уравнения динамики микроРНК (1.3) опирались на лабораторные данные о семействе микроРНК miR-34 [48], которое считается одним из наиболее изученных. Известно, что семейство микроРНК miR-34 с некоторой степенью достоверности может быть отнесено к классу микроРНК с прямой положительной зависимостью от p53, как это принято в относительно ранних лабораторных исследованиях (см., например, [192]). В работе [48] из исследования функциональных проб дрожжевых культур следует, что в норме miR-34a активируется в той же степени, что и белок p53 дикого типа. Поэтому для описания данного лабораторного эксперимента было проведено моделирование p53-зависимой активации микроРНК, вызванной за счет увеличения параметра скорости генерации p53 (при $a_1 = 11a_1^0$). Отметим, что состояние до активации моделировалось при (1.17). Анализ расчетов показал, что при $c_1^0 = c_2^0 = c_3^0 = 1$, $a_1 = 11a_1^0$ относительное изменение уровней p53 и микроРНК, полученное в рамках модели (1.1)–(1.6), согласуется с экспериментальными данными. Экспериментальные и расчетные данные относительного изменения уровней p53 и микроРНК в норме, наблюдаемого при активации p53 дикого типа, представлены на рисунке 1.15 в виде фолд-изменения: $fold = (y_{fin} - y_0)/y_0$, где y_0 и y_{fin} – начальное (до активации) и конечное (после активации) значения уровней p53 и микроРНК. Таким образом, набор базальных значений (обезразмеренных) параметров модели (1.1)–(1.6) определяется следующими значениями (всюду ниже верхний индекс 0 указывает на то, что данное значения параметра является базальным):

$$a_1 = a_1^0 = 1, b_1 = b_1^0 = 1, c_1 = c_1^0 = 1, \quad (1.17)$$

$$a_2 = a_2^0 = 3 \cdot 10^{-2}, b_2 = b_2^0 = 10^{-2}, c_2 = c_2^0 = 1,$$

$$a_3 = a_3^0 = 10^{-4}, c_3 = c_3^0 = 1, k_f = k_f^0 = 180, k_g = k_g^0 = 28.$$

Выбор значений параметров запаздывания в дальнейшем будет определяться поставленной задачей: в методических расчетах они варьировались в достаточно широком диапазоне значений $[0, 25000]$, а при описании лабораторных данных согласовывались с наблюдениями.

Проведенные в разделах 1.4.1 и 1.4.2 численные эксперименты показали, что обезразмеренные значения параметров (1.17) и соответствующие им обезразмеренные стационарные решения модели (1.1)–(1.5) могут рассматриваться как достаточно универсальные, дающие количественное представление о состоянии условной нормы (состояние N) сразу двух конкретных систем – p53–Mdm2 и p53–Wip1. А при существенном отклонении от данных значений (1.17) решения системы (1.1)–(1.5) могут описывать характерное состояние угрозы рака (состояние C), которое представлено, в частности, в работе [32] для системы p53–Wip1, и состояние массовой гибели клеток (состояние D), приводящей к патологической дегенерации органов (примеры такого состояния для систем p53–Mdm2 и p53–Wip1 представлены в работах [13] и [32] соответственно).

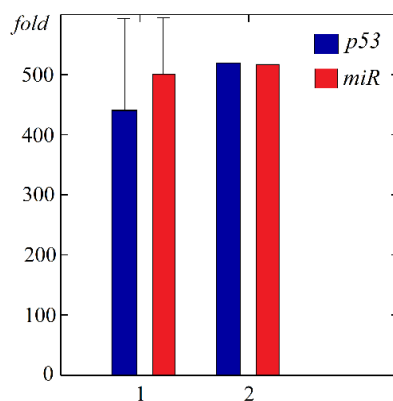


Рисунок 1.15. Фолд-изменение уровней p53 и микроРНК при активации p53 дикого типа: 1 – экспериментальные данные [48], 2 – численное решение при $a_1 = 11a_1^0$.

Большинство лабораторных экспериментов указывают на то, что изменение состояния p53 приводит к согласованному с ним изменению состояния микроРНК. Решения модели (1.1)–(1.5), которые соответствуют характерным состояниям N , C , D и R , изображены на рисунке 1.16а (зависимость уровня p53 и микроРНК от времени) и рисунке 1.16б (фазовый портрет решений). Отметим, что состояние R (от «Response») описывает колебательные режимы

функционирования системы, которые наблюдаются в лабораторных экспериментах, в ответ на стрессовое воздействие, ведущее к низкому уровню повреждения ДНК.

Видно (см. рисунки 1.16а и 1.16б), что в состоянии C уровень микроРНК, как и р53, снижается относительно нормы (базальное состояние при (1.17)) и, наоборот, возрастает в состоянии D сверхактивации р53. Периодические колебания микроРНК возникают вслед за их запуском в системе р53–белок-ингибитор в ответ на укрепление (состояние R) связи р53 и его белка-ингибитора. Таким образом, в рамках принятой математической модели получено, что в характерных состояниях при нормальном функционировании микроРНК (значения параметров уравнения (1.3) равны (1.17)) тип решения для динамики микроРНК совпадает с решением для р53. При этом известно, что белок р53 с достаточно высокой степенью достоверности может быть использован в качестве количественного индикатора (биомаркера) состояния нормы и различных патологий при дегенеративных заболеваниях. Согласованность изменений уровней р53 и микроРНК свидетельствует о том, что при диагностике дегенеративных заболеваний измерение уровня р53 можно заменить на измерение уровня микроРНК, которые обладают большей доступностью использования в клинической практике, и поэтому являются более предпочтительными биомаркерами. Полученное в рамках принятой модели описание данного свойства (см. рисунки 1.16а и 1.16б) указывает на то, что модель (1.1)–(1.6) может рассматриваться в качестве эффективного инструмента исследования подобных состояний.

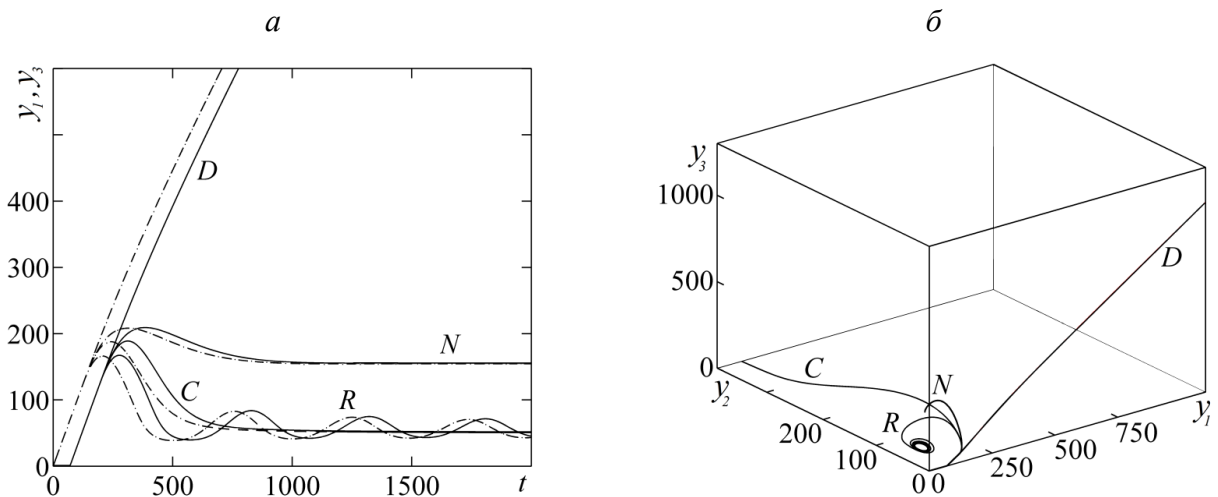


Рисунок 1.16. Совместная динамика р53 и микроРНК в характерных медико-биологических ситуациях: а) *штрихпунктирные линии* – $y_1(t)$, *сплошные линии* – $y_3(t)$; б) фазовые портреты системы р53–белок-ингибитор–микроРНК. *Линии N* соответствуют базальному состоянию (1.17), *линии D* получены при $b_1 = 0.1b_1^0$, *линии C* – при $b_2 = 0.1b_2^0$, *линии R* – при $k_f = 0.022k_f^0$ ($\tau_1 = 120$).

1.4.5. Анализ чувствительности модели к изменению значений параметров

В достаточной мере стандартным и важным этапом исследования математической модели является оценка влияния неопределенностей в параметрах на результат расчета. Методы анализа чувствительности моделей весьма разнообразны и представлены, в частности, в работах [193–202].

Для модели (1.1)–(1.6) выполнен анализ чувствительности к малому изменению значений параметров в окрестности набора (1.13) с применением «прямого» локального метода [199]. В рамках данного метода коэффициенты чувствительности \mathbf{s}_j вычисляются из решения следующей системы ОДУ

$$\frac{d\mathbf{s}_j}{dt} = \mathbf{J} \cdot \mathbf{s}_j(t) + \boldsymbol{\sigma}_j(t), \quad \mathbf{s}_j(0) = 0, \quad j = 1, \dots, M,$$

которая дополняет основную систему (1.1)–(1.6). Здесь \mathbf{J} – матрица Якоби с элементами $J_{il} = \partial f_i / \partial y_l$; $\mathbf{y} = (y_1, \dots, y_n)$ – вектор решения исследуемой модели (1.1)–(1.5); $\mathbf{F} = (f_1, \dots, f_n)$ – вектор правой части системы (1.1)–(1.5); $\mathbf{s}_j = (s_{1j}, \dots, s_{nj})$, $\boldsymbol{\sigma}_j = (\partial f_1 / \partial p_j, \dots, \partial f_n / \partial p_j)$, $\mathbf{P} = (p_1, \dots, p_M)$ – вектор параметров модели; все частные производные вычисляются аналитически.

Результаты анализа представлены на рисунке 1.17 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 (значения (1.13)) и компоненты решения y_i^0 (стационарные значения при (1.13)) играют роль нормирующих множителей. Здесь как и прежде t_q – узлы расчетной сетки в методах численного решения прямой задачи, N_t – число узлов, $\mathbf{P} = (p_1, \dots, p_{10}) = (a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, k_f, k_g, c_1, c_2, c_3)$.

Численный анализ чувствительности показал, что модель характеризуется умеренной чувствительностью к изменению большинства параметров, что важно с точки зрения использования модели для описания различных сценариев функционирования реальной биологической системы. При этом каждая компонента решения наиболее чувствительна к изменению параметров, входящих в соответствующее ей уравнение. Кроме того, в рамках модели (1.1)–(1.6) получено, что на динамику системы р53–белок-ингибитор–микроРНК большое влияние оказывает изменение параметра b_1 , который регулирует воздействие р53 на белок-ингибитор. Проведенный анализ указывает на то, что уравнение динамики уровня р53 чувствительно к изменениям параметров b_2 и k_f , а уравнение динамики микроРНК – к

изменениям параметров a_1 , a_2 и b_2 . Это показывает, что в рамках данной модели взаимодействия элементов системы играют важную роль, хотя и роль параметров, регулирующих конститутивные процессы, также высока.

Реализация «прямого» локального метода анализа чувствительности модели включена в разработанный комплекс программ.

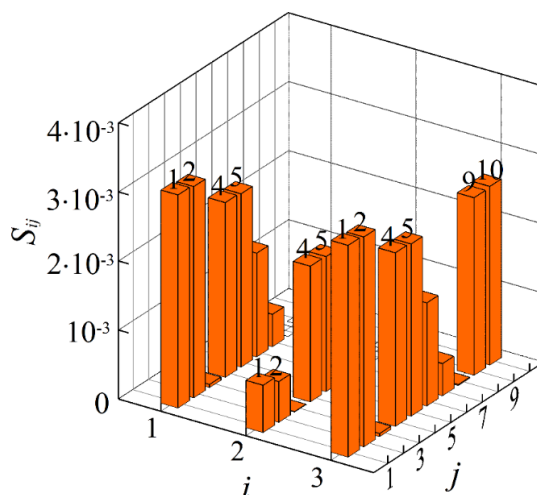


Рисунок 1.17. Коэффициенты относительной чувствительности модели (1.1)–(1.6) к малому изменению значений параметров (i – номер уравнения, j – номер параметра в векторе параметров модели P).

1.4.6. Численный анализ качественных свойств решений модели

В работе [71] с использованием математической модели (1.1)–(1.2) предпринята попытка исследования реакции системы p53–Mdm2 на стрессовое воздействие, моделируемое как достаточно существенное изменение значения одного из параметров относительно (1.13). Численные эксперименты проводились для случая отсутствия запаздывания реакции в системе p53–Mdm2 ($\tau_1 = 0$) и при $\tau_1 = 1200$ (характерный масштаб времени в [71] $T = 1$ сек.). В результате показано (численно и в ходе анализа собственных чисел), что при $\tau_1 = 0$ решения вне зависимости от значения параметров модели выходят на стационарные значения. Однако, как отмечают авторы [71], при $\tau_1 \neq 0$ и существенном уменьшении параметра k_f относительно (1.13) могут наблюдаться не только стационарные решения системы (1.1)–(1.2), но и периодические. Этот факт согласуется с некоторыми экспериментальными данными в условиях стресса: происходит снижение константы диссоциации и наблюдаются периодические колебания уровня белков p53 и Mdm2. Однако авторы [71] отмечают, что в некоторых лабораторных экспериментах стрессовое воздействие связывают с повышением константы диссоциации. Обнаружено множество стационарных решений, которые описывают диапазон

изменения характерных уровней p53 и его белка-ингибитора (на примере белка Mdm2) в рамках принятой модели.

В работах [76, 77] проведено более детальное исследование состояний системы (1.1)–(1.2) при поочередном варьировании параметров в широком диапазоне значений. В частности, получено, что периодические решения могут возникать не только при некоторых соотношениях значений τ_1 и k_f , но и при определенных значениях параметров τ_1 и k_g . Авторы [76, 77] отмечают, что возникновение периодических решений связано с бифуркациями Андронова–Хопфа, то есть рождением предельного цикла из неподвижной точки в фазовом пространстве решений.

В продолжение этих исследований в настоящей работе в результате численного анализа решений задачи (1.1)–(1.6) определены линии нейтральности (см. рисунок 1.18а, б), образованные соответствующими парами бифуркационных значений τ_1 и k_f , а также τ_1 и k_g (остальные параметры равны базальным значениям (1.17)). Полученные линии нейтральности разделяют плоскости параметров (τ_1, k_f) и (τ_1, k_g) на область *I*, в которой стационарное решение системы (1.1)–(1.5) асимптотически устойчиво, и область *II*, которая соответствует решениям с предельным циклом. Исследование линий нейтральности показывает, что периодические колебания могут возникнуть при $\tau_1 \geq 45$ и относительно небольших значениях k_f . Такие решения соответствуют, в частности, лабораторным данным в ситуации укрепления взаимодействия p53–белок-ингибитор при стрессовом воздействии [71]. В расчетах [71] впервые было обращено внимание на этот сложный эффект, он также нашел подтверждение в [76, 77] и настоящих исследованиях. В рамках настоящей работы получено (см. рисунок 1.18а), что с увеличением времени запаздывания этот эффект ослабевает. Однако следует иметь в виду, что большинство лабораторных экспериментов указывает на противоположную ситуацию – нормальной реакцией на стресс, при которой возникают периодические колебания, является ослабление взаимодействия p53–белок-ингибитор [32, 65]. Расчеты модели (1.1)–(1.6) согласуются с этими представлениями, поскольку при увеличении параметра запаздывания τ_1 бифуркационное значение параметра k_f увеличивается, что в рамках модели (1.1)–(1.6) соответствует ослаблению обратной связи p53–белок-ингибитор.

В ходе расчетов получено, что возникновение периодических решений модели (1.1)–(1.6) может быть связано с изменением параметра k_g лишь при достаточно больших значениях параметра τ_1 (см. рисунок 1.18б). Анализ линии нейтральности на плоскости параметров (τ_1, k_g) показал, что при $\tau_1 \gg 2000$ периодические колебания возникают лишь в определенном диапазоне достаточно больших значений k_g (область *II*), а при выходе из этого диапазона

решение задачи асимптотически устойчиво (характеризуется неподвижной предельной точкой, область I). Полученные данные согласуются с результатами [71, 76, 77].

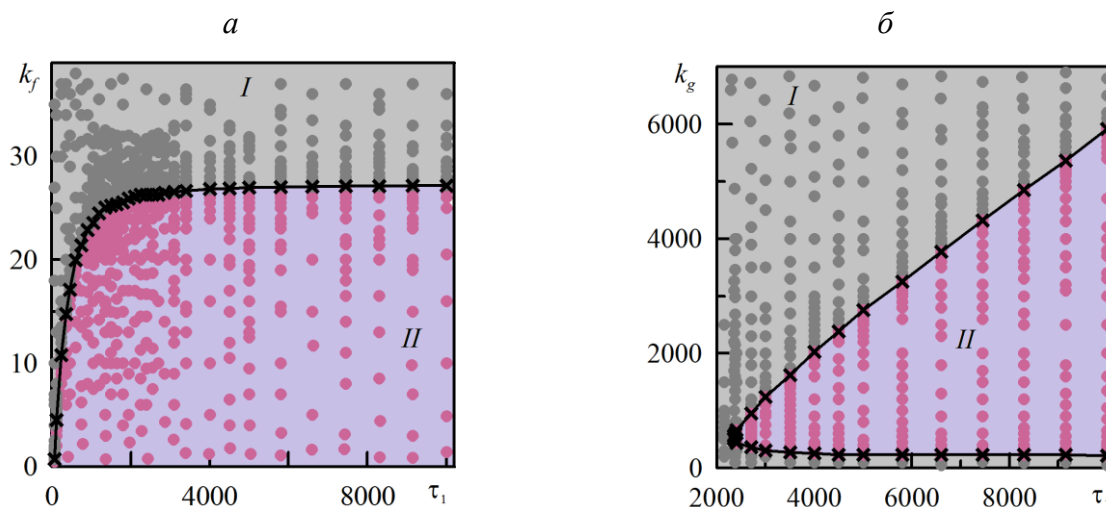


Рисунок 1.18. Иллюстрация вычислительного эксперимента. Линии нейтральности в плоскости параметров (τ_1, k_f) и (τ_1, k_g) : *серые точки* соответствуют численным стационарным решениям, *розовые точки* – периодическим решениям, *крестики* – бифуркационные значения параметров, I – область устойчивых стационарных решений, II – область периодических решений.

Дополнительно проведен анализ качественных свойств компоненты решения u_3 при варьировании параметра запаздывания τ_2 в достаточно широком диапазоне значений. В результате численных экспериментов получено, что тип решения u_3 (с асимптотически устойчивым стационарным решением или с предельным циклом) согласуется с типом уравнения динамики u_1 . При этом расчеты указывают на то, что период колебания u_3 зависит не от значения параметра τ_2 (время запаздывания реакции микроРНК на изменение состояния $p53$), а от значения параметра τ_1 , которое определяет время запаздывания в системе $p53$ –белок–ингибитор.

1.4.7. $p53$ -зависимые микроРНК как диагностические биомаркеры дегенеративных заболеваний. Численный анализ характерных патологических состояний

Важным для исследования модели динамики системы $p53$ –белок–ингибитор–микроРНК является вопрос о согласовании полученных в рамках модели (1.1)–(1.6) результатов с лабораторными данными, иллюстрирующими особенности функционирования $p53$ -зависимых микроРНК с прямой положительной связью и, в частности, их свойства как диагностических биомаркеров дегенеративных заболеваний. Поскольку микроРНК с таким типом связи достаточно много, то здесь будут рассмотрены некоторые наиболее характерные примеры. Как уже упоминалось выше, к данному классу микроРНК с некоторой степенью достоверности

можно отнести одно из наиболее изученных семейств микроРНК miR-34 (miR-34a/b/c). Хотя в известной литературе имеются противоречивые данные о степени обратного воздействия miR-34 на p53, однако в существенной части опубликованных работ отмечается определяющая роль прямого положительного влияния p53 на miR-34. Молекулы miR-34 известны как мишень p53, которые участвуют в регуляции апоптотической гибели клеток, и обладают собственными мишенями с различными функциями. Анализ результатов лабораторных экспериментов показывает, что только при совместной работе с p53 miR-34 могут подавлять опухолевый рост. Кроме того, в работе [203] отмечено, что затухание функции miR-34b/c снижает жизнеспособность клеток мозга и негативно влияет на состояние пациентов с болезнью Паркинсона, Альцгеймера и т.п. Другим семейством микроРНК, которое относят к классу с прямой положительной связью с p53, является miR-145. Известно, что miR-145 обеспечивает p53-зависимую негативную регуляцию ряда онкогенов (т.е. генов, стимулирующих образование и развитие злокачественных опухолей).

Лабораторному исследованию диагностических свойств микроРНК в случае разных форм рака и болезни Альцгеймера посвящены, в частности, работы [192, 203–205]. Расчетные данные, как и лабораторные измерения [192, 203–205], приведены на рисунке 1.19 в виде относительного изменения уровня микроРНК $Rel = y_{fin}/y_0$, где y_0 – уровень микроРНК в здоровых клетках или до моделируемого воздействия, и y_{fin} – уровень микроРНК в клетках с патологией или после воздействия. Так, анализ уровня miR-34a в 15 панкреатических линиях раковых клеток [204], продемонстрировал в одиннадцати из них снижение экспрессии в 10 и более раз (или даже полное отсутствие этих микроРНК) по сравнению с уровнем в здоровых клетках. Некоторые результаты сопоставления численных решений модели (1.1)–(1.6) с экспериментальными данными [204] представлены на рисунке 1.19 (серия расчетов I): в расчетах подобное изменение уровня микроРНК получено при $a_3 = 200a_3^0$, что соответствует в рамках модели (1.1)–(1.6) повышению скорости распада p53 в 200 раз по сравнению с состоянием условной нормы, которое соответствует базальному набору значений (1.17). Таким образом, эти данные указывают на существенное снижение уровня miR-34a в раковых клетках, вызванное увеличением скорости собственной деградации p53, и возможность за счет измерения miR-34a определить данное патологическое состояние.

В работе [192] получены аналогичные результаты, указывающие на снижение уровня miR-34a в клетках рака легких (клетки линии H1299). Здесь же *in vivo* было проведено исследование реакции динамической системы p53–miR на стресс, вызванный облучением. Показано, что после облучения только у здоровых лабораторных мышей уровень miR-34a вырос в 1.5–4 раза, а у мышей с дефицитом p53 не было выявлено статистически значимой реакции. Соответствующие отклики на стресс в рамках модели (1.1)–(1.6) получены при $a_3 =$

$200a_3^0$, $k_f = 5k_f^0$ или $a_3 = 200a_3^0$, $k_g = 20k_g^0$ (серия II на рисунке 1.19) и при $k_f = 5k_f^0$ или $k_g = 20k_g^0$ (серия расчетов III на рисунке 1.19). Отметим, что результаты расчетов согласуются с известными медико-биологическими представлениями [32], которые свидетельствуют об ослаблении взаимосвязи в системе p53–белок-ингибитор при стрессовом воздействии. В рамках принятой модели ослабление взаимосвязи в системе p53–белок-ингибитор осуществляется за счет увеличения параметров k_f и k_g относительно базальных значений (1.17), которые регулируют уровень взаимодействия между p53 и его белка-ингибитора.

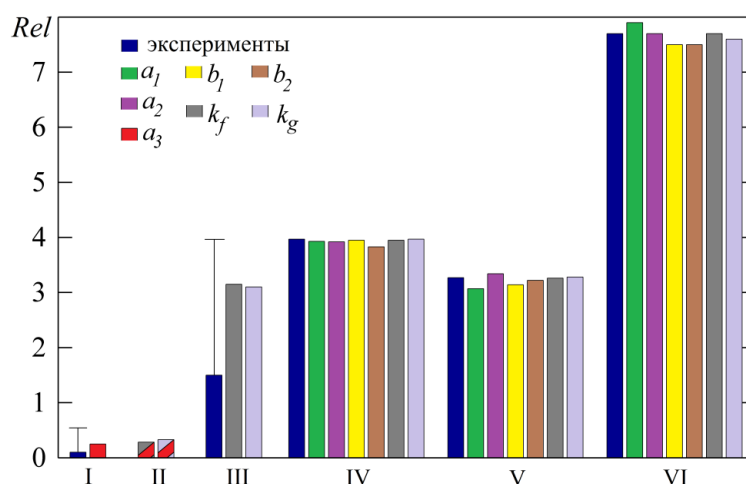


Рисунок 1.19. Изменение уровней микроРНК miR-34a (I–III), miR-34c (IV), miR-34b (V) и miR-145 (VI) в характерных состояниях C (I, II) и D (IV–VI). Лабораторные и клинические измерения представлены данными из литературы для серий I [204], II и III [192], IV и V [203], VI [205]; расчетные данные получены при варьировании соответствующего параметра в (1.17).

Клинические исследования указывают на повышенный уровень экспрессии miR-34c, miR-34b [203] и miR-145 [205] (относительно уровня в здоровой ткани) при болезни Альцгеймера. Расчеты показали, что численные решения модели (1.1)–(1.6) согласуются (см. рисунок 1.19) с этими экспериментальными данными при одном из следующих вариантов изменения параметров: в серии IV – при $a_1 = 2.2a_1^0$, $a_2 = 0.44a_2^0$, $b_1 = 0.43b_1^0$, $b_2 = 2.3b_2^0$, $k_f = 6.6k_f^0$ или $k_g = 30k_g^0$; в серии V – при $a_1 = 2a_1^0$, $a_2 = 0.47a_2^0$, $b_1 = 0.47b_1^0$, $b_2 = 2.15b_2^0$, $k_f = 5.2k_f^0$ или $k_g = 22k_g^0$; в серии VI – при $a_1 = 2.65a_1^0$, $a_2 = 0.35a_2^0$, $b_1 = 0.35b_1^0$, $b_2 = 2.86b_2^0$, $k_f = 15k_f^0$ или $k_g = 80k_g^0$.

Таким образом, рассмотренные лабораторные данные свидетельствуют о том, что в случае рака и при болезни Альцгеймера уровни микроРНК существенным образом отличаются друг от друга и от значения, принятого в качестве условной нормы, а значит p53-зависимые микроРНК могут быть использованы в качестве диагностических маркеров этих заболеваний. При

численном моделировании этих состояний согласованные с экспериментальными измерениями численные решения принятой математической модели указывают на способность модели описывать уровень микроРНК при дегенеративных заболеваниях и возможность ее использования для исследования функционирования р53-зависимых микроРНК как биомаркеров дегенеративных заболеваний.

1.4.8. Численное моделирование функционирования микроРНК при искусственной активации р53 в терапевтических целях

Одним из основных направлений ряда лабораторных исследований является изучение способности микроРНК активироваться в ответ на активацию р53, которая проявляется благодаря прямой положительной связи в системе р53–микроРНК. При этом чаще всего активация белка р53 рассматривается как способ добиться запуска программы клеточной смерти (апоптоза) для уничтожения раковых клеток, т.е. в качестве важного терапевтического фактора при онкологических заболеваниях. Например, в лабораторных экспериментах *in vitro* [48] анализируется р53-зависимая активация различных микроРНК с участием белка р53 дикого типа (обозначается как р53 WT, т.е. без мутаций) и мутантных р53 с частичной потерей функции. Продемонстрировано, что активация р53 в клетках со сниженной функцией приводит к относительному снижению активности miR-34a по сравнению с данными, полученными в клетках с р53 дикого типа (такая реакция указывает на положительную прямую связь р53–miR-34a). В экспериментах [206] *in vitro* исследовалось изменение уровня miR-145 в опухолевых клетках человека (линия клеток MCF7 аденокарциномы молочной железы человека) через 24 часа после активации р53 дикого типа. При этом получено, что уровень miR-145 возрастает в 12–14 раз по сравнению с уровнем до р53-зависимой активации.

С целью исследования способности принятой модели описывать р53-зависимую активацию микроРНК как проявление прямой положительной зависимости микроРНК от р53, были проведены сопоставления численных решений модели (1.1)–(1.6) с результатами лабораторных измерений. Результаты расчетов и экспериментальные данные двух микроРНК приведены на рисунке 1.20: miR-34a [48] в серии расчетов I–IV и miR-145с [206] в серии V. В каждой серии расчетов численные эксперименты проводились в два этапа. На первом этапе моделируется состояние р53 до активации, то есть базальное состояние системы р53–белок-ингибитор для р53 дикого типа, или угасание функции р53, наблюдаемое в эксперименте, для мутантных р53. На втором этапе воспроизводится воздействие вещества, которое активирует р53. Для простоты полагаем, что в рамках модели (1.1)–(1.6) активирующее вещество влияет на

процесс самопроизвольной генерации р53, вызывая его ускорение или затухание, т.е. второй этап моделируется изменением параметра a_1 .

В расчетах для сопоставления с данными [48, 206] для р53 дикого типа (в сериях V и I соответственно) рассматривается относительное изменение уровня р53 после активации по отношению к базальному состоянию. В сериях II–IV при воспроизведении лабораторных экспериментов [48] для мутантных р53 приводится относительное изменение по отношению к состоянию со сниженным уровнем р53. Кроме того, на каждом этапе численных экспериментов предполагалось нормальное функционирование микроРНК, которое определяется параметрами $c_i = c_i^0$ (1.17). Результаты расчетов, как и в лабораторных исследованиях [48, 206], приводятся на рисунке 1.20 в виде фолд-изменения $fold = (y_{fin} - y_0)/y_0$, где y_{fin} – уровень микроРНК на втором этапе эксперимента, т.е. после активации, y_0 – уровень микроРНК на первом этапе.

Ниже приведены результаты двух вариантов численных экспериментов. Для первого из них выдвигалось следующее предположение: причина снижения уровня р53 на первом этапе в рамках модели (1.1)–(1.6) слабо влияет на вещество, активирующее р53 на втором этапе. Расчеты показали, что при активации р53 дикого типа уровень микроРНК, согласующийся с данными [48], получен только при $a_1 \approx 11a_1^0$ (серия I на рисунке 1.20). В серии II *in vitro* проводилась активация мутантного р53 (A138S), для которого характерно снижение уровня примерно на 33.3%; соответствующее состояние в математической модели (1.1)–(1.6) может быть воспроизведено в одном из следующих случаев: при $a_1 = 0.7a_1^0$, $a_2 = 1.5a_2^0$, $a_3 = 35a_3^0$, $b_1 = 1.7b_1^0$ или $b_2 = 0.6b_2^0$. Конечное состояние (после активации) достигается в модели при $a_1 = 5.8a_1^0$. В серии III рассматриваются данные [48] при активации мутантного р53 (R337C), уровень которого снижен до 10% от базального. В модели соответствующее состояние для первого этапа расчетов получено при изменении одного из параметров: $a_1 = 0.065a_1^0$, $a_2 = 16a_2^0$, $a_3 = 600a_3^0$. Второй этап (р53-зависимая активация микроРНК) моделируется при $a_1 = 3.09a_1^0$. В серии IV приведены данные об активации мутанта С141У со снижением уровня белка р53 до 5% от базального. Точно такое же начальное состояние может быть получено в модели (1.1)–(1.6), если положить следующими значениями параметры: $a_1 = 0.02a_1^0$, $a_2 = 50a_2^0$ или $a_3 = 1400a_3^0$. При этом конечное состояние, соответствующее экспериментальным данным [48], достигается при $a_1 = 2.21a_1^0$. В серии V состояние микроРНК близкое к [206] после активации р53 дикого типа достигается в рамках модели при любом из параметров $a_1 = 2.92a_1^0$, $a_2 = 0.3a_2^0$, $b_1 = 0.292b_1^0$ или $b_2 = 3.4b_2^0$. Отметим, что во всех сериях расчетов остальные параметры модели равны базальным значениям (1.17).

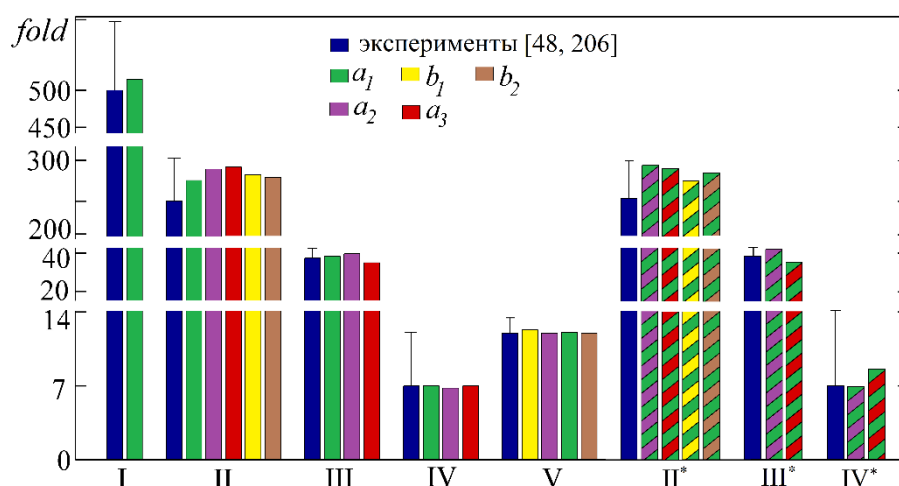


Рисунок 1.20. Оценка способности микроРНК активироваться в ответ на активацию p53. Относительное изменение уровня miR-34a (столбцы I–IV) и miR-145 (столбец V) при активации p53 дикого типа (I, V) и мутантных p53 со сниженной функцией апоптоза (II–IV). Данные, помеченные *, получены в соответствующих расчетах с учетом причин первоначального снижения функции p53.

Для второго варианта численных экспериментов выдвигалось предположение о том, что причина сниженного уровня p53 сохраняется и после воздействия активирующего вещества. Как и в первой части расчеты проводились в два этапа, однако, при переходе на второй этап фиксировались значения параметров, измененные на первом этапе. Очевидно, что такой подход повлияет на результаты только серий II–IV. Результаты второго варианта численных экспериментов на рисунке 1.20 отмечены звездочкой*.

В серии II* начальное состояние (снижение уровня p53 на 33.3%), как и первом варианте расчетов, достигается в рамках принятой модели при $a_2 = 1.5a_2^0$, $a_3 = 35a_3^0$, $b_1 = 1.7b_1^0$ или $b_2 = 0.6b_2^0$, а конечное состояние микроРНК, соответствующие [48], получено при следующих изменениях параметров: $a_1 = qa_1^0$, где $q = 7.3, 100, 7.8, 7.8$ в каждом расчете первого этапа соответственно. В серии III* состояние до активации вновь моделируется при $a_2 = 16a_2^0$ или $a_3 = 600a_3^0$. Состояние микроРНК после p53-зависимой активации достигается при $a_1 = 35a_1^0$ или $a_1 = 41a_1^0$ соответственно. В серии IV* начальное состояние с низким уровнем p53, согласованным с условиями лабораторного исследования [48], получено при $a_2 = 50a_2^0$ или $a_3 = 1400a_3^0$, а для достижения конечного состояния дополнительно изменялся параметр a_1 : $a_1 = 21a_1^0$, $a_1 = 11a_1^0$ соответственно в расчетах на первом этапе.

Отметим, что цвет столбца на рисунке 1.20 указывает на тот параметр, который был изменен в ходе расчета. В случае, если при варьировании параметра не достигается уровень микроРНК близкий к экспериментальному, то соответствующий столбец отсутствует. При этом в численных экспериментах отклонения параметров на 6 и более порядков относительно базального набора значений (1.17) полагались мало соответствующими практической ситуации

и не рассматривались. Приведенные на рисунке 1.20 результаты сопоставления расчетов и экспериментальных данных при p53-зависимой активации miR-34a [48] и miR-145 [206], подтверждают адекватность подхода к моделированию функционирования системы p53–микроРНК с прямой положительной связью.

Таким образом, результаты проведенных расчетов формируют представление об адекватности предложенной минимальной модели и об ее возможном применении для описания характерных состояний и базовых механизмов системы p53–белок-ингибитор–микроРНК. Так, в результате сопоставления с лабораторными и клиническими данными в рамках разработанной минимальной модели продемонстрированы основные состояния системы p53–белок-ингибитор. Показано, что модель описывает фундаментальный механизм «бимодального» переключения (механизм реагирования системы на дефекты ДНК), а также может быть использована как инструмент для оценки состояния диагностического потенциала p53-зависимых микроРНК при дегенеративных заболеваниях и работы механизма p53-зависимой активации микроРНК как важнейшего терапевтического фактора при онкологических заболеваниях.

Следует отметить, что в данной главе был рассмотрен самый простой пример связи p53 с микроРНК – прямая положительная связь. Разработанная математическая модель функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК с данным видом связи (1.1)–(1.6), как показано выше, описывает достаточно широкий круг лабораторных экспериментов и может рассматриваться в качестве базовой модели для дальнейших исследований. В последующих главах будут разработаны и исследованы математические модели динамики системы p53–белок-ингибитор–микроРНК с более сложным типом связи: для класса p53-зависимых микроРНК, для которых характерно отрицательное воздействие на белок-ингибитор или его мРНК, и в случае одновременного взаимодействия с p53 и его белком-ингибитором нескольких различных микроРНК.

Результаты главы 1

1. Разработаны численные алгоритмы, ориентированные на решение прямых и обратных коэффициентных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием. Алгоритмы основаны на методе шагов (последовательного интегрирования), методах решения задачи Коши из семейств Адамса, Гира и Рунге–Кутты, реализованных с привлечением идеи метода Зейделя, и генетическом алгоритме BGA. Разработан комплекс программ и выполнены серии методических расчетов. Для

рассмотренного класса задач показано преимущество применения методов типа предиктор-корректор решения задачи Коши, основанных на конечно-разностных схемах из семейства Адамса, а также достаточно высокая эффективность генетического алгоритма для определения значений параметров модели, в том числе параметра запаздывания.

2. С привлечением известной математической модели функционирования системы p53–Mdm2 (Tiana G. et al., 2002) и широкого круга экспериментальных данных разработана минимальная модель для системы общего вида p53–белок-ингибитор (отрицательная обратная связь), представляющая собой систему функционально-дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами и опирающаяся на биокинетическую модель типа Гольдбетера–Кошланда.
3. В рамках системно-биологического подхода предложена упрощенная базовая модель для системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной прямой связью p53–микроРНК. С привлечением широкого круга экспериментальных данных, определяющих кинетику и состояния конкретных сегментов биологической системы в норме и при внешних воздействиях, произведена калибровка модели, дано количественное определение характерных состояний биологической системы p53–белок-ингибитор–микроРНК – условной нормы, риска рака и риска дегенеративных заболеваний.
4. В окрестности базального набора значений параметров модели, определяющих условно нормальное состояние системы p53–белок-ингибитор–микроРНК, выполнен численный анализ качественных свойств решений. Численно получены линии нейтральности, разделяющие плоскости параметров (τ_1, k_f) и (τ_1, k_g) на область, в которой стационарное решение асимптотически устойчиво, и область периодических колебаний решений. Выполнен анализ чувствительности модели к малым изменениям базальных значений параметров.
5. Показано, что упрощенная базовая модель может быть использована как эффективный инструмент для анализа функционирования систем биомаркеров дегенеративных заболеваний, в качестве которых рассматриваются белок p53, ряд его отрицательных регуляторов и микроРНК-мишени p53 (положительная связь). Модель адекватно описывает
 - динамику уровня p53 и его белка-ингибитора Mdm2, измеренную в экспериментах *in vitro* при воздействии противоракового препарата на раковые клетки, демонстрируя фундаментальный механизм «бимодального» переключения сценария нормального функционирования на сценарий гиперактивации p53 и микроРНК в условиях стресса;

- широкий диапазон наблюдаемых *in vitro* состояний биологической системы p53–Wip1 при облучении клетки, включая состояния условной нормы, угрозы рака и массовой гибели клеток, приводящей к патологической дегенерации органов;
- динамику системы p53–Sirt1–miR-34a после введения препарата, инициирующего фиброз печени у крыс;
- наблюдаемый *in vitro* отклик p53-зависимых микроРНК miR-34a и miR-145 на принудительную активацию p53 в широком (до 500 раз) диапазоне стрессовых сигналов (воздействий);
- наблюдаемые в лабораторных и клинических исследованиях изменения уровня p53-зависимых микроРНК miR-34a в клетках различных форм рака и miR-34b, miR-34c и miR-145 в клетках мозга с признаками болезни Альцгеймера.

Глава 2. О связи решений дифференциальных уравнений с запаздыванием и систем ОДУ высокой размерности в моделях функционирования системы р53–ингибитор–микроРНК

В силу чрезвычайной сложности живых систем и многостадийности биохимических процессов, лежащих в основе функционирования этих систем, многие исследования в биологии приводят к системам крайне высокой размерности. Одним из ярких примеров является многостадийный процесс синтеза белка, который может иметь сотни тысяч промежуточных стадий n . В связи с этим в литературе обсуждается вопрос о связи между решениями систем обыкновенных дифференциальных уравнений высокой размерности и дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом, который представляет большой интерес со многих точек зрения, в первую очередь – как один из фундаментальных теоретических фактов, установление которого позволяет при построении математической модели понизить размерность фазового пространства путем проецирования данных на подпространство существенно меньшей размерности [141]. Во многих работах (см., например, [141, 207–229]) отмечается практическая значимость этой связи – она позволяет, в частности, находить приближенные решения системы высокой размерности $n \gg 1$, решая соответствующую задачу для уравнения с запаздыванием (в тех случаях, например, когда моделируемый процесс характеризуется множеством промежуточных стадий, но значение имеет только финальная стадия процесса), и наоборот – аппроксимировать решения уравнений с запаздыванием с помощью решений специальных классов систем обыкновенных дифференциальных уравнений. В подобных случаях речь идет о близости последней компоненты вектора решения системы ОДУ (многостадийной модели) и решения дифференциального уравнения с запаздывающим аргументом, где параметр запаздывания τ имеет смысл общего времени протекания стадий рассматриваемого процесса из 1-го состояния в n -е. Установленные связи между решениями системы ОДУ высокой размерности и уравнения с запаздывающим аргументом одного и того же класса могут быть использованы при исследовании качественных свойств решений этих систем, а также при построении приближенных решений систем высокой размерности [217].

Фундаментальную роль играет следующий теоретический результат, полученный в работе [141] для автономной системы ОДУ:

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= \sigma(x_n) - \frac{n-1}{\tau} x_1, \\ \frac{dx_2}{dt} &= \frac{n-1}{\tau} (x_1 - x_2), \end{aligned} \tag{2.1}$$

...

$$\frac{dx_{n-1}}{dt} = \frac{n-1}{\tau}(x_{n-2} - x_{n-1}),$$

$$\frac{dx_n}{dt} = \frac{n-1}{\tau}x_{n-1} - \lambda x_n,$$

при нулевых начальных данных $x_1(0) = x_2(0) = \dots = x_n(0) = 0$, где $\sigma(x_n)$ – ограниченная функция, удовлетворяющая условию Липшица, константа $\lambda > 0$, строго доказана теорема (предельная теорема) о существовании пределов для компонент вектора $x = (x_1, \dots, x_n)$:

$$\lim_{n \rightarrow \infty} x_i(t) = 0, \quad \lim_{n \rightarrow \infty} x_n(t) = y(t), \quad (2.2)$$

если $1 < i < n$ и $y(t)$ – решение начальной задачи для дифференциального уравнения с запаздывающим аргументом τ следующего вида:

$$\frac{dy}{dt} = \sigma(y(t - \tau)) - \lambda y(t), \quad t > \tau, \quad y(t) = 0 \text{ при } t \leq \tau. \quad (2.3)$$

Кроме того, в [217] доказана обратная предельная теорема о приближении (аппроксимации) решения уравнения с запаздывающим аргументом решениями специальных классов систем ОДУ. В [217] отмечается также, что предельные теоремы дают обоснование эффективному методу для численного нахождения компоненты $x_n(t)$ при $n \gg 1$, в рамках которого достаточно приближенно решить начальную задачу, оценить погрешность аппроксимации $x_n(t) \approx y(t)$ и скорость сходимости как $\|x_n(t) - y(t)\| \approx O(n^q)$ при $n \rightarrow \infty$. Соответствующая схема вычислительного эксперимента была сформулирована и реализована в работах [141, 220, 226] для задачи моделирования процесса синтеза вещества. В ряде работ (см., например, [141, 221, 226]) для моделей с различными представлениями правых частей уравнений приведены результаты теоретических и численных исследований о существовании такого перехода при $n \rightarrow \infty$ со скоростью, близкой к теоретической $O(n^{-0.5})$ (в векторной норме пространства непрерывных функций) и о близости асимптотических (при $t \rightarrow \infty$) свойств решений.

Целью численных исследований в главе 2 является применение перечисленных результатов к анализу математических моделей функционирования систем р53–белок-ингибитор и р53–белок-ингибитор–микроРНК, рассматривавшихся в главе 1, и демонстрация их связи с моделями, которые описывают функционирование этих же систем как многостадийный процесс и основаны на системах ОДУ достаточно большой размерности. Особое внимание уделяется особенностям численной реализации и уточнению схемы вычислительного эксперимента для изучения «предельного» перехода от решения системы ОДУ к решению систем уравнений с одним или двумя запаздывающими аргументами, т.е. установлению связи при $n \gg 1$ между компонентами векторов решений задач в этих двух взаимосвязанных постановках. Представлен ряд практически важных примеров,

демонстрирующих наличие «предельного» перехода и справедливость результатов, уточняющих эту схему. Здесь и далее кавычки в термине «предельный» переход указывают на то, что в расчетах рассматривались системы вида (2.1) только с конечным числом n , а полученные численные решения представляют собой дискретные функции. Дополнительно отметим, что рассмотренные в работах [141, 211–229] математические модели не включали в себя кинетические модели типа Гольдбетера–Кошланда. Поэтому в рамках данного исследования представляет интерес и этот аспект численного анализа «предельного» перехода.

2.1. Математическая модель динамики системы р53–ингибитор, основанная на уравнении с запаздыванием

Рассмотрим нелинейную систему дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом, представленную в главе 1 как математическую модель динамики системы р53–белок-ингибитор:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (2.4)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t). \quad (2.5)$$

Функции $f(x_1, x_2, k)$ и $g(x_1, x_2, k_g, k_f)$, входящие в правую часть уравнений системы (2.4)–(2.5), являются аппроксимациями типа Гольдбетера–Кошланда и Михаэлиса–Ментен соответственно и определяются следующим образом:

$$f(u, v, k) = \frac{1}{2} \left(u + v + k - \sqrt{(u + v + k)^2 - 4uv} \right), \quad (2.6)$$

$$g(u, v, k_g, k_f) = \frac{u - f(u, v, k_f)}{u + k_g - f(u, v, k_f)}. \quad (2.7)$$

Для выполнения условий предельной теоремы [141] начальные условия для системы (2.4)–(2.7) с запаздыванием задаются в виде нулевых функций «истории»:

$$y_q(\theta) = 0, \quad \theta \in [-\tau_1, 0], \quad q = 1, 2. \quad (2.8)$$

Как и ранее, для численного решения системы (2.4)–(2.7) с начальными данными (2.8) применялся метод шагов и метод предиктор–корректор 2-го порядка. Проведенные в главе 1 методические расчеты показали, что использование метода предиктор–корректор 2-го порядка при решении задачи (2.4)–(2.8) позволяет проводить расчеты на достаточно больших интервалах по времени при разумных затратах и с приемлемой точностью.

В главе 1 показано, что для задачи (2.4)–(2.8) характерно только два вида динамического поведения решений при разных значениях параметров: выход на стационарное значение – предельную точку в фазовом пространстве, и выход на режим периодических колебаний. В данной главе при численном анализе «предельного» перехода будут рассматриваться оба варианта решений. Для получения решения с неподвижной точкой рассматривались значения параметров

$$\begin{aligned} \tau_1 &= 120, a_1 = a_1^0 = 1, b_1 = b_1^0 = 1, \\ a_2 &= a_2^0 = 3 \cdot 10^{-2}, b_2 = b_2^0 = 10^{-2}, \\ a_3 &= a_3^0 = 10^{-4}, k_f = k_f^0 = 180, k_g = k_g^0 = 28. \end{aligned} \quad (2.9)$$

Для периодического решения полагалось $k_f = 1.8$, а остальные параметры равны значениям из набора (2.9).

2.2. Математическая модель динамики системы р53–ингибитор на основе системы ОДУ

2.2.1. Постановка задачи. Численные методы решения задачи Коши

Рассмотрим теперь математическую модель в виде системы ОДУ высокой размерности, которая описывает функционирование той же самой системы р53–белок-ингибитор, что и в параграфе 2.1, как многостадийный процесс с привлечением известной идеи гипотетических генных сетей с линейным представлением промежуточных стадий [141, 211, 222]:

$$\frac{d\tilde{y}_1}{dt} = a_1 - a_2 f(\tilde{y}_1, x_n, k_f) - a_3 \tilde{y}_1, \quad (2.10)$$

$$\frac{dx_1}{dt} = b_1 g(\tilde{y}_1, x_n, k_g, k_f) - \frac{n-1}{\tau_1} x_1, \quad (2.11)$$

$$\frac{dx_j}{dt} = \frac{n-1}{\tau_1} (x_{j-1} - x_j), \quad (j = 2, \dots, n-1) \quad (2.12)$$

$$\frac{dx_n}{dt} = \frac{n-1}{\tau_1} x_{n-1} - b_2 x_n, \quad (2.13)$$

где $x_1(t), \dots, x_n(t)$ – дополнительные переменные, имеющие смысл гипотетических промежуточных стадий, параметр τ_1 имеет смысл суммарного времени протекания процесса.

В численных экспериментах рассмотрим последовательность систем ОДУ вида (2.10)–(2.13), каждая из которых состоит из $n + 1$ обыкновенных дифференциальных уравнений (одно уравнение (2.10) и n уравнений в системе (2.11)–(2.13)). При этом зафиксируем отрезок $[0, T]$ и будем увеличивать n – число уравнений системы (2.11)–(2.13). Тогда получим две последовательности функций $\{\tilde{y}_1^n(t)\}$ и $\{x_n^n(t)\}$ (верхний индекс указывает число промежуточных стадий, т.е. уравнений в системе ОДУ (2.11)–(2.13), нижний – номер компоненты решения при конкретном n), которые состоят из первых и последних компонент решения каждой из систем ОДУ (2.10)–(2.13) соответственно. В согласии с (2.1)–(2.2) предполагается, что при нулевых начальных условиях

$$\tilde{y}_1(0) = 0, \quad x_i(0) = 0, \quad (i = 1, \dots, n) \quad (2.14)$$

последовательности компонент решений $\{\tilde{y}_1^n(t)\}$ и $\{x_n^n(t)\}$ задачи Коши для системы ОДУ (2.10)–(2.13) при $n \rightarrow \infty$ сходятся равномерно к компонентам решения $y_1(t)$ и $y_2(t)$ системы уравнений с запаздыванием (2.4)–(2.5) при начальных данных (2.8). Функции $f(\tilde{y}_1, x_n, k_f)$ и $g(\tilde{y}_1, x_n, k_g, k_f)$ определяются по формулам (2.6)–(2.7).

При численном анализе связи решений системы уравнений с запаздывающим аргументом и системы ОДУ возникает необходимость численного решения автономных систем дифференциальных уравнений большой размерности ($n \gg 10$). При этом выбор численного метода интегрирования определяется, помимо прочего, потребностью проведения больших серий численных экспериментов за приемлемое время.

Хорошо известно, что численное решение систем ОДУ большой размерности связано с серьезными трудностями, и для решения такой задачи целесообразно использовать специальные численные методы. Так, в качестве эффективного инструмента численного интегрирования систем высокой размерности на достаточно большом интервале времени в работе [219] предложена полунявная разностная схема первого порядка. Данная схема сводит решение нелинейной системы ОДУ к решению нескольких СЛАУ и нелинейного алгебраического уравнения. Выбор метода решения СЛАУ в [219] зависит от вида правых частей исходной системы ОДУ, а для решения нелинейного алгебраического уравнения привлекается метод Ньютона. Следует отметить, что данный метод подразумевает адаптацию схемы под конкретный вид решаемой системы.

При решении задачи Коши (2.10)–(2.14) в согласии с [219, 220] на интервалах интегрирования $t_k \leq t \leq t_{k+1}$ (t_k – узлы конечно-разностной сетки) введем следующие обозначения компонент решения: $u_0 = \tilde{y}_1(t_k)$, $v_0 = \tilde{y}_1(t_{k+1})$, $u_i = x_i(t_k)$, $v_i = x_i(t_{k+1})$, где $i = 1, \dots, n$. С использованием новых обозначений заменим в системе (2.10)–(2.13) производные конечно-разностными соотношениями:

$$\frac{d\tilde{y}_1}{dt} \approx \frac{\tilde{y}_1(t_k + h) - \tilde{y}_1(t_k)}{h} = \frac{v_0 - u_0}{h},$$

$$\frac{dx_i}{dt} \approx \frac{x_i(t_k + h) - x_i(t_k)}{h} = \frac{v_i - u_i}{h} \quad (k = 1, \dots, N_t - 1).$$

Тогда после замены получим неявную разностную схему решения системы ОДУ (2.10)–(2.13):

$$A \begin{pmatrix} v_0 \\ v_1 \\ \dots \\ v_{n-1} \\ v_n \end{pmatrix} = \frac{1}{h} \begin{pmatrix} u_0 \\ u_1 \\ \dots \\ u_{n-1} \\ u_n \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \tilde{f}(v_0, v_n) \\ \tilde{g}(v_0, v_n) \\ 0 \\ \dots \\ 0 \end{pmatrix}, \quad A = \begin{pmatrix} \alpha_0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \beta_2 & \alpha_2 & 0 & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \beta_n & \alpha_n \end{pmatrix}, \quad (2.15)$$

где

$$\alpha_0 = \frac{1}{h} + a_3 + \frac{a_2}{2}, \quad \alpha_i = \frac{1}{h} + \frac{n-1}{\tau}, \quad \alpha_n = \frac{1}{h} + b_2, \quad \beta_j = -\frac{n-1}{\tau}, \quad i = 1, \dots, n-1, \quad j = 2, \dots, n,$$

$$\tilde{f}(v_0, v_n) = a_1 - \frac{a_2}{2} \left(v_n + k_f - \sqrt{(v_0 + v_n + k_f)^2 - 4v_0v_n} \right),$$

$$\tilde{g}(v_0, v_n) = b_1 - b_1 k_g / (v_0 + k_g - 0.5(v_0 + v_n + k_f - \sqrt{(v_0 + v_n + k_f)^2 - 4v_0v_n})).$$

В каждом узле конечно-разностной сетки приближенное решение системы (2.15) можно представить в виде $v_i = w_i + pz_i + q\bar{z}_i$. При этом w_i, z_i, \bar{z}_i ($i = 0, \dots, n$) – решения следующих систем линейных алгебраических уравнений:

$$A \begin{pmatrix} w_0 \\ w_1 \\ \dots \\ w_{n-1} \\ w_n \end{pmatrix} = \frac{1}{h} \begin{pmatrix} u_0 \\ u_1 \\ \dots \\ u_{n-1} \\ u_n \end{pmatrix}, \quad A \begin{pmatrix} z_0 \\ z_1 \\ \dots \\ z_{n-1} \\ z_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ \dots \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad A \begin{pmatrix} \bar{z}_0 \\ \bar{z}_1 \\ \dots \\ \bar{z}_{n-1} \\ \bar{z}_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ \dots \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \quad (2.16)$$

а значения параметров p и q определяются в ходе решения системы нелинейных уравнений

$$\begin{cases} F_1(p, q) = p - \tilde{f}(w_0 + pz_0 + q\bar{z}_0, w_n + pz_n + q\bar{z}_n) = 0, \\ F_2(p, q) = q - \tilde{g}(w_0 + pz_0 + q\bar{z}_0, w_n + pz_n + q\bar{z}_n) = 0. \end{cases} \quad (2.17)$$

Решение СЛАУ (2.16) не вызывает затруднений, и его можно выписать в следующем виде:

$$w_0 = \frac{2u_0}{2 + 2ha_3 + a_2h}, \quad w_i = \frac{u_i + hpw_{i-1}}{1 + \rho h}, \quad i = 1, \dots, n-1,$$

$$w_n = \frac{u_n + hpw_{n-1}}{1 + b_2h}, \quad z_0 = \frac{2h}{2 + 2ha_3 + ha_2}, \quad z_i = 0, \quad i = 1, \dots, n,$$

$$\bar{z}_0 = 0, \quad \bar{z}_1 = \frac{h}{1 + hp}, \quad \bar{z}_i = \frac{hp\bar{z}_{i-1}}{1 + hp}, \quad i = 2, \dots, n-1, \quad \bar{z}_n = \frac{hp\bar{z}_{n-1}}{1 + hb_2},$$

где $\rho = \frac{n-1}{\tau}$. Для решения системы (2.17) использовался метод Ньютона с начальным приближением $p_0 = \tilde{f}(u_0, u_n)$, $q_0 = \tilde{g}(u_0, u_n)$. Отметим, что интересующие нас в связи с исследованием реализации технологии предельного перехода компоненты решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) выражаются в следующем виде: $\tilde{y}_1 = v_0 = w_0 + pz_0$ и $x_n = v_n = w_n + q\bar{z}_n$.

Реализация численного метода (2.15) для решения задачи Коши (2.10)–(2.14) включена в разработанную программу, на которую получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Программа для расчета динамики онкомаркеров p53 и Mdm2 и оценки реакции p53-зависимых микроРНК на стрессовые воздействия» №2018612326 (см. приложение). Данная программа является ядром созданного комплекса программ, в которых реализованы численные алгоритмы решения прямых и обратных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием и систем ОДУ высокой размерности, включающие в себя метод шагов, генетический алгоритм BGA и методы решения задачи Коши.

В ходе расчетов при каждом фиксированном n для оценки погрешности первой $\tilde{y}_1(t)$ и последней $x_n(t)$ компонент решения задачи Коши (2.10)–(2.14) в качестве «точного» решения рассматривались компоненты решения $y_1(t)$ и $y_2(t)$ соответствующей системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием, полученные на достаточно подробной расчетной сетке (при нулевых начальных условиях). Из соображений удобства погрешность определялась в матричной норме

$$\varepsilon_n = \max_{1 \leq i \leq N_t} (|y_1(t_i) - \tilde{y}_1(t_i)| + |y_2(t_i) - x_n(t_i)|),$$

где, как и прежде, N_t – число узлов расчетной сетки в методах численного решения прямой задачи. Ниже будем называть ε_n погрешностью «предельного» перехода. Расчеты проводились для числа промежуточных стадий $n \in [4; 4 \cdot 10^5]$. Кроме того, с привлечением правила Рунге анализировалась ошибка вычисления компонент $\tilde{y}_1(t)$ и $x_n(t)$

$$\varepsilon_{max} = \max_{1 \leq i \leq N_t} (2|\tilde{y}_1^h(t_i) - \tilde{y}_1^{h/2}(t_{2i})| + 2|x_n^h(t_i) - x_n^{h/2}(t_{2i})|).$$

Аналогичным образом вводится погрешность численного решения задачи с запаздыванием, которая обозначается $\varepsilon_{max}^{delay}$.

В дополнение к неявному алгоритму для решения задачи Коши (2.10)–(2.14) использовался явный метод Эйлера (в первую очередь – из соображений крайней простоты численной реализации), метод Рунге–Кутты четвертого порядка и метод предиктор-корректор 2-го порядка. Кроме того, отметим, что при использовании перечисленных в данном разделе методов применялась идея метода Зейделя, когда при вычислении решения на новом слое по времени привлекались уже полученные на данном слое значения компонент решений.

Поскольку система (2.10)–(2.13) при некоторых значениях параметров проявляла свойство жесткости, то для ее решения привлекался также метод Гира третьего порядка, реализованный в пакете программ STEP+ [230]. Данный пакет программ разработан сотрудниками ИМ СО РАН им. С. Л. Соболева в качестве инструмента численного интегрирования автономных систем ОДУ и исследования качественных свойств полученных решений.

2.3. Реализация вычислительной схемы анализа связи решений системы ОДУ и дифференциальных уравнений с запаздыванием

2.3.1. Иллюстрация сходимости компонент численных решений

В согласии со схемой численного эксперимента для изучения связи между системой ОДУ и уравнением с запаздыванием [141, 220, 226] на начальном этапе ее реализации покажем сходимость (при увеличении значения n) компонент численных решений системы ОДУ (2.10)–(2.13) с нулевыми начальными данными к компонентам решения задачи с запаздыванием (2.4)–(2.5), (2.8). Расчеты проводились для двух характерных вариантов решений задачи (2.4)–(2.5), (2.8): с предельной точкой и предельным циклом на фазовой плоскости.

Рисунки 2.1а, б иллюстрируют сходимость численного решения системы (2.10)–(2.13) без запаздывания к решению системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием при нулевых начальных условиях и значениях параметров (2.9) с ростом n .

Как уже отмечалось в главе 1, при значениях параметров (2.9) компоненты y_1 и y_2 решения системы (2.4)–(2.5) выходят на стационарный режим, который характеризуется неподвижной точкой (y_1^0, y_2^0) на фазовой плоскости, где $y_1^0 \approx 154.635$ и $y_2^0 \approx 81.31$. На рисунках 2.1а, б видно, что первая и последняя компоненты решения системы (2.10)–(2.13) также выходят на стационарные значения близкие к y_1^0 и y_2^0 соответственно уже при $n = 4$.

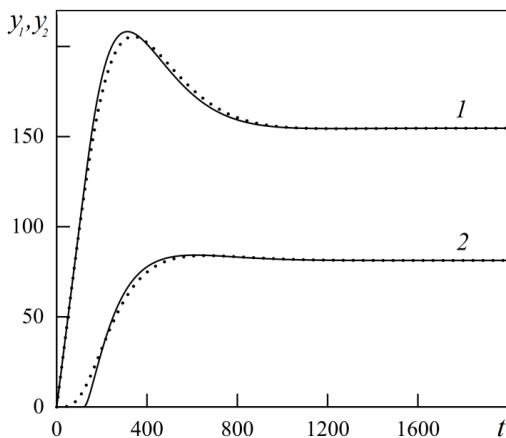


Рисунок 2.1а. Изменение во времени компонент решения системы (2.10)–(2.13) при $n = 4$ (пунктирные линии) и решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) (сплошные линии) при значениях параметров (2.9): 1 – y_1, \tilde{y}_1 , 2 – y_2, x_n .

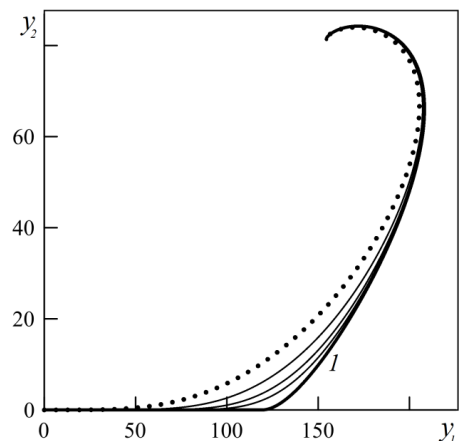


Рисунок 2.1б. Фазовый портрет численных решений системы (2.10)–(2.13) при $n=4$ (пунктирная линия), 8, 16, 32 и решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) (линия 1) при значениях параметров (2.9).

Иллюстрация процесса сходимости для периодического решения при $k_f = 1.8$ приведена на рисунке 2.2. Получено, что при $n \leq 32$ основной вклад в погрешность «предельного» перехода вносит сеточная функция x_n на интервале $(0, \tau_1]$. С увеличением числа n растет количество узлов $t_k \in (0, \tau_1]$ используемой конечно-разностной сетки, в которых значения компоненты решения x_n близки к нулю и, следовательно, близки к значениям решения y_2 системы (2.4)–(2.5) с нулевыми начальными данными. Видно, что с увеличением n период колебаний остается практически неизменным, но происходит изменение амплитуды колебаний, однако уже при $n = 32$ амплитуда колебаний компонент $\tilde{y}_1(t)$ и $x_n(t)$ решения системы (2.10)–(2.13) визуально совпадает с амплитудой компонент решения системы (2.4)–(2.5).

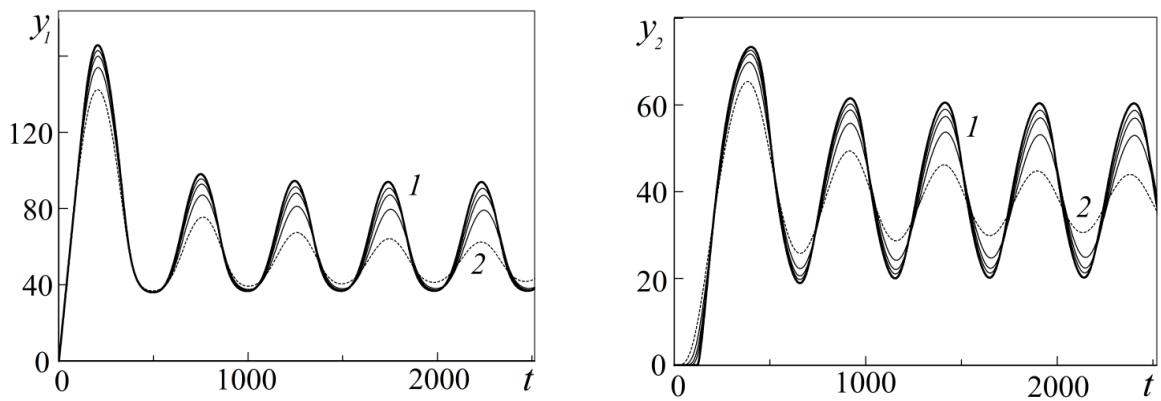


Рисунок 2.2. Зависимость от времени компонент решений системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) (линия 1) и первой и последней компонент решений системы (2.10)–(2.13) при $n = 4$ (линия 2), 8, 16, 32 при $k_f = 1.8$.

Фазовые портреты решений системы (2.10)–(2.13) и системы (2.4)–(2.5) представлены на рисунке 2.3. Видно, что при $k_f = 1.8$ и $n \geq 4$ численные решения задачи Коши (2.10)–(2.14) имеют предельные циклы на фазовой плоскости (\tilde{y}_1, x_n) , последовательность которых с ростом n сходится в себе и к предельному циклу решения системы (2.4)–(2.5).

Таким образом, результаты численных экспериментов указывают на то, что при достаточно малых значениях n решение системы ОДУ (2.10)–(2.13) может существенно отличаться от решения системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием, однако при увеличении n наблюдается сходимость первой и последней компонент решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) в себе и к соответствующим компонентам решения системы (2.4)–(2.5). Эти данные согласуются с предсказаниями, основанными на предельных теоремах.

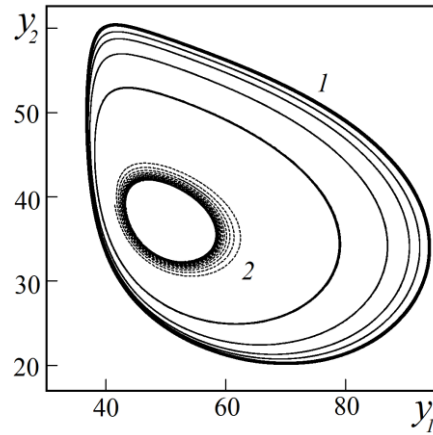


Рисунок 2.3. Фазовый портрет численного решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) (линия 1) и решений системы (2.10)–(2.13) при $n = 4$ (линия 2), 8, 16, 32 при $k_f = 1.8$.

По условиям предельной теоремы (см. [141]) компоненты решения $x_i(t)$ ($2 \leq i \leq n - 1$) системы ОДУ вида (2.1) сходятся к нулю при $n \rightarrow \infty$. На рисунках 2.4а и 2.4б продемонстрированы некоторые полученные решения $x_i(t)$ ($2 \leq i \leq n - 1$) системы (2.10)–(2.13) при $n \geq 8$ для решения, выходящего на стационарное значение, и периодического решения соответственно.

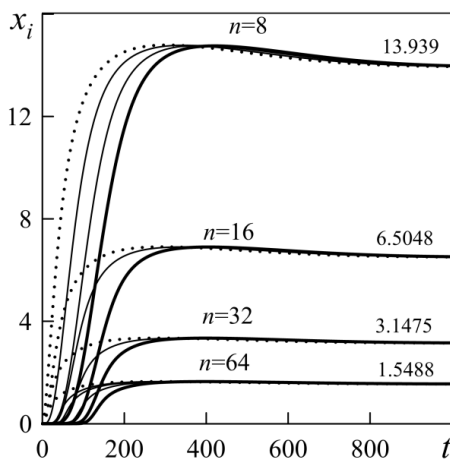


Рисунок 2.4а. Характерные функции $x_i(t)$ при различных значениях n в случае значений параметров (2.9): пунктирные линии – $i = 2$, сплошные жирные линии – $i = n - 1$.

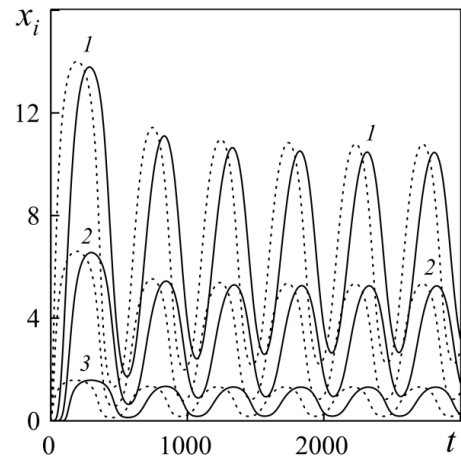


Рисунок 2.4б. Функции $x_2(t)$ и $x_{n-1}(t)$ при $k_f = 1.8$. Линии 1–3 соответствуют расчетам при $n = 8, 16, 64$; пунктирные линии – $i = 2$, сплошные жирные линии – $i = n - 1$.

На рисунках 2.4а и 2.4б видно, что $x_i(t)$ ($2 \leq i \leq n - 1$) обладают тем же типом решения, что и соответствующее решение системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием: выходят на стационарное значение при (2.9) или на режим периодических колебаний при $k_f = 1.8$. При каждом

выбранном числе n с возрастанием номера компоненты i происходит фазовый сдвиг решения x_i по временной шкале на величину, близкую к значению параметра запаздывания $\tau_1 = 120$. Для периодического решения при малых n с увеличением номера компоненты i происходит незначительное изменение амплитуды колебаний функций $x_i(t)$ (см. рисунок 2.4б). Результаты численного анализа решений системы ОДУ (2.10)–(2.13) указывают на то, что с возрастанием n компоненты $|x_i(t)| \rightarrow 0$ для всех типов решения системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием. Последнее согласуется с известными теоретическими результатами и свидетельствует о снижении влияния каждой отдельной стадии на конечный результат при $n \rightarrow \infty$, хотя каждая из этих стадий не может быть проигнорирована (см. также [211]).

2.3.2. Сходимость линий нейтральности

Важным этапом численного исследования связи между моделью с запаздыванием (2.4)–(2.5), (2.8) и моделью без запаздывания (2.10)–(2.14) является анализ сходимости линий нейтральности, который должен продемонстрировать близость (в пределе, при $n \rightarrow \infty$) решений двух моделей по их качественным свойствам. Линии нейтральности представляют собой геометрические места точек фазовой плоскости, координаты которых являются бифуркационными значениями соответствующих параметров моделей.

Ранее, в главе 1, для модели с запаздыванием (2.4)–(2.5), (2.8) с параметрами (2.9) численно были получены и исследованы линии нейтральности в плоскости параметров (τ_1, k_f) и (τ_1, k_g) . Они показаны на рисунках 2.5а и 2.5б (линии I). На настоящем этапе исследований в результате численного анализа были получены дополнительно линии нейтральности для системы ОДУ (2.10)–(2.14), (2.9) при различных n .

На рисунках 2.5а и 2.5б показан процесс сходимости линий нейтральности для системы ОДУ с ростом размерности системы n к линиям нейтральности системы с запаздыванием (линиям I). Расчеты показали, что об определенной близости качественных свойств, а именно – о близости бифуркационных значений соответствующих параметров двух моделей можно говорить, лишь когда размерность системы ОДУ превышает значение $n \approx 100$.

На рисунке 2.5а можно видеть, что каждая из линий нейтральности разделяет плоскость параметров (τ_1, k_f) на две области. Одна из областей (она располагается над каждой линией нейтральности) соответствует стационарным решениям (устойчивым неподвижным точкам на фазовой плоскости). Под каждой линией нейтральности – область периодических колебаний решений (предельных циклов на фазовой плоскости).

Анализ результатов расчетов показал, что при достаточно больших значениях параметра τ_1 можно указать интервал значений k_g , при которых решения имеют предельный цикл на фазовой плоскости (область «внутри» каждой изображенной линии нейтральности в плоскости параметров (τ_1, k_g) на рисунке 2.5б). Таким образом, численный анализ решений задачи Коши (2.10)–(2.14) показал, что с ростом n последовательность линий нейтральности сходится к линиям нейтральностям решения системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием при нулевых начальных условиях.

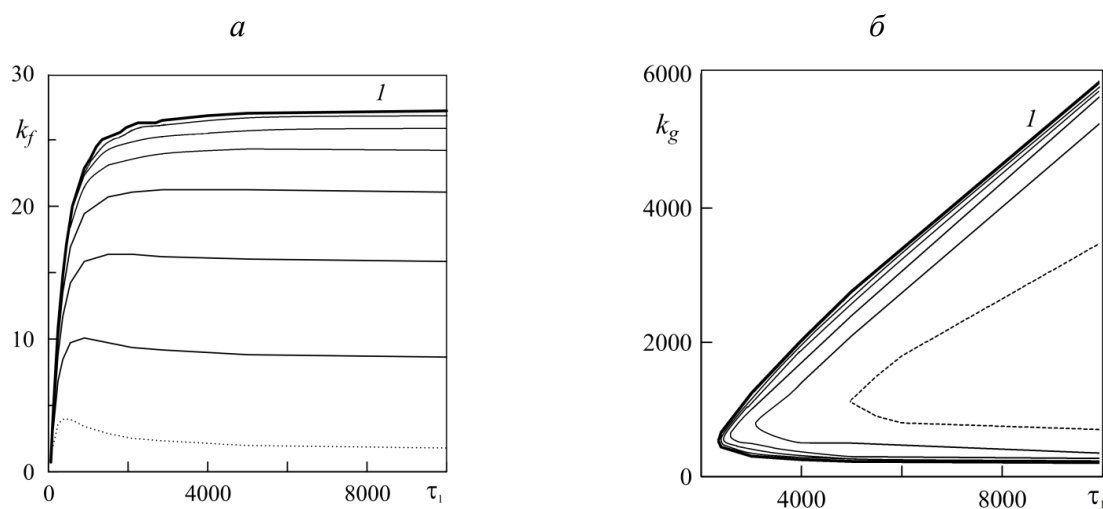


Рисунок 2.5. (а) Линия нейтральности в плоскости параметров (τ_1, k_f) для решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) (линия 1) и последовательность линий нейтральности решений системы (2.10)–(2.13) при $n = 4$ (пунктирная линия), 8, 16, 32, 64, 128, 256.

(б) Линия нейтральности в плоскости параметров (τ_1, k_g) для решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) (линия 1) и последовательность линий нейтральности решений системы (2.10)–(2.13) при $n = 8$ (пунктирная линия), 16, 32, 64, 128.

2.3.3. Численный анализ асимптотического поведения погрешности «предельного» перехода

В данном пункте проанализируем более детально скорость сходимости процесса «предельного» перехода, т.е. сходимости последовательностей компонент решений $\{\tilde{y}_1^n(t)\}$ и $\{x_n^n(t)\}$ системы ОДУ (2.10)–(2.13) при $n \rightarrow \infty$ к компонентам решения $y_1(t)$ и $y_2(t)$ системы уравнений с запаздыванием (2.4)–(2.5) при нулевых начальных условиях. При проведении численных экспериментов размерность системы ОДУ варьировалась в интервале $n \in [4; 3 \cdot 10^5]$. Это дало возможность исследовать при достаточно больших n асимптотическое поведение погрешности «предельного» перехода $\varepsilon_n = \max_{1 \leq i \leq N_t} (|y_1(t_i) - \tilde{y}_1(t_i)| + |y_2(t_i) - x_n(t_i)|)$. При этом будем иметь в виду, что в работе [221] в результате исследования

асимптотической скорости сходимости решения задачи (2.1) к решению задачи (2.3) (и наоборот) получена теоретическая оценка: процесс сходится как $O(n^{-0.5})$. Близкая к этой оценка получена в численных экспериментах [223], где рассматривалось одно уравнение с запаздыванием.

На рисунке 2.6 приведены графики погрешностей «предельного» перехода ε_n в зависимости от n для двух характерных видов решений задачи (2.4)–(2.5), (2.8) – выходящих на стационарный режим (при (2.9)) и на режим с периодическими колебаниями (при $k_f = k_f^0/100$, остальные параметры равны значениям (2.9)). Решение системы ОДУ (2.10)–(2.13) получено двумя численными методами – явным методом Эйлера и неявным методом (2.15). В этих расчетах, так же, как и в [226], шаг расчетной сетки h изменялся по правилу $h = \tau_1/n$ с ростом числа промежуточных стадий n . Дополнительно проводилась серия расчетов, в которой применялось более строгое правило корректировки шага сетки при изменении значения n : полагалось $h = \tau_1/1.5n$. Можно видеть, что при достаточно больших n величина погрешности $\varepsilon_n \rightarrow 0$ и определяется асимптотическим степенным законом n^{-q} , где $q \in [0.5, 1]$ для наиболее употребимых матричных норм, согласованных с евклидовой или чебышевской векторной нормой [145]. Этот результат согласуется с известной теоретической оценкой [221].

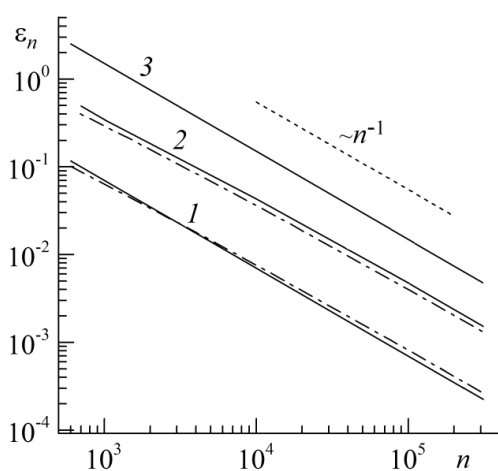


Рисунок 2.6. Изменение погрешности «предельного» перехода ε_n в зависимости от количества промежуточных стадий n : 1 – явный метод Эйлера, $k_f = k_f^0$; 2 – неявный метод (2.15), $k_f = k_f^0$; 3 – явный метод, $k_f = k_f^0/100$. Сплошные линии – $h = \tau_1/n$; штрихпунктирные – $h = \tau_1/1.5n$; пунктир – приближенная степенная зависимость.

2.3.4. Особенности численной реализации «предельного» перехода от системы ОДУ большой размерности к системе с запаздывающим аргументом. Уточнение схемы вычислительного эксперимента

Отметим, что представленный в параграфах 2.3.1–2.3.3 анализ связи решений системы ОДУ и системы с запаздыванием соответствует предложенной в [141, 220, 226] схеме вычислительного эксперимента и условиям «предельного» перехода, обозначенным в предельных теоремах. В настоящем разделе будут обсуждаться некоторые особенности численной реализации «предельного» перехода, которые не учитывает схема вычислительного эксперимента.

При исследовании асимптотического поведения решения задачи Коши (2.10)–(2.14) предполагается, что теоретически при нулевых начальных условиях последовательности первой и последней компонент решений $\{\tilde{y}_1^n(t)\}$ и $\{x_n^n(t)\}$ сходятся к компонентам y_1 и y_2 системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием, когда $n \rightarrow \infty$ и $h \rightarrow 0$. Однако численные эксперименты показывают, что увеличение размерности n системы ОДУ (2.10)–(2.13) может привести к нарушению процесса сходимости и даже к неконтролируемому росту погрешности «предельного» перехода при любых достаточно больших n и весьма малой величине шага по времени h , выбор которого полностью определяется стандартными требованиями аппроксимации, устойчивости и сходимости конкретного численного метода. Причины нарушения сходимости анализировались в ходе серии численных экспериментов, в которых исследовалось влияние на погрешность «предельного» перехода ε_n а) численного метода решения задачи, б) выбора шага расчетной сетки, в) параметров модели, определяющих характер решения задачи.

В рамках этих экспериментов для численного решения задачи Коши для системы ОДУ размерности $n \in [4; 10^5]$ привлекались явный метод Эйлера, полуявный метод Эйлера, реализованный с использованием идеи Зейделя, и неявный метод (2.15). Система дифференциальных уравнений с запаздыванием (2.4)–(2.5) решалась методом шагов с применением метода предиктор-корректор 2-го порядка. В расчетах использовались сетки с постоянным достаточно мелким шагом $h = 0.01$, $h = 0.001$ и $h = 0.0005$, соответствующим требованиям точности и устойчивости численных методов решения задачи Коши. Дополнительно рассматривалась другая стратегия выбора шага сетки при каждом n , в рамках которой, как и в [226], его значение уменьшалось с ростом n размерности системы ОДУ по правилу $h = \tau_1/1.5n$ при сохранении ранее перечисленных требований. В обеих моделях использовался набор значений параметров (2.9), при котором решение выходит на стационар; $\tau_1 = 120$.

На рисунке 2.7 показано изменение погрешности численного решения задачи (2.10)–(2.14) ε_{max} , полученного с применением неявного метода (2.15), в зависимости от n и шага сетки. Здесь же представлены погрешности решения системы уравнений с запаздыванием (2.4)–(2.5) $\varepsilon_{max}^{delay}$ и погрешность «предельного» перехода $\varepsilon_n(n)$. Эти данные, в первую очередь, дают более ясное представление о тех решениях задач в двух рассматриваемых постановках, которые используются при анализе сходимости компонент численных решений. Видно, что погрешность решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) $\varepsilon_{max}^{delay}$ существенно ниже погрешности системы ОДУ (2.10)–(2.13) ε_{max} при одинаковых подходах к выбору шага сетки. Кроме того, при $h = 0.0005$ погрешность ε_{max} при увеличении размерности n системы (2.10)–(2.13) не убывает, а в случае изменения шага (при изменении количества стадий n) расчетной сетки по правилу $h = \tau_1/1.5n$ погрешность ε_{max} убывает с ростом n как n^{-1} .

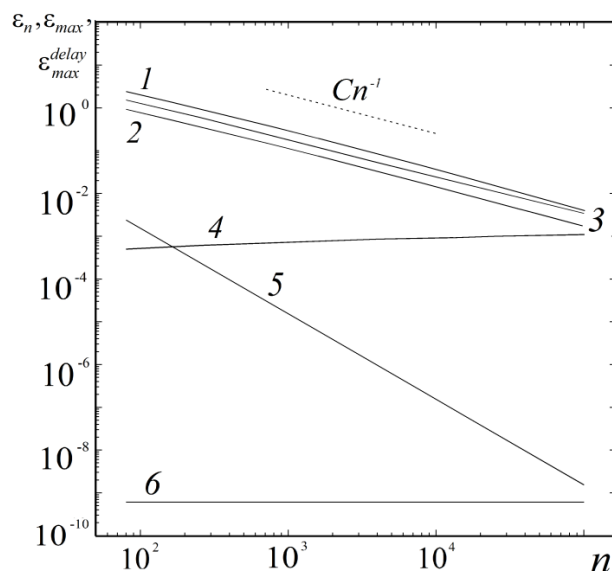


Рисунок 2.7. Изменение величин погрешностей ε_n (линии 1, 3), ε_{max} (линии 2, 4) и $\varepsilon_{max}^{delay}$ (линии 5, 6) в зависимости от числа промежуточных стадий n и выбора шага по времени h : 1, 2, 5 – $h = \tau/1.5n$; 3, 4, 6 – $h = 0.0005$. Пунктирная линия – приближенная степенная зависимость.

Вновь отметим, что для упрощения последующего численного анализа погрешность «предельного» перехода ε_n определяется как норма отклонения первой $\tilde{y}_1(t)$ и последней $x_n(t)$ компонент решения задачи Коши (2.10)–(2.14) от используемых в качестве «точного» решения компонент $y_1(t)$ и $y_2(t)$ решения соответствующей системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием, полученных с достаточно высокой точностью (на весьма подробной сетке методом предиктор-корректор 2-го порядка). В то же время, погрешности ε_{max} и $\varepsilon_{max}^{delay}$, которые можно охарактеризовать как погрешность методов решения системы ОДУ и системы с запаздыванием

соответственно, вычислялись с привлечением последовательности сеточных решений по правилу Рунге.

Рассмотрим сначала решения, полученные с постоянным, не зависящим от числа промежуточных стадий n , шагом сетки ($h = 0.01, 0.001, 0.0005$). На рисунках 2.8а–б приведены данные об изменении погрешности $\varepsilon_n(n)$ для решений системы ОДУ (2.10)–(2.13), вычисленных явным методом Эйлера, полуявным методом Эйлера, реализованным с использованием идеи Зейделя, и неявным методом (2.15). Там же представлена погрешность ε_n численного решения задачи (2.10)–(2.14) при $n = 10^2$, вычисленного с использованием пакета STEP+ [230] на сетке с шагом $h = 10^{-2}$. Для более детального численного анализа процесса сходимости приведены данные о погрешности «предельного» перехода $\varepsilon_n^{y_1}(n)$ и $\varepsilon_n^{y_2}(n)$, вычисленной для компонент вектора решений $\tilde{y}_1(t)$ и $y_1(t)$, $x_n(t)$ и $y_2(t)$ соответственно (погрешность $\varepsilon_n^{y_1}(n)$ и $\varepsilon_n^{y_2}(n)$ оценивалась в чебышевской векторной норме [231]).

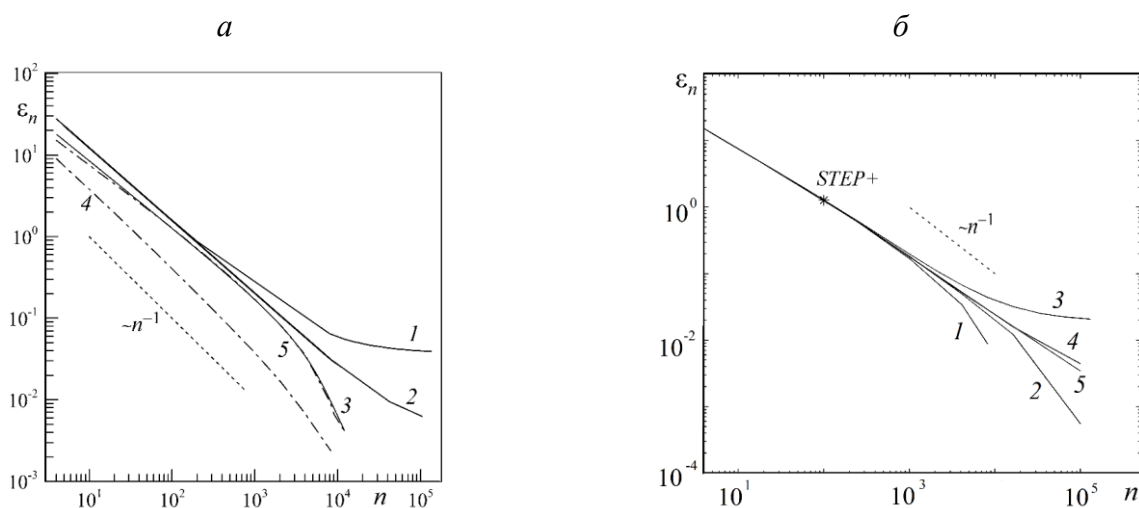


Рисунок 2.8. Изменение погрешности ε_n «предельного» перехода в зависимости от размерности n (числа промежуточных стадий) и численного метода решения системы ОДУ при фиксированном шаге сетки h .

(а) 1 – полуявный метод Эйлера, $h = 0.01$; 2 – полуявный метод Эйлера, $h = 0.001$; 3–5 – явный метод

Эйлера, $h = 0.01$. *Сплошные линии 1–3 – ε_n ; штрихпунктирные – $\varepsilon_n^{y_1}$ (линия 4),*

$\varepsilon_n^{y_2}$ (линия 5); пунктирная – приближенная степенная зависимость.

(б) Явный метод Эйлера: 1 – $h = 0.01$, 2 – $h = 0.001$; неявный метод (2.15): 3 – $h = 0.01$, 4 – $h = 0.001$,

5 – $h = 0.0005$; *пунктирная линия – приближенная степенная зависимость; маркер – метод Гира третьего порядка (реализованный в пакете программ STEP+) при $h = 0.01$.*

Можно видеть, что при достаточно умеренных значениях n зависимость от используемого численного метода решения задач и величины шага сетки проявляется весьма слабо. Интересно, что погрешность «предельного» перехода, вычисленная для компонент вектора решения $\tilde{y}_1(t)$ и $y_1(t)$, оказалась существенно более низкой, чем для компонент $x_n(t)$ и $y_2(t)$. На рисунке 2.8б показано, что только при проведении расчетов с выбором $h = 0.0005$ скорость сходимости

решений в предельном переходе определяется степенным законом n^{-1} на достаточно большом интервале значений $n \in [4; 10^5]$. А при выборе шага по времени $h = 0.01, 0.001$ выхода на степенной закон при достаточно больших n не наблюдается. Дополнительно для решения задачи (2.10)–(2.14) привлекался метод предиктор-корректор 2-го порядка и метод Рунге–Кутты 4-го порядка. Однако проведенный численный анализ показал, что использование этих численных методов слабо влияет на полученный результат исследования сходимости. На рисунке 2.8б показано, что при достаточно больших n возможна ситуация существенного прироста погрешности ε_n с увеличением n и при использовании неявного метода решения задачи Коши для системы ОДУ. Все это означает, что даже при выборе достаточно большой размерности n системы ОДУ (2.10)–(2.13) и весьма малого шага по времени h можно получить некорректный результат «предельного» перехода. То же самое можно сказать и о случае периодического решения или решений при достаточно больших значениях параметра запаздывания, характеризующихся выраженными релаксационными эффектами.

Численный анализ показывает, что одной из главных причин описанных вычислительных трудностей является дисбаланс между погрешностями (разного происхождения), из которых складывается общая погрешность «предельного» перехода при конечных значениях шага сетки. Источниками таких погрешностей в вычислительном эксперименте, как известно, являются погрешности методов решения системы ОДУ и системы с запаздыванием, а при их минимизации – погрешности округления в компьютерных вычислениях. К ним, очевидно, добавляются и «главные» погрешности, вносимые самим переходом от системы ОДУ к системе с запаздыванием (или наоборот).

На справедливость этого утверждения указывают рисунки 2.9 и 2.10, на которых сопоставляются погрешности «предельного» перехода ε_n и погрешности численного метода ε_{max} решения системы ОДУ в зависимости от n , полученные с применением явного метода Эйлера и неявного метода (2.15) соответственно. Как и ранее, в этих расчетах для упрощения анализа численное решение задачи (2.4)–(2.5) с запаздыванием при нулевых начальных условиях, полученное на достаточно подробной сетке $h = 0.0005$, принималось в качестве «точного» при оценке погрешности ε_n (см. рисунок 2.7). Поэтому при дальнейшем анализе погрешностей этот их источник можно (до определенной степени) игнорировать. На рисунке 2.9 можно видеть, что, в частности, при $h = 0.01$ функция $\varepsilon_n(n)$ отклоняется от степенной зависимости тогда (при тех значениях n), когда значения этой функции приближаются по порядку величины к значению ε_{max} решения системы ОДУ. В расчетах при $h \in [0.001, 1]$ наблюдалась аналогичная ситуация. Тот же эффект возникает, когда $\varepsilon_n(n)$ будет сопоставима с погрешностью метода решения начальной задачи для системы с запаздыванием $\varepsilon_{max}^{delay}$. Следует

отметить, что описанная проблема не является уникальной, она в том или ином виде проявляется при проведении приближенных вычислений, в том числе с привлечением компьютеров.

Таким образом, для любой величины шага сетки h можно указать значения n , при которых нарушается процесс сходимости, а значит и связь компонент решений модели без запаздывания (2.10)–(2.14) и решений модели с запаздыванием (2.4)–(2.5), (2.8). Следует иметь в виду, что данная проблема приобретает особую остроту, когда в численных экспериментах речь заходит о связи (или даже замене) конкретной математической модели в виде системы дифференциальных уравнений с запаздыванием и модели в виде системы ОДУ: выбор фиксированных конечных n и h может оказаться неудачным даже при достаточно больших n и при обдуманном выборе h , основанном на свойствах численного метода решения этих задач. Поэтому необходимо определить стратегию выбора «разумных» значений этих параметров для задачи (2.10)–(2.14) (это относится также и к погрешности решения системы с запаздыванием). Кроме того, эта особенность численной реализации перехода (т.е. замены) от модели (2.10)–(2.14) к модели (2.4)–(2.5), (2.8) или наоборот должна быть учтена и в предложенной ранее схеме вычислительного эксперимента [141, 220, 226], доказывающего связь между решениями дифференциального уравнения (или системы уравнений) с запаздывающими аргументами и соответствующей системы ОДУ высокой размерности.

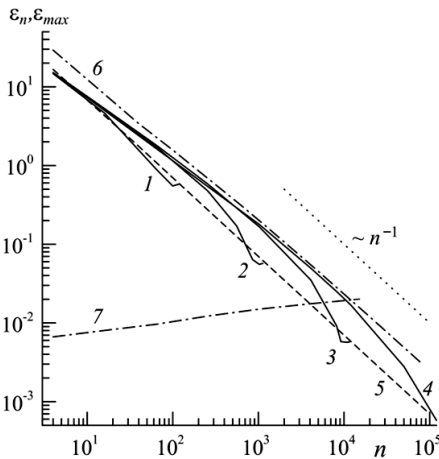


Рисунок 2.9. Изменение погрешностей ε_n (линии 1–5) и ε_{max} (линии 6, 7) решений, вычисленных явным методом Эйлера, в зависимости от n и выбора величины h : 1 – $h = 1$; 2 – $h = 0.1$; 3, 7 – $h = 0.01$; 4 – $h = 0.001$; 5, 6 – $h = \tau_1/n$; пунктирная линия – приближенная степенная зависимость.

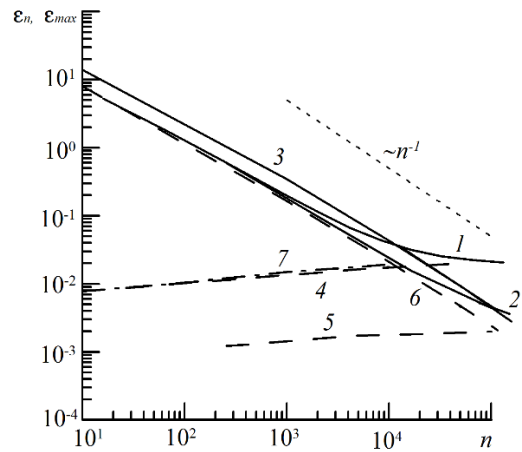


Рисунок 2.10. Изменение погрешностей ε_n (линии 1–3) и ε_{max} (линии 4–6) решений, вычисленных неявным методом (1.15), и ε_{max} (линия 7) – явным методом Эйлера в зависимости от n и выбора величины h : 1, 4 – $h = 0.01$; 2, 5 – $h = 0.001$; 3, 6 – $h = \tau_1/n$; 7 – $h = 0.01$; пунктирная линия – приближенная степенная зависимость.

Вслед за [219] в качестве одной из стратегий выбора значений n и h был рассмотрен подход, при котором шаг по времени изменялся обратно пропорционально размерности системы ОДУ (2.10)–(2.13) $h = \tau_1/n$. Следует отметить, что в случае математического моделирования химических, биологических, физических и т.д. процессов представленная стратегия не всегда позволяет учитывать связь шага расчетной сетки с «физическими» условиями рассматриваемой задачи. Данный недостаток, в частности, играет определенную роль при умеренных значениях n (размерности системы ОДУ, которая определяет количество учитываемых моделью стадий реального многостадийного процесса), которые преимущественно используются в больших сериях вычислений. Он особенно заметен в случаях жесткой системы, когда требования к шагу сетки, связанные с устойчивостью численного решения, становятся чрезвычайно высокими. На рисунке 2.9 сопоставляются графики погрешности «предельного» перехода ε_n и погрешности ε_{max} для решений системы ОДУ (2.10)–(2.13), вычисленных явным методом Эйлера при постоянных значениях $h = 1, 0.1, 0.01, 0.001$ и при шаге $h = \tau_1/n$. Видно, что в случае достаточно малых значений n при постоянном шаге ($h = 0.01$) погрешность ε_{max} ниже, чем при варьируемом шаге $h = \tau_1/n$ (см. линии 3, 6 и 7 на рисунке 2.9). Однако, подход с шагом $h = \tau_1/n$ (линия 5) можно считать близким к оптимальному, при котором значения ε_n и ε_{max} имеют одинаковый порядок сходимости. Анализ погрешностей решений системы ОДУ (2.10)–(2.13), полученных с применением неявного метода (2.15), также показал, что при $h = \tau_1/n$ величины ε_n и ε_{max} изменяются с ростом n по весьма близким законам, причем всегда $\varepsilon_{max} < \varepsilon_n$ (см. рисунок 2.10), что указывает на близость данного подхода к оптимальному и при использовании неявного метода (2.15).

Анализ результатов численных экспериментов свидетельствует о том, что для получения «разумного» результата перехода от задачи с запаздыванием к задаче Коши для системы ОДУ или наоборот в расчетах следует учитывать условие приближенного вида $h \leq C\tau_1/n$. Значение постоянной C определяется на основе численного анализа в зависимости от используемого для решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) численного метода. Так, например, для явного метода Эйлера $C \approx 1$ и условие $h \leq C\tau_1/n$ можно рассматривать в качестве условия курантовского типа, которое гарантирует устойчивый счет. Для неявного метода первого порядка (2.15) при нарушении соотношения $h \leq C\tau_1/n$ даже при малых h наблюдается нарушение сходимости компонент вектора решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) к компонентам решения системы (2.4)–(2.5). Значение константы C для неявного метода также следует считать $C \approx 1$, поскольку при $C > 1$ наблюдается существенное замедление или прекращение убывания $\varepsilon_n(n)$. Отметим, что

полученная оценка для C гарантирует эффективный счет не только при относительно малых значениях параметра τ_1 , но также и при достаточно больших (например, при $\tau_1 = 1200$).

Представленное условие численной реализации «предельного» перехода $h \leq C\tau_1/n$ определено в результате анализа большой серии вычислительных экспериментов и не претендует на роль строгой оценки. Однако его выполнение при увеличении размерности n приводит к сходимости первой и последней компонент вектора решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) к компонентам решения системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием при нулевых начальных условиях. Кроме того, полученное соотношение позволяет определить «оптимальные» значения n и h , при которых достигается достаточно высокая точность замены $\tilde{y}_1(t)$ и $x_n(t)$ на $y_1(t)$ и $y_2(t)$ или наоборот.

В практических целях представляет интерес оценить значения параметров h и n для достижения точности решения система ОДУ (2.10)–(2.13), сопоставимой с точностью решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) при нулевых начальных условиях. Так, если в случае значений параметров (2.9) при $\tau_1 = 120$ рассматривать в качестве вполне приемлемого значение погрешности решения системы с запаздыванием (2.4)–(2.5) $\varepsilon_{max}^{delay} \approx 10^{-2}$ (полученного с применением метода предиктор-корректор 2-го порядка), то для достижения близкой точности число обыкновенных дифференциальных уравнений в системе (2.10)–(2.13) должно лежать в следующем интервале значений: $n \in [8000; 12000]$ (при использовании в расчетах явного метода Эйлера решения системы ОДУ) и $n \in [30000; 50000]$ (при использовании неявного метода (2.15)). Отметим, что данное значение $\varepsilon_{max}^{delay}$ составляет менее 0.01% относительно стационарного решения и, следовательно, его можно считать несколько завышенным при проведении вычислений. Поэтому в практических целях можно использовать системы ОДУ с числом уравнений, по крайней мере, на 1 порядок меньше (при выполнении всех упоминавшихся условий).

Интересно отметить, что полученное условие $h \leq C\tau/n$, где τ – параметр запаздывания, n – число промежуточных стадий (размерность системы ОДУ), h – шаг конечно-разностной сетки, можно представить как $n \leq CM$, где $M = \tau/h \gg 1$ (натуральное число) вводится (см. раздел 1.2.1) в методе последовательного интегрирования (методе шагов) начальной задачи для уравнения с запаздыванием как величина, фактически определяющая расчетную сетку на интервале времени, равном величине запаздывания. Нельзя не отметить, что конкретный выбор M обусловлен требованиями достаточной точности и устойчивости численного решения задачи. Отсюда следует, что условие $h \leq C\tau/n$, в определенной мере, можно рассматривать как требование «синхронизировать» алгоритмы решения задачи, включающей уравнения с

запаздыванием, и соответствующей ей системы ОДУ, а также размерность самой этой системы (т.е. количество введенных промежуточных стадий).

Полученное в результате численного анализа условие $h \leq C\tau/n$ дополнительно проверялось на представленной в [141, 213] модели многостадийного процесса синтеза вещества вида (2.1):

$$\begin{aligned}\frac{dx_1}{dt} &= \sigma(x_n) - \frac{n-1}{\tau}x_1, \\ \frac{dx_2}{dt} &= \frac{n-1}{\tau}(x_1 - x_2), \\ &\dots \\ \frac{dx_{n-1}}{dt} &= \frac{n-1}{\tau}(x_{n-2} - x_{n-1}), \\ \frac{dx_n}{dt} &= \frac{n-1}{\tau}x_{n-1} - \lambda x_n, \\ x_1(0) &= x_2(0) = \dots = x_n(0) = 0.\end{aligned}$$

В [213] основное внимание уделялось теоретическим аспектам предельного перехода от системы ОДУ (2.1) к решению уравнения с запаздыванием (2.3) при нулевых начальных условиях:

$$\frac{dy}{dt} = \sigma(y(t - \tau)) - \lambda y(t), \quad t > \tau, \quad y(t) = 0 \text{ при } t \leq \tau.$$

В работе [141] была детально реализована предложенная в [141, 220, 224] схема вычислительного эксперимента, которая демонстрировала сходимость в себе и к решению уравнения с запаздыванием $y(t)$ последовательности $x_n(t)$ при достаточно больших n в точном соответствии с условиями предельной теоремы [141, 217]. В рассматриваемой модели полагалось, в частности, $\sigma(x) = \frac{\alpha}{1 + \beta x^\gamma}$. В настоящей работе также была рассмотрена данная задача при следующих значениях параметров: $\alpha = 2$, $\beta = 1$, $\gamma = 5$, $\lambda = 1$, $\tau = 2$ [141]. Численное решение системы ОДУ (2.1) проводилось с привлечением явного метода Эйлера, количество «промежуточных» стадий n варьировалось в диапазоне от 10 до $2 \cdot 10^4$, шаг сетки $h \in [10^{-4}; 0.2]$. Основная цель данной работы – проверка полученного условия, уточняющего ранее предложенную схему.

В ходе численных экспериментов получено, что при достаточно большом количестве «промежуточных» стадий n может наблюдаться нарушение процесса сходимости последней компоненты решения системы ОДУ (2.1) к решению уравнения с запаздыванием (2.3) при нулевых начальных данных. Численный анализ погрешностей перехода показал, что при численной реализации «предельного» перехода для данной задачи, как и для задачи (2.10)–(2.14), необходимо выполнение условия $h \leq C\tau/n$, причем $C \approx 1$.

2.3.5. Реализация «предельного» перехода в задаче о функционировании системы p53-Mdm2 в раковых клетках. Численное решение обратной коэффициентной задачи для модели в виде системы ОДУ

Полученные выводы об условии, обеспечивающем в численных экспериментах сходимость компонент вектора решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) к компонентам решения системы (2.4)–(2.5) с запаздыванием при нулевых начальных условиях, дополнительно проверялись на модели функционирования системы p53-Mdm2 в раковых клетках.

Как и прежде, в численных экспериментах рассматривалась последовательность численных решений систем ОДУ, размерность которых n варьировалась в достаточно широком интервале значений. В согласии с предельными теоремами [141, 217, 222] при достаточно больших n может быть обнаружена связь решений системы ОДУ и уравнения с запаздыванием одного и того же класса.

В предыдущих разделах на примере модели достаточно общего вида была детально проанализирована связь системы уравнений (2.4)–(2.5) с запаздыванием (функции $f(x_1, x_2, k)$ и $g(x_1, x_2, k_g, k_f)$), как и прежде, определяются (2.6) и (2.7) соответственно):

$$\begin{aligned}\frac{dy_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \\ \frac{dy_2}{dt} &= b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t),\end{aligned}$$

и системы ОДУ (2.10)–(2.13):

$$\begin{aligned}\frac{d\tilde{y}_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(\tilde{y}_1, x_n, k_f) - a_3 \tilde{y}_1, \\ \frac{dx_1}{dt} &= b_1 g(\tilde{y}_1, x_n, k_g, k_f) - \frac{n-1}{\tau_1} x_1, \\ \frac{dx_j}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} (x_{j-1} - x_j), \quad (j = 2, \dots, n-1) \\ \frac{dx_n}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} x_{n-1} - b_2 x_n,\end{aligned}$$

при нулевых начальных условиях. А в данном разделе полученные результаты о наличии связи этих систем и уточнении схемы вычислительного эксперимента проверяются на задаче о функционировании системы p53-Mdm2 в условиях, приближенных к условиям лабораторного эксперимента [13].

В экспериментальной работе [13] приведены данные о динамике p53 и Mdm2 в раковых клетках линии U2OS при воздействии относительно большой (100 мкмоль/л) дозы противоопухолевого препарата этопозид. Получено, что в данных условиях уровень p53 монотонно возрастает, а уровень белка Mdm2 сохраняется на достаточно низком уровне.

Отметим, что данная задача рассматривалась в разделе 1.4.1 главы 1 с привлечением системы с запаздыванием, совпадающей с (2.4)–(2.5); там же можно найти более подробное описание лабораторного исследования [13]. Предполагаем теперь, что для решения этой же задачи может быть использована система ОДУ (2.10)–(2.13), в которой переменные $x_1(t), \dots, x_n(t)$ описывают гипотетические промежуточные стадии передачи сигнала о повреждении ДНК в системе p53–Mdm2 при воздействии этопозиды.

Как и в главе 1, для модели с запаздыванием, ставилась задача определения оптимального набора параметров модели (2.10)–(2.14), обеспечивающего близость ее решения (в смысле минимума функционала) к экспериментальным данным [13]. При решении обратной коэффициентной задачи (технология детально описана в главе 1) число «промежуточных» стадий n полагалось неизвестным параметром, подлежащим определению. Полученные оптимальные значения параметров модели (2.10)–(2.14), а также определенный в разделе 1.4.1 (см. таблицу 1.1) набор оптимальных значений параметров для модели с запаздыванием представлены в таблице 2.1. Видно, что оптимальные значения параметров для обеих моделей весьма близки. При этом близость решения задачи (2.10)–(2.14) к экспериментальным данным достигается уже при весьма малом $n \approx 24$ (медианное значение составляло $n = 25$ на выборке из 20 запусков BGA).

Таблица 2.1 – Оптимальные значения параметров моделей (2.4)–(2.5) и (2.10)–(2.13), полученные при описании экспериментальных данных [13] для случая воздействия высокой дозой (100 мкмоль/л) этопозиды.

a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	k_f	k_g	τ_1
Модель с запаздыванием (2.4)–(2.5)							
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 без запаздывания (2.10)–(2.13)							
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

На рисунке 2.11 приведены графики решений модели на основе уравнений с запаздыванием (2.4)–(2.5) и графики первой и последней компоненты решения модели на основе системы ОДУ (2.10)–(2.13) при оптимальных значениях параметров, а также лабораторные измерения [13]. Видно, что численные решения обеих моделей достаточно хорошо согласуются с экспериментальными данными изменения уровня белков p53 и Mdm2 в раковых клетках при воздействии 100 мкмоль/л этопозиды.

Далее проводился численный анализ связи первой и последней компонент вектора решения системы ОДУ (2.10)–(2.13) и компонент вектора решения системы (2.4)–(2.5) с учетом (2.6), (2.7) при нулевых начальных условиях (в этом случае параметры принимались

одинаковыми для двух систем и равными параметрам модели с запаздыванием (2.4)–(2.5)). Для анализа погрешности «предельного» перехода в расчетах число гипотетических «промежуточных» стадий n варьировалось от 10 до $2 \cdot 10^5$, шаг разностной сетки изменялся в следующем диапазоне $h \in [10^{-3}; 10^{-1}]$. При выполнении условия $h \leq \frac{C\tau_1}{n}$ значения погрешности «предельного» перехода убывают с увеличением n как n^{-1} .

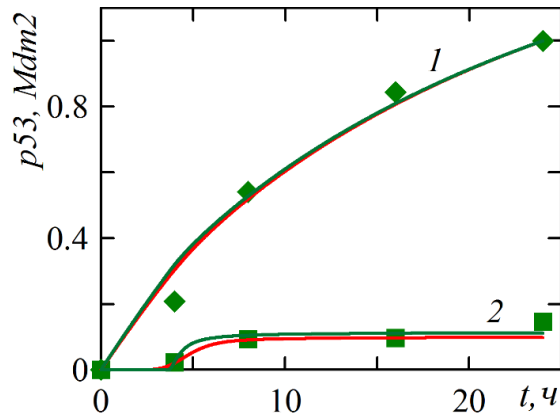


Рисунок 2.11. Относительное изменение уровней белков p53 (линии 1 – модель, ромбы – экспериментальные данные [13]) и Mdm2 (линии 2 – модель, квадраты – экспериментальные данные [13]) под воздействием 100 мкмоль/л этопозида: зеленые линии – решение модели (2.4)–(2.5), красные линии – решение модели (2.10)–(2.13).

Таким образом, численные эксперименты с привлечением математической модели динамики системы p53–Mdm2 подтверждают, что схема численного эксперимента, исследующего связь между решениями системы ОДУ и решениями уравнения с запаздывающим аргументом при нулевых начальных условиях, должна быть дополнена требованием выполнения условия $h \leq C\tau/n$.

2.4. Связь решений системы ОДУ высокой размерности и системы уравнений с запаздывающими аргументами в моделях динамики системы p53–ингибитор–микроРНК

В настоящем разделе предпринята попытка исследования связи решений системы ОДУ большой размерности и системы с запаздывающими аргументами в модели динамики p53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с прямой положительной зависимостью от p53, в которой фигурирует два параметра запаздывания.

Рассмотрим представленную в главе 1 модель в виде нелинейной системы уравнений с запаздывающими аргументами:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (2.18)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t), \quad (2.19)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 y_1(t - \tau_2) - c_3 y_3(t), \quad (2.20)$$

где, как и прежде, y_1, y_2, y_3 – уровни p53, белка-ингибитора p53 и микроРНК соответственно, смысл параметров определен в главе 1, взаимодействие белков, определяется функциями:

$$(u, v, k) = \frac{1}{2} \left(u + v + k - \sqrt{(u + v + k)^2 - 4uv} \right), \quad (2.21)$$

$$(u, v, k_g, k_f) = \frac{u - f(u, v, k_f)}{u + k_g - f(u, v, k_f)}. \quad (2.22)$$

Начальные условия для системы (2.18)–(2.22) с запаздыванием задаются в следующем виде:

$$y_q(\theta) = 0, \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2), \quad q = 1, 2, 3. \quad (2.23)$$

Как и в главе 1, базальный набор значений параметров составляет:

$$\begin{aligned} a_1 = a_1^0 = 1, \quad b_1 = b_1^0 = 1, \quad c_1 = c_1^0 = 1, \\ a_2 = a_2^0 = 3 \cdot 10^{-2}, \quad b_2 = b_2^0 = 10^{-2}, \quad c_2 = c_2^0 = 1, \\ a_3 = a_3^0 = 10^{-4}, \quad c_3 = c_3^0 = 1, \quad k_f = k_f^0 = 180, \quad k_g = k_g^0 = 28. \end{aligned} \quad (2.24)$$

Для численного решения задачи привлекался метод предиктор-корректор 2-го порядка.

Рассмотрим также систему ОДУ, которая получена из системы (2.18)–(2.22) путем замены каждого дифференциального уравнения с запаздывающим аргументом системой ОДУ размерности n с привлечением идеи гипотетических генных сетей с линейным представлением промежуточных стадий функционирования системы p53–ингибитор и p53–микроРНК:

$$\begin{aligned} \frac{d\tilde{y}_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(\tilde{y}_1(t), x_n(t), k_f) - a_3 \tilde{y}_1(t), \\ \frac{dx_1}{dt} &= b_1 g(\tilde{y}_1, x_n, k_g, k_f) - \frac{n-1}{\tau_1} x_1, \\ \frac{dx_k}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} (x_{k-1} - x_k), \quad (k = 2, \dots, n-1) \\ \frac{dx_n}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} x_{n-1} - b_2 x_n, \\ \frac{dX_1}{dt} &= c_2 \tilde{y}_1 - \frac{m-1}{\tau_2} X_1, \end{aligned} \quad (2.25)$$

$$\frac{dX_j}{dt} = \frac{m-1}{\tau_2} (X_{j-1} - X_j), \quad (j = 2, \dots, m-1)$$

$$\frac{dX_m}{dt} = c_1 + \frac{m-1}{\tau_2} X_{m-1} - c_3 X_m.$$

Здесь функции x_i ($i = 1, \dots, n$) описывают «промежуточные» стадии в системе р53–белок-ингибитор, а X_j ($j = 1, \dots, m$) – в системе р53–микроРНК. Как и выше, в качестве начальных условий примем $\tilde{y}_1(0) = 0$, $x_i(0) = 0$, $X_j(0) = 0$, $i = 1, \dots, n$, $j = 1, \dots, m$, что позволяет при численном анализе опираться на условия представленной выше предельной теоремы [141].

Расчеты проводились при $\tau_1 = 120$ и $\tau_2 = 60, 120, 240$ с привлечением явного метода Эйлера и идеи метода Зейделя. В ходе численных экспериментов число гипотетических «промежуточных» стадий n и m изменялось в диапазоне от 4 до 10^5 (поочередно или одновременно); использовались обе стратегии выбора шага разностной сетки – $h = 0.01$ и $h = \tau/k$, где $k = \max(n, m)$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2)$.

Анализ результатов проведенных численных экспериментов указывает на то, что при нулевых начальных условиях компоненты $\tilde{y}_1(t)$, $x_n(t)$, $X_m(t)$ решения системы ОДУ (2.25) сходятся к компонентам $y_1(t)$, $y_2(t)$, $y_3(t)$ решения системы с запаздыванием (2.18)–(2.20) при $n \rightarrow \infty$, $m \rightarrow \infty$ и $h \rightarrow 0$. При этом погрешность «предельного» перехода убывает с ростом n и m как k^{-1} ($k = \max(n, m)$). На рисунке 2.12 процесс сходимости решений в случае базальных значений параметров (2.24) продемонстрирован на фазовой плоскости ($p53$, miR). В случае периодических решений системы (2.18)–(2.20) (например, при $k_f = k_f^0/100$) получены аналогичные результаты.

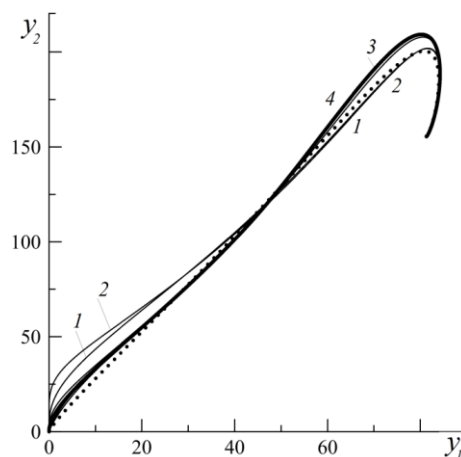


Рисунок 2.12. Сходимость последовательности компонент решений системы ОДУ (2.25) при $n = m = 4$ (пунктирная линия); $n = 16, m = 4$ (линия 1); $n = 64, m = 4$ (линия 2); $n = 64, m = 16$ (линия 3); $n = m = 64$ (линия 4) к решению системы с запаздыванием (2.18)–(2.20) (сплошная жирная линия) при базальных значениях параметров (2.24).

Численный анализ погрешностей «предельного» перехода показывает, что, как и в случае системы (2.10)–(2.13), скорость сходимости компонент решений системы ОДУ (2.25) к решениям системы с запаздыванием (2.18)–(2.20) определяется асимптотическим степенным законом, только если $n \leq C\tau_1/h$ и $m \leq C\tau_2/h$.

Для последующих исследований важно также рассмотреть особенности «предельного» перехода в математической модели, где прямая положительная связь р53–микроРНК аппроксимируется функцией типа Гольдбетера–Кошланда:

$$\begin{aligned}\frac{dy_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \\ \frac{dy_2}{dt} &= b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t), \\ \frac{dy_3}{dt} &= c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t).\end{aligned}\tag{2.26}$$

Как и прежде, y_1, y_2, y_3 – уровни белка р53, белка-ингибитора р53 и микроРНК соответственно; a_1 и c_1 – константы скорости генерации белка р53 и микроРНК; a_2 – константа скорости деградации р53 под влиянием белка-ингибитора; a_3, b_2, c_3 – константы скорости деградации р53, белка-ингибитора и микроРНК; b_1 и c_2 – константы скорости р53-зависимой генерации белка-ингибитора и микроРНК; параметры k_f и k_g описывают уровень взаимосвязи р53 и белка-ингибитора; параметры τ_1 и τ_2 определяют время запаздывания реакции белка-ингибитора и микроРНК на изменение концентрации белка р53. Здесь вводится дополнительный параметр k_p , роль которого состоит в том, чтобы обеспечивать «тонкую настройку» уровня взаимосвязи р53–микроРНК. В качестве начальных условий для системы (2.26) используются нулевые функции «истории». Отметим, что более подробное исследование модели (2.26), включая вопрос о выборе базальных значений параметра, будет проведено в главе 3.

Рассмотрим связанную с системой (2.26) систему ОДУ:

$$\begin{aligned}\frac{d\tilde{y}_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(\tilde{y}_1(t), x_n(t), k_f) - a_3 \tilde{y}_1(t), \\ \frac{dx_1}{dt} &= b_1 g(\tilde{y}_1, x_n, k_g, k_f) - \frac{n-1}{\tau_1} x_1, \\ \frac{dx_k}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} (x_{k-1} - x_k), \quad (k = 2, \dots, n-1) \\ \frac{dx_n}{dt} &= \frac{n-1}{\tau_1} x_{n-1} - b_2 x_n, \\ \frac{dX_1}{dt} &= c_2 f(\tilde{y}_1, X_m, k_p) - \frac{m-1}{\tau_2} X_1,\end{aligned}\tag{2.27}$$

$$\frac{dX_j}{dt} = \frac{m-1}{\tau_2} (X_{j-1} - X_j), \quad (j = 2, \dots, m-1)$$

$$\frac{dX_m}{dt} = c_1 + \frac{m-1}{\tau_2} X_{m-1} - c_3 X_m.$$

Численные эксперименты, демонстрирующие связь решений этих двух моделей, проводились с использованием явного метода Эйлера (из соображений простоты численной реализации). Значения n и m варьировались от 4 до 10^5 ; анализировались две стратегии выбора шага сетки по времени – $h = 0.01$ и $h = \tau/k$, где $k = \max(n, m)$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2)$.

Результаты анализа перехода от системы ОДУ (2.27) к системе (2.26) с запаздыванием, в которой фигурирует два параметра запаздывания, при нулевых начальных условиях подтверждают ранее сформулированные выводы о сходимости компонент решений при $n \rightarrow \infty$, $m \rightarrow \infty$ и $h \rightarrow 0$. Иллюстрация сходимости в случае периодических решений (при $k_f = k_f^0/100$) приведена на рисунке 2.13. Как и прежде, в численных экспериментах сходимость компонент решений определяется указанным степенным законом, только если выполняются соотношения $n \leq C\tau_1/h$ и $m \leq C\tau_2/h$.

Подведем итог. В данной главе рассматриваются две взаимосвязанные математические модели одного и того же биологического объекта. Модель, представляющая механизм функционирования центрального сегмента сигнального пути p53 – петли отрицательной обратной связи p53–белок-ингибитор и (в последнем разделе) прямой положительной связи p53–микроРНК – как многостадийный процесс, построена на основе известной идеи гипотетических генных сетей с линейным представлением промежуточных стадий [211].

Гипотетические генные сети следует рассматривать как идеализированный объект, который с точки зрения системного анализа представляет собой большую систему с чрезвычайно сложной структурой и организацией. Каждый элемент этой системы может состоять из множества (десятков, сотен или даже тысяч) элементов разной природы и сложности, включая гены, различные РНК и белки, кодируемые этими генами, микроРНК, комплексы между ферментами и их мишенями, и все они связываются между собой посредством сложных нелинейных биохимических процессов синтеза и деградации веществ [211]. Таким образом, биологическая сущность промежуточных стадий в представленной математической модели не может быть определена с полной достоверностью из-за чрезвычайной сложности и запутанности исследуемой системы (по крайней мере, на настоящем этапе развития биологической науки). Известно, тем не менее, что промежуточные стадии, пусть даже в самом упрощенном линейном виде, отражают сложные и разветвленные процессы функционирования молекулярно-генетических систем в их пространственно-временной

динамике, в которых могут быть одновременно задействованы как внешние сигналы (поступающие извне вещества), так и синтезируемые самой генной сетью внутренние сигналы.

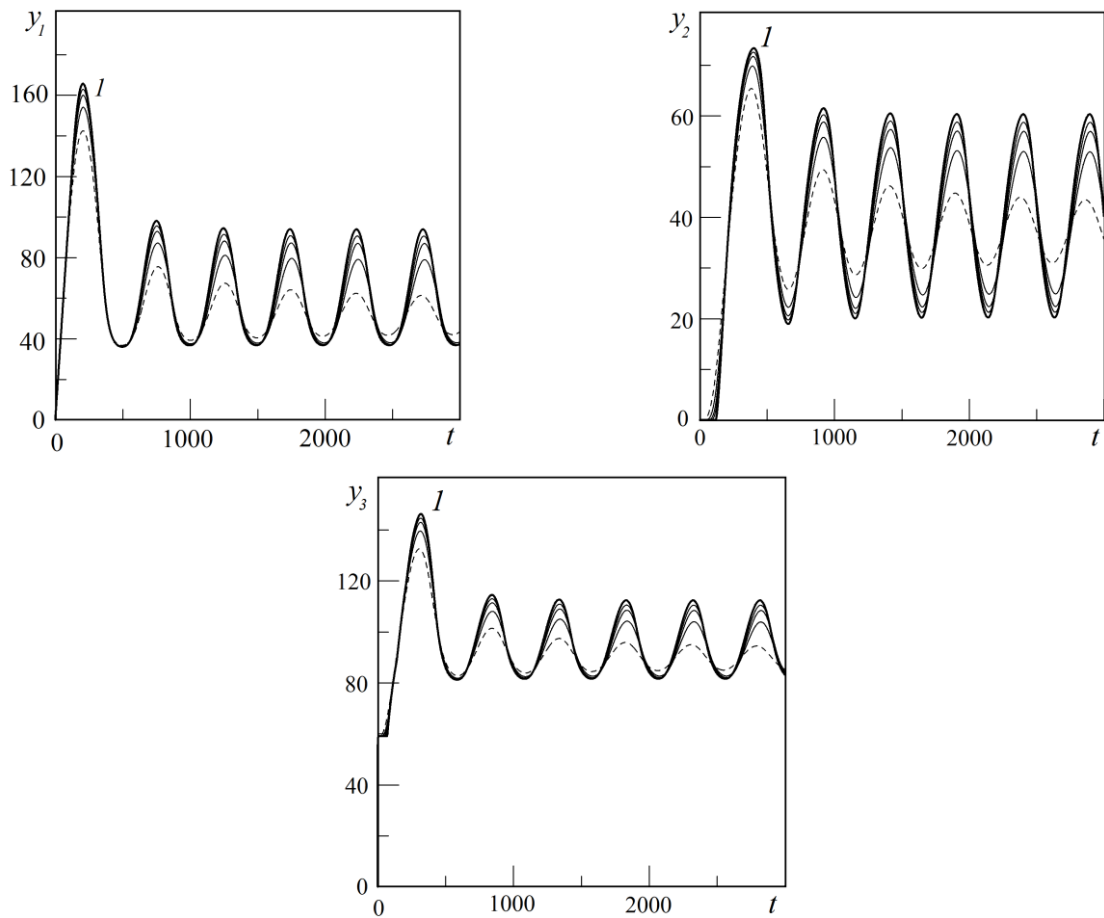


Рисунок 2.13. Сходимость последовательности компонент решений системы ОДУ (2.27) при $n = t = 4$ (пунктирная линия), 8, 16, 32, 64 к решению системы с запаздыванием (2.26) (линия I) при $k_f = k_f^0/100$.

Следует отметить, что при моделировании функционирования системы на больших интервалах времени протекания процессов, например, при каких-либо заболеваниях, внешние сигналы, представляющие, возможно, отдельные механизмы или стадии патогенеза заболеваний на макроуровне, по-видимому, становятся доминирующими.

Тесная связь «многостадийной модели» с соответствующей минимальной «моделью с запаздыванием» подтверждена результатами численных экспериментов. Полученные в данной главе результаты численного анализа согласуются с результатами анализа более общих гипотетических генных сетей [141, 211–229]. Принятую в настоящей «многостадийной модели» гипотезу о линейном представлении отдельных стадий, безусловно, следует считать лишь первым приближением реальных нелинейных процессов, являющихся совокупностями биохимических реакций. По мере того, как в модель вводится все больше промежуточных

более мелких стадий, каждая из них, возможно, приближается к уровню описания некоторых элементарных биохимических событий.

В [211] высказывается точка зрения, что изучение предельных переходов в моделях систем, описывающих многостадийный синтез вещества, «подводит точную теоретическую базу под интуитивное понимание того, что при определенных условиях для адекватного моделирования процессов на макроуровне не требуется полного знания механизмов функционирования системы на ее микроуровнях». Выполненное в настоящей работе исследование связи многостадийной модели и соответствующей минимальной модели с запаздыванием свидетельствует в пользу этой точки зрения.

Уточнение схемы проведения вычислительного эксперимента в виде условия, связывающего выбор шага сетки с количеством введенных в модель промежуточных стадий, имеет важное значение для организации больших серий расчетов, направленных на исследование предельного перехода и поиск «реалистичной» модели многостадийного биохимического процесса.

Результаты главы 2

1. Показана достаточно высокая эффективность разработанного ранее численного алгоритма, ориентированного на решение прямых и обратных задач для систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами, при численном решении соответствующих задач для систем ОДУ высокой ($n \gg 10$) размерности. Дополнительно для модели функционирования системы р53–белок-ингибитор разработан и реализован в рамках программного комплекса численный алгоритм решения задачи Коши для нелинейной системы ОДУ высокой ($n \gg 10$) размерности, основанный на неявной разностной схеме первого порядка, которая сводит решение задачи к аналитическому решению трех СЛАУ и численному решению системы нелинейных алгебраических уравнений; выполнено сопоставление с известными численными методами решения задачи Коши того же порядка и показано, что неявная схема имеет определенные преимущества при $n > 1000$ и подтверждает полученные с их применением результаты численного анализа решений поставленных задач.
2. Для ряда математических моделей функционирования системы р53–белок-ингибитор и системы р53–белок-ингибитор–микроРНК, основанных на использовании функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием, численно показана связь с моделями в виде системы ОДУ высокой размерности, которые описывают функционирование системы как

многостадийный процесс с привлечением известной идеи гипотетических генных сетей с линейным представлением промежуточных стадий. Реализована вычислительная схема анализа «предельного» перехода от системы ОДУ высокой размерности к системе функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием при нулевых начальных условиях. Получено согласие с известными теоретическими результатами.

3. Впервые показано, что в численных экспериментах с ростом числа промежуточных стадий n скорость сходимости первой и последней компонент вектора решения системы ОДУ к решению уравнения с запаздыванием определяется асимптотическим степенным законом, согласующимся с известной теоретической оценкой, только если $h \leq C\tau/n$, где n – количество промежуточных стадий, τ – параметр запаздывания, h – шаг конечно-разностной сетки. Результат продемонстрирован на примере ряда математических моделей.

Глава 3. Разработка базовой математической модели функционирования системы р53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной обратной связью с р53

В данной главе основное внимание уделяется разработке (в рамках принятого в главе 1 подхода) новой базовой математической модели динамики системы р53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной обратной связью с р53. С этой целью анализируется иерархия четырех минимальных моделей динамики системы р53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной прямой или обратной связью с р53. В моделях принятой иерархии рассматривается два вида аппроксимации, описывающей взаимодействие р53 и микроРНК: линейное представление с запаздыванием, основанное на классическом законе действующих масс, и кинетическая модель типа Гольдбетера–Кошланда. Сопоставительный анализ адекватности и области применимости моделей основан на использовании широкого круга экспериментальных данных. Показано, что введение в модель петли положительной обратной связи р53–микроРНК наделяет модель способностью к синергическому эффекту, который выражается в гиперактивации пути р53–микроРНК, что важно с точки зрения моделирования гипотетических терапевтических стратегий, в которых задействованы р53-зависимые микроРНК. С математической точки зрения новым качественным свойством решений модели является появление еще одного динамического режима – квазипериодических колебаний.

3.1. Минимальные математические модели функционирования системы р53–белок-ингибитор–микроРНК

3.1.1. Постановка задачи. Иерархия моделей 3.1–3.4

В последние годы во многих биомедицинских исследованиях было замечено, что многие микроРНК, находящиеся под положительным воздействием со стороны р53, могут одновременно регулировать белок-ингибитор р53. Таким образом, формируется более сложный тип биологической связи – петля положительной обратной связи между р53 и микроРНК.

Отметим, что исследование механизма функционирования положительной обратной связи р53–микроРНК и ее влияние на состояние «участников» сигнального пути белка р53 является актуальной биомедицинской задачей. Одной из важных задач является уточнение типа связи между р53 и микроРНК для множества известных и вновь открытых микроРНК. Так, за

последние несколько лет представления об обратном воздействии семейства miR-34 (miR-34a/b/c) на p53 претерпевали изменения – от полного отрицания до установления связи через посредство сети белков, являющихся мишенью miR-34 [192].

Схема биологических взаимосвязей в системе p53–белок-ингибитор–микроРНК, рассматриваемых в настоящей главе, приведена на рисунке 3.1 (заостренные стрелки указывают на положительное воздействие, тупые – на отрицательное (ингибирующее) воздействие). Здесь штрихованной стрелкой обозначено воздействие, которое замыкает петлю положительной обратной связи p53–микроРНК, но до сих пор не учитывалось.



Рисунок 3.1. Схема взаимосвязей рассматриваемой биологической системы p53–белок-ингибитор–miR: *заостренные стрелки* иллюстрируют положительное воздействие (повышение уровня или активация), *тупые* – отрицательное воздействие (ингибирование). *Штриховой линией* обозначено ингибирующее воздействие, которое до сих пор не учитывалось.

Модель 3.1, описывающая функционирование системы p53–белок-ингибитор–микроРНК, совпадает с моделью, которая была рассмотрена и подробно изучена в главах 1 и 2. Предполагается, что микроРНК находится под прямым положительным воздействием со стороны p53, а связь микроРНК с белком-ингибитором p53 отсутствует или ею можно пренебречь:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (3.1)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t), \quad (3.2)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 y_1(t - \tau_2) - c_3 y_3(t). \quad (3.3)$$

где взаимодействие белков определяется функциями

$$f(u, v, k) = \frac{1}{2} \left(u + v + k - \sqrt{(u + v + k)^2 - 4uv} \right), \quad (3.4)$$

$$g(u, v, k_g, k_f) = \frac{u - f(u, v, k_f)}{u + k_g - f(u, v, k_f)}. \quad (3.5)$$

Как и ранее, y_1, y_2, y_3 – уровни р53, белка-ингибитора р53 и микроРНК соответственно; a_1 и c_1 – константы скорости генерации белка р53 и микроРНК; a_2 – константа скорости деградации р53 под влиянием белка-ингибитора; b_1 и c_2 – константы скорости р53-зависимой генерации белка-ингибитора и микроРНК; a_3, b_2, c_3 – константы скорости деградации р53, белка-ингибитора и микроРНК под влиянием конститутивных процессов и неучтенных явно воздействий; параметры k_f и k_g , как и прежде, описывают уровень взаимосвязи р53 и белка-ингибитора; параметры τ_1 и τ_2 определяют время запаздывания реакции белка-ингибитора и микроРНК на изменение концентрации белка р53. Отметим, что в этой модели для аппроксимации воздействия р53 на микроРНК используется линейная функция с запаздыванием.

При решении задачи начальные данные задаются в следующем виде:

$$y_k(\theta) = \varphi_k(\theta), \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad k = 1, 2, 3, \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2). \quad (3.6)$$

Модель 3.2 представляет собой вариант модели 3.1, в котором, в отличие от модели 3.1, описание взаимодействия между р53 и микроРНК основано на кинетике Гольдбетера–Кошланда (3.4). Таким образом, модель 3.2 имеет следующий вид:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (3.7)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t), \quad (3.8)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), (y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (3.9)$$

Здесь вводится дополнительный параметр k_p , с помощью которого регулируется уровень взаимодействия р53 и микроРНК. При этом увеличение данного параметра соответствует в рамках принятой модели снижению влияния р53 на микроРНК, которое приводит к снижению уровня микроРНК. Отметим, что в главе 2 численно показана связь решений моделей 3.1 и 3.2 с компонентами решения соответствующих систем ОДУ высокой размерности при нулевых начальных условиях.

Модель 3.3 описывает динамику системы р53–белок-ингибитор–микроРНК, в которой действует петля положительной обратной связи р53–микроРНК, образуемая благодаря наличию петли отрицательной обратной связи р53–белок-ингибитор – с одной стороны, и ингибирующему воздействию микроРНК на белок-ингибитор – с другой (см. рисунок 3.1). Таким образом, отличие модели 3.3 от модели 3.1 состоит в наличии в уравнении (3.11)

дополнительного отрицательного слагаемого, описывающего вклад ингибирующего воздействия микроРНК на белок-ингибитор:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (3.10)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \quad (3.11)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 y_1(t - \tau_2) - c_3 y_3(t). \quad (3.12)$$

Здесь и ниже b_3 – константа скорости микроРНК-зависимого ингибирования белка-ингибитора; k_m позволяет описать уровень взаимосвязи микроРНК–белок-ингибитор; τ_3 определяет время запаздывания реакции белка-ингибитора на изменение состояния микроРНК.

Модель 3.4, как и модель 3.3, описывает динамику системы р53–белок-ингибитор–микроРНК, в которой действует петля положительной обратной связи р53–микроРНК. Модель 3.4 сочетает в себе подходы к аппроксимации взаимодействий р53–микроРНК и белок-ингибитор–микроРНК, принятые в моделях 3.2 и 3.3. Таким образом, в рамках модели 3.4 отдается предпочтение использованию кинетики типа Гольдбетера–Кошланда (3.4) для описания всех ключевых взаимодействий:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (3.13)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g, k_f) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \quad (3.14)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), (y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (3.15)$$

Очевидно, что в случае $b_3 = 0$ (прямая положительная связь р53–микроРНК) модели 3.3 и 3.4 совпадают с моделями 3.1 и 3.2 соответственно. Отметим, что модель 3.4 является наиболее полным вариантом модели из разработанной иерархии минимальных математических моделей динамики системы р53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной прямой и обратной связью с р53. Все параметры модели 3.4 входят также в модели 3.1–3.3, и описаны выше.

Начальные условия для предложенных систем уравнений с запаздыванием задаются в виде функций «истории». В частности, для моделей 3.1 и 3.2 с двумя параметрами запаздывания в качестве начальных условий рассматриваются функции (3.6), для моделей 3.3 и 3.4 с тремя параметрами запаздывания – следующие функции:

$$y_k(\theta) = \varphi_k(\theta), \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad k = 1, 2, 3, \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3). \quad (3.16)$$

Анализ результатов расчетов, проведенных с использованием моделей 3.1–3.4, показал, что начальные условия практически не влияют на асимптотическое поведение решения, поэтому в численных экспериментах функции «истории» полагались тождественно равными нулю. Как уже было отмечено ранее, параметры τ_1 , τ_2 и τ_3 , определяющие время запаздывания реакции в рассматриваемой системе белков и микроРНК, могут изменяться в широком диапазоне значений. Поэтому, как и для модели 3.1 в главе 1, было проведено обезразмеривание систем уравнений, входящих в модели 3.2–3.4, с использованием тех же представлений переменных задачи. В результате обезразмеривания получено, что вид представленных систем уравнений совпадает с их видом до обезразмеривания. Отметим, что основные серии численных экспериментов, если это особо не оговорено, проводились при $\tau_1 = 120$, $\tau_2 = 70$, $\tau_3 = 70$.

3.1.2. Определение характерных состояний биологической системы p53–микроРНК

Как и прежде, одним из основных вопросов, возникающих при разработке и исследовании математической модели динамики системы биомаркеров, является вопрос об описании состояния нормы (или базального состояния) для здорового организма. Для определения базальных значений параметров новых моделей использовались те же сведения о нормальном функционировании белков и микроРНК и экспериментальные данные, что и для модели динамики p53–белок–ингибитор–микроРНК в главе 1 [32, 48, 71]. Так, для описания в рамках принятых моделей нормального функционирования белков p53 и его белка-ингибитора использовались результаты лабораторных исследований о характерных состояниях в системе p53–Wip1 [32], рекомендации из [71] для описания функционирования системы p53–Mdm2, а также результаты численного анализа, представленного в главе 1.

Выбор базальных значений параметров уравнений динамики микроРНК, как и ранее, осуществлялся на основе качественных оценок изменения уровня p53 и miR-34a при активации p53 [48]. В работе [48] из исследования функциональных проб дрожжевых культур следует, что в норме miR-34a активируется в той же степени, что и белок p53 дикого типа. Поэтому для описания данного лабораторного эксперимента было проведено моделирование p53-зависимой активации микроРНК, вызванной за счет увеличения параметра скорости генерации p53 (параметр a_1). Экспериментальные и расчетные (для моделей 3.1–3.4) данные относительного изменения уровней p53 и микроРНК в норме, наблюдаемого при активации p53 дикого типа, представлены на рисунке 3.2 в виде фолд-изменения: $fold = (y_{fin} - y_0)/y_0$, где y_0 и y_{fin} – начальное (до активации) и конечное (после активации) значения уровней p53 и микроРНК. Отметим, что состояние до активации моделировалось при базальных значениях параметров.

При определении значений параметров, описывающих характерные состояния биологической системы p53–микроРНК (в том числе базальное состояние) базовым предположением являлась достаточная близость решений моделей 3.1–3.4, поскольку они описывают состояния одной и той же (реальной) динамической системы.

Здесь и всюду ниже при сопоставлении результатов лабораторного измерения и математического моделирования на графиках уровни белков и микроРНК будут обозначаться их биологическими названиями, написанными курсивом.

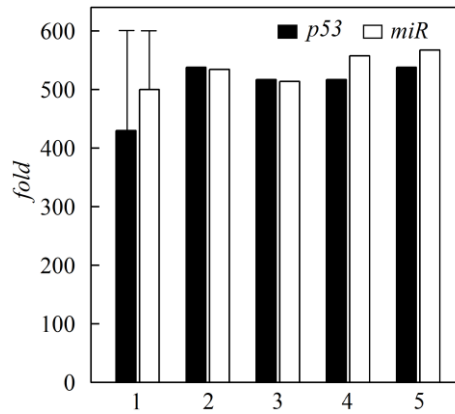


Рисунок 3.2. Относительное изменение уровня p53 и микроРНК при активации p53: 1 – лабораторные данные [48]; численное решение при $a_1 = 11a_1^0$: 2 – модель 3.1; 3 – модель 3.2; 4 – модель 3.3; 5 – модель 3.4.

Таким образом, в моделях 3.1 и 3.2 в качестве базальных значений параметров уравнений динамики p53 и его белка-ингибитора (системы уравнений (3.1)–(3.2) и (3.7)–(3.8) соответственно), рассматриваются следующие значения:

$$a_1 = a_1^0 = 1, b_1 = b_1^0 = 1,$$

$$a_2 = a_2^0 = 3 \cdot 10^{-2}, b_2 = b_2^0 = 10^{-2}, \quad (3.17)$$

$$a_3 = a_3^0 = 10^{-4}, k_f = k_f^0 = 180, k_g = k_g^0 = 28.$$

Для описания нормального функционирования микроРНК в модели 3.1 используются те же значения параметров, что и для аналогичной модели из главы 1:

$$c_1 = c_1^0 = 1, c_2 = c_2^0 = 1, c_3 = c_3^0 = 1. \quad (3.18)$$

В модели 3.2 в дополнение к (3.17) в качестве базальных значений параметров уравнения динамики микроРНК рассматривались следующие значения:

$$c_1 = c_1^0 = 65, c_2 = c_2^0 = 1.2, c_3 = c_3^0 = 1.1, k_p = k_p^0 = 50.4. \quad (3.19)$$

В рамках модели 3.3 наблюдаемое *in vitro* базальное состояние p53, белка-ингибитора и микроРНК, определяется следующими значениями:

$$\begin{aligned}
a_1 &= a_1^0 = 1, b_1 = b_1^0 = 1.005, c_1 = c_1^0 = 1, \\
a_2 &= a_2^0 = 3 \cdot 10^{-2}, b_2 = b_2^0 = 0.89 \cdot 10^{-2}, c_2 = c_2^0 = 1, \\
a_3 &= a_3^0 = 10^{-4}, c_3 = c_3^0 = 1, b_3 = b_3^0 = 6 \cdot 10^{-4}, \\
k_f &= k_f^0 = 180, k_g = k_g^0 = 28, k_m = k_m^0 = 10.
\end{aligned} \tag{3.20}$$

Базальные значения параметров модели 3.4 для уравнений динамики системы p53–белок-ингибитор (3.13)–(3.14) полагались равными значениям параметров (3.20) модели 3.3, для уравнения динамики микроРНК (3.15) – значениям (3.19). Таким образом, для модели 3.4 приняты следующие базальные значения параметров:

$$\begin{aligned}
a_1 &= a_1^0 = 1, b_1 = b_1^0 = 1.005, c_1 = c_1^0 = 65, \\
a_2 &= a_2^0 = 3 \cdot 10^{-2}, b_2 = b_2^0 = 0.89 \cdot 10^{-2}, c_2 = c_2^0 = 1.2, \\
a_3 &= a_3^0 = 10^{-4}, c_3 = c_3^0 = 1.1, b_3 = b_3^0 = 6 \cdot 10^{-4}, \\
k_f &= k_f^0 = 180, k_g = k_g^0 = 28, k_m = k_m^0 = 10, k_p = k_p^0 = 50.4.
\end{aligned} \tag{3.21}$$

В параграфе 1.4 проведено сопоставление численных решений модели 3.1 с экспериментальными данными динамики системы p53–Mdm2 [13] и характерными уровнями белков в системе p53–Wip1 [32]. В работе [13] приведены результаты лабораторных измерений уровней белков p53 и Mdm2 в раковых клетках при достаточно слабом и сильном повреждении ДНК (за счет воздействия препаратом этопозид). Экспериментальные данные [32] иллюстрируют изменение состояния системы p53–Wip1 в клетках с p53 дикого типа под влиянием стрессового воздействия. В результате показано, что модель 3.1 адекватно описывает ряд характерных состояний сигнального пути p53–белок-ингибитор: базальное состояние (состояние M), состояние существенного снижения уровня (состояние C) и состояние чрезмерного накопления p53, (состояние D). Состояния C и D характерны для большинства форм онкологических и нейродегенеративных заболеваний соответственно. Кроме того, полученные периодические решения описывают наблюдаемый *in vitro* адекватный ответ данной динамической системы на относительно слабое повреждение ДНК или стресс (состояние R).

Проведены аналогичные численные эксперименты для моделей 3.2–3.4, которые показали (см. рисунок 3.3а), что при варьировании значений параметров относительно базальных в достаточно широком диапазоне значений принятые математические модели описывают ряд характерных состояний биологической системы p53–белок-ингибитор, которые имеют ясный медико-биологический смысл. Характерные примеры таких решений моделей 3.1–3.4 в фазовом пространстве (y_1, y_2, y_3) продемонстрированы на рисунке 3.3б: при базальных значениях

параметров (линии, соответствующие состоянию N), при $b_2 = 0.1b_2^0$ (линии, соответствующие состоянию C), при $b_1 = 0.1b_1^0$ (линии, соответствующие состоянию D), при $k_f = 0.02k_f^0$ (линии, соответствующие состоянию R). На рисунке 3.3б видно, что в характерных состояниях поведение микроРНК повторяет поведение p53: в состоянии N p53 и микроРНК сохраняются на достаточно низком уровне, в состоянии C уровни p53 и микроРНК ниже соответствующих значений, полученных в базальном состоянии, в состоянии D , наоборот, существенно выше, в состоянии R наблюдаются периодические колебания уровней p53 и микроРНК.

Как уже отмечалось, в лабораторной и клинической практике подобная изменчивость уровней микроРНК позволяет рассматривать их как количественные индикаторы (биомаркеры) состояний, наблюдаемых в норме и при дегенеративных заболеваниях (см., например, [232]). Наличие положительной корреляции между показателями p53 и микроРНК указывает на возможную близость диагностических свойств p53 и микроРНК. Тот факт, что разработанные математические модели описывают эти свойства (см. рисунок 3.3а и 3.3б), позволяет сделать вывод о том, что модели могут рассматриваться как простой и достаточно эффективный инструмент анализа подобных состояний.

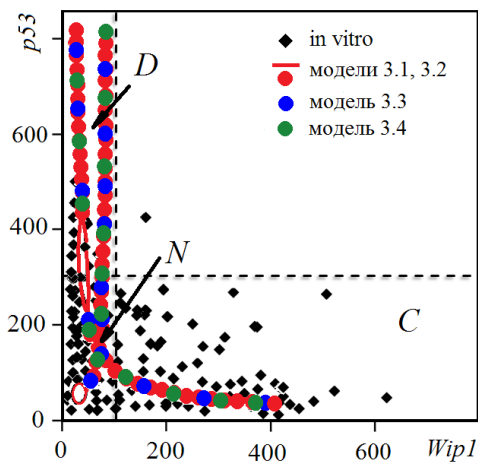


Рисунок 3.3а. Фазовый портрет состояний системы p53 – Wip1: *красные маркеры и линии* – решения модели 3.1 и 3.2; *синие маркеры* – модели 3.3; *зеленые маркеры* – модели 3.4; *черные маркеры* – экспериментальные данные [32].

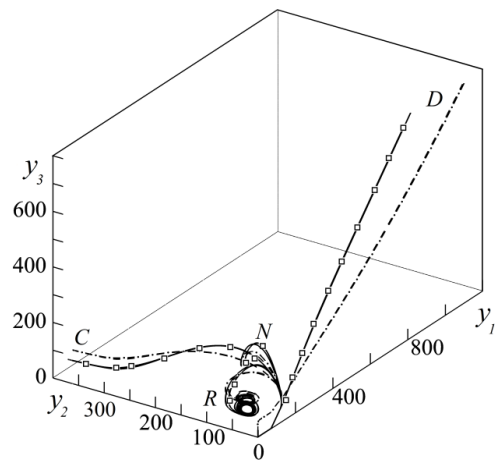


Рисунок 3.3б. Фазовый портрет решений в базальном состоянии N и состояниях C , D , R : *маркированные сплошные линии* — модель 3.1, *пунктирные линии* — модель 3.2, *сплошные линии* — модель 3.3, *штриховые линии* — модель 3.4.

Отметим, что в данной главе для решения задач с начальными условиями для систем уравнений с запаздыванием, входящих в модели 3.1–3.4, используется ранее разработанный численный алгоритм, детально описанный в главе 1. Данный численный алгоритм основан на использовании метода шагов [142, 143], который позволяет применять широко известные численные методы решения задачи Коши.

Результаты методических расчетов, выполненных для модели 3.1 с привлечением различных численных методов интегрирования на последовательности конечно-разностных сеток, приведены в параграфе 1.3. Для моделей 3.2–3.4 были проведены аналогичные расчеты. При этом, как и в главе 1, погрешность численного решения оценивалась в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, с привлечением правила Рунге. В результате численного анализа получено, что погрешности решений моделей 3.2–3.4 близки к соответствующим значениям погрешностей решений модели 3.1 на одинаковых разностных сетках. Так, например, в случае жесткой задачи при $k_f = 0.067k_f^0$, $\tau_1 = 1200$ погрешность численного решения модели 3.1 на сетке с шагом $h = 0.08$ составляет $\Delta y = 6.10 \cdot 10^{-6}\%$ для метода предиктор-корректор 2-го порядка и $\Delta y = 3.56 \cdot 10^{-6}\%$ для метода Адамса–Бэшфорта–Моултона. На разностной сетке с тем же шагом погрешность решения модели 3.4 близка к $\Delta y = 9.95 \cdot 10^{-6}\%$ для метода предиктор-корректор 2-го порядка и $\Delta y = 3.82 \cdot 10^{-6}\%$ для метода Адамса–Бэшфорта–Моултона.

Сопоставительный анализ погрешностей решений моделей 3.1–3.4 показал, что при использовании численных методов Рунге–Кутты, Адамса–Бэшфорта–Моултона или Гира (обладающих теоретически четвертым порядком сходимости) последовательность решений рассмотренных систем уравнений с запаздыванием сходится со вторым порядком. Как отмечалось в главе 1, снижение фактического порядка сходимости связано с нарушением гладкости решения в точке $t = 0$ и разрывов производных в точках, кратных величине запаздывания. Скорость сходимости последовательности решений, полученных методом предиктор-корректор 2-го порядка равна 2, что соответствует теоретическому значению. Значения погрешности численного решения, полученного методом Адамса–Бэшфорта–Моултона и методом предиктор-корректор 2-го порядка, оказались несколько ниже, чем для решений, вычисленных с применением остальных рассмотренных методов.

Таким образом, анализ погрешностей численных решений моделей 3.2–3.4, показал, что, как и для модели 3.1, наиболее предпочтительными в смысле точности и простоты численной реализации являются метод предиктор-корректор 2-го порядка и метод Адамса–Бэшфорта–Моултона.

3.1.3. Анализ чувствительности моделей 3.1–3.4 к изменению значений параметров

Для исследования чувствительности представленных моделей к малому изменению значений параметров использовался «прямой» локальный метод [199], ранее применявшийся для анализа модели 3.1 (глава 1). Отметим, что для моделей 3.3 и 3.4, в которых учитывается отрицательное воздействие микроРНК на белок-ингибитор рассматривалось два варианта

решений, описывающих динамику системы р53–микроРНК с достаточно слабо (при базальных значениях параметров) и, наоборот, сильно (при $b_3 = 10b_3^0$) выраженной положительной обратной связью. Для анализа результатов вычислена матрица коэффициентов относительной чувствительности (ее гистограмма для модели 3.4 приведена на рисунке 3.4)

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

где, как и прежде, p_j^0 – характерные значения параметров (базальные значения), y_i^0 – компоненты решения (стационарные значения при базальных параметрах), t_q – узлы расчетной сетки в методах численного решения прямой задачи, N_t – число узлов, \mathbf{P} – вектор параметров модели.

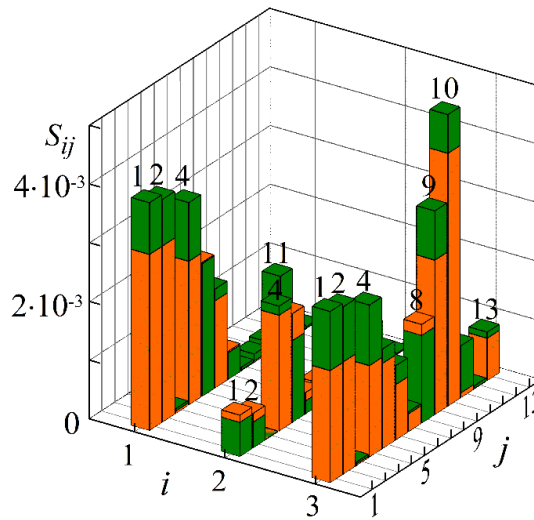


Рисунок 3.4. Коэффициенты относительной чувствительности модели 3.4 к малому изменению значений параметров (i – номер уравнения, j – номер параметра в векторе параметров модели $\mathbf{P} = (a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, k_f, k_g, c_1, c_2, c_3, b_3, k_m, k_p)$): *оранжевые столбцы* – $b_3 = b_3^0$, *зеленые* – $b_3 = 10b_3^0$.

Получено, что каждая компонента решения наиболее чувствительна к изменению параметров, входящих в соответствующее ей уравнение. При этом, как и для модели 3.1 в главе 1, в рамках моделей 3.2–3.4 взаимодействия элементов системы играют важную роль, хотя и роль параметров, регулирующих конститутивные процессы, также высока. Отметим, что для моделей 3.3 и 3.4 компоненты решения несколько менее чувствительны к изменению параметра b_2 , чем в моделях 3.1 и 3.2. Кроме того, решение уравнения, описывающего динамику микроРНК в рамках моделей 3.3 и 3.4, более чувствительно к изменению параметра c_1 по сравнению с моделями 3.1 и 3.2. В случае усиления отрицательного воздействия микроРНК на белок-ингибитор (при $b_3 = 10b_3^0$) список параметров, к которым модели 3.3 и 3.4 весьма

чувствительны, практически не изменился, хотя значения коэффициентов относительной чувствительности несколько возросли (данные для модели 3.4 приведены на рисунке 3.4).

3.2. Численный анализ качественных свойств моделей 3.1–3.4

Вновь отметим, что в моделях 3.1 и 3.2 уравнения (3.1)–(3.2), описывающие изменение уровней $p53$ и его белка-ингибитора, идентичны. Данные модели отличаются лишь уравнениями динамики уровней микроРНК, которые не влияют на первые два уравнения этих моделей. В главе 1 (параграф 1.4) были приведены результаты исследования решений системы (3.1)–(3.2) при поочередном варьировании параметров в достаточно широком диапазоне значений. Там показано, что данная система уравнений обладает двумя вариантами решений – с предельной точкой и предельным циклом.

Анализ качественных свойств решений моделей 3.1–3.4 проводился при поочередном варьировании значений из базальных наборов параметров, потому что в этих диапазонах значений параметров решения имеют достаточно ясный биологический смысл. Получено, что в случае отклонения от базального значения параметров k_f или k_g с ростом значений параметра запаздывания τ_1 возможны бифуркации Андронова–Хопфа. Для моделей 3.1–3.4 численно определены линии нейтральности, образованные соответствующими парами бифуркационных значений, которые разделяют плоскости параметров (τ_1, k_f) и (τ_1, k_g) на области, в одной из которых решение обладает предельной точкой, а в другой – предельным циклом. Линии нейтральности для четырех представленных моделей весьма близки к линиям на рисунках 3.5а и 3.5б, которые получены для модели 3.4.

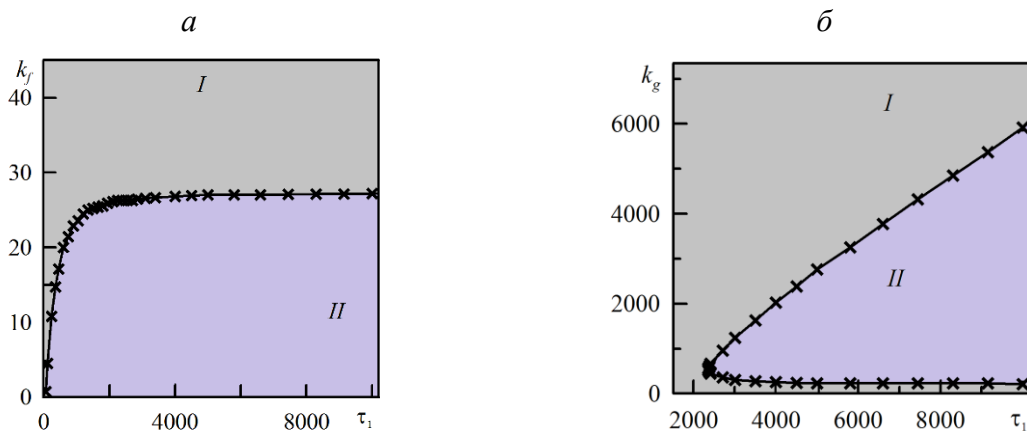


Рисунок 3.5. Иллюстрация вычислительного эксперимента: *линии* – линии нейтральности для модели 3.4 в плоскости параметров (τ_1, k_f) и (τ_1, k_g) , *крестики* – бифуркационные значения параметров, полученные в численных экспериментах, *I* – область устойчивых стационарных решений, *II* – область периодических решений.

В отличие от моделей 3.1 и 3.2, в моделях 3.3 и 3.4 учитывается воздействие микроРНК на систему р53–белок-ингибитор, осуществляемое через параметры τ_3 и b_3 , поэтому представляет интерес исследование влияния изменения значений данных параметров на качественные свойства решений. Проведен анализ численных решений моделей 3.3 и 3.4 при варьировании параметров τ_3 и b_3 в достаточно широком диапазоне значений. В ходе расчетов с возрастанием значения b_3 наблюдались особые динамические режимы решений, связанные с бифуркациями Андронова – Хопфа рождения предельного цикла (при $\tau_3 < 3800$) и бифуркациями рождения торообразных фазовых траекторий из предельной точки (при $\tau_3 \geq 3800$). На рисунке 3.6 приведены линии нейтральности в плоскости параметров (τ_3, b_3) , полученные в результате анализа численных решений модели 3.4.

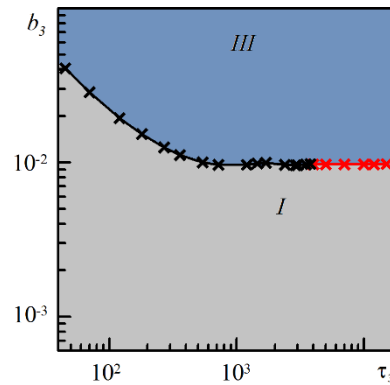
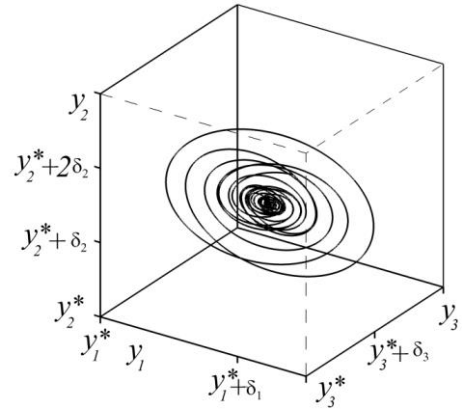
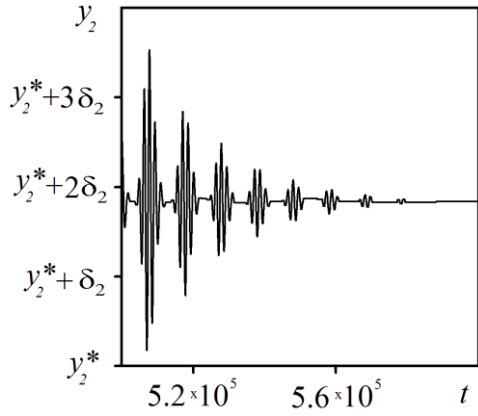


Рисунок 3.6. Иллюстрация вычислительного эксперимента. Линия нейтральности в плоскости параметров (τ_3, b_3) для модели 3.4: крестики – бифуркационные значения параметров, связанные с бифуркациями Андронова–Хопфа (черные маркеры) и бифуркациями рождения тора из предельной точки (красные маркеры), I – область устойчивых стационарных решений, III – область значений параметров, выводящих решение за границы области применимости модели.

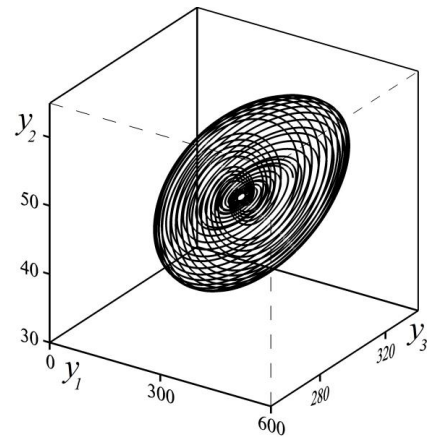
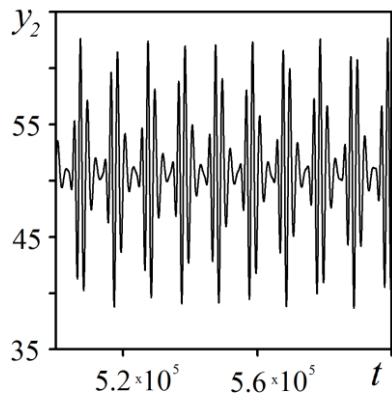
Некоторые характерные фрагменты кинетических кривых и фазовые портреты (в пространстве состояний (y_1, y_2, y_3)) полученных решений модели 3.4 при $\tau_3 = 10000$ и $10.5b_3^0 \leq b_3 \leq 17.7b_3^0$ продемонстрированы на рисунках 3.7. Видно, что при $b_3 = 10.5b_3^0$ (рисунок 3.7а) компоненты численного решения выходят на стационарные значения, при $b_3 = 16.2b_3^0$ наблюдаются квазипериодические колебания, а при $b_3 > 16.2b_3^0$ происходит увеличение амплитуды колебаний с течением времени. Отметим, что при $b_3 > 16.7b_3^0$ компонента решения y_2 в некоторых точках разностной сетки принимает отрицательные значения, что противоречит биологическому смыслу принятой математической модели.

Таким образом, наблюдаемые при достаточно больших значениях b_3 квазипериодические решения могут указывать на приближение математической модели 3.4 к границе области физически адекватных решений системы (3.13)–(3.15) (см. $y_2 < 0$ на рисунке 3.7в). Это свидетельствует о приближении к границе применимости рассматриваемой математической

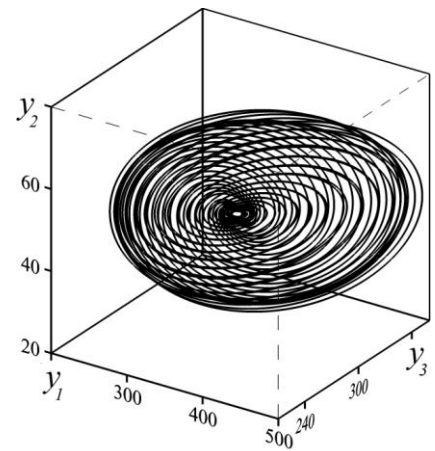
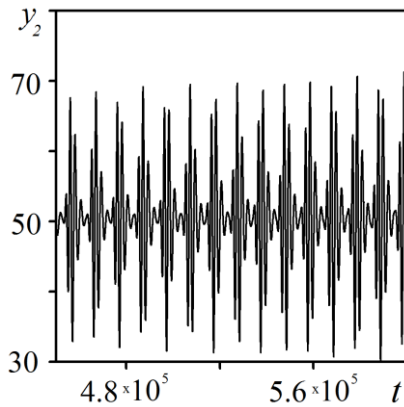
модели (в окрестности рассматриваемого набора параметров модели 3.4). В этом случае линия нейтральности в плоскости параметров (τ_3, b_3) на рисунке 3.6 практически совпадает с верхней границей интервала допустимых изменений значения параметра b_3 при каждом фиксированном значении параметра τ_3 .



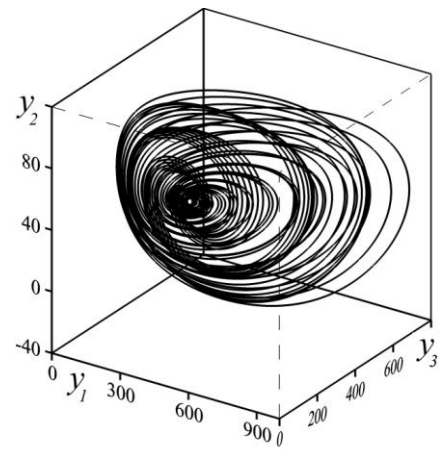
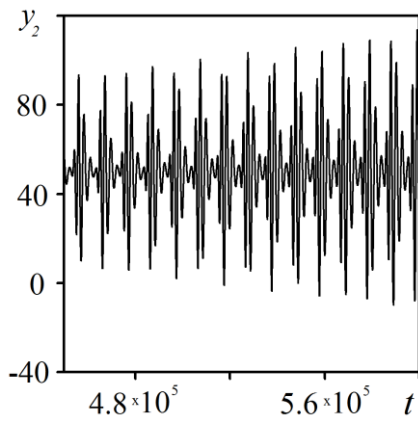
а) $b_3 = 10.5b_3^0, \delta_1 = 2 \cdot 10^{-9}, \delta_2 = 2 \cdot 10^{-10}, \delta_3 = 1 \cdot 10^{-9}$



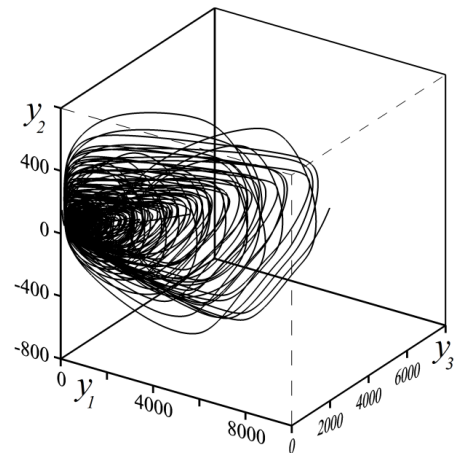
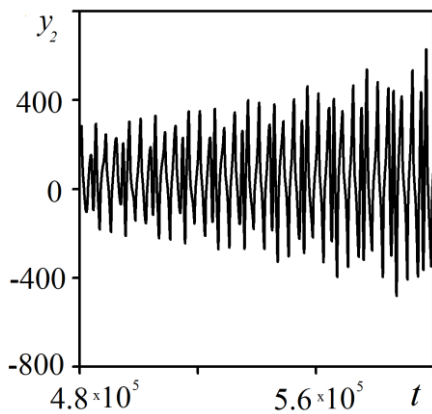
б) $b_3 = 16.2b_3^0$



в) $b_3 = 16.35b_3^0$



$$\text{г) } b_3 = 16.7b_3^0$$



$$\text{д) } b_3 = 17.7b_3^0$$

Рисунок 3.7. Изменение кинетических кривых и фазовых портретов решения системы (3.13)–(3.15) в зависимости от параметра b_3 ; $\tau_3 = 10000$, $y_1^* = 246.129104866$, $y_2^* = 59.9093386726$, $y_3^* = 217.28115054$.

Результаты численных экспериментов, проведенных с использованием модели 3.3 при изменении параметров b_3 и τ_3 , указывают на схожие особенности изменения решений. Так, при достаточно больших значениях параметра τ_3 с возрастанием значения b_3 наблюдалась бифуркация рождения торообразных фазовых траекторий из предельной точки. При дальнейшем увеличении b_3 компонента решения y_2 принимает отрицательные значения, что указывает на границу применимости модели 3.3.

При этом сопоставление численных решений моделей 3.3 и 3.4 с экспериментальными данными [32] (см. рисунок 3.3а) показало, что это ограничение не оказывает существенного влияния на способность моделей 3.3 и 3.4 описывать все наиболее характерные состояния биологической системы р53–белок-ингибитор–микроРНК.

3.3. Сопоставление численных решений моделей 3.1–3.4 с экспериментальными данными. Базовая модель

Для оценки адекватности разработанных математических моделей 3.1–3.4 проведено сопоставление численных решений с лабораторными данными динамики p53 в двух характерных состояниях C [233] и D [190]. На рисунке 3.8 приведена иллюстрация характерного состояния в случае критически низкого уровня p53 (состояние C), описываемого в экспериментальной работе [233] при исследовании уровня p53 в раковых клетках линии ML-1 с p53 дикого типа (культивируемые клетки острого миелобластного лейкоза) после воздействия инфракрасным излучением. Численные решения моделей 3.1–3.4 при $\tau_1 = \tau_3 = 11300$ и $k_f = 10k_f^0$ близки к лабораторным данным [233] (см. рисунок 3.8): примерно через 3 часа после облучения достигается пик уровня p53, а через 5 часов уровень p53 снижается. Отметим, что увеличение значения параметра k_f относительно базального соответствует в рамках принятых математических моделей ситуации ослабления взаимодействия p53 и его белка-ингибитора, наблюдаемой в экспериментальных исследованиях при стрессовом воздействии (например, инфракрасном излучении), механизм которой описан в [233].

Состояние D сверхвысокого уровня p53 (увеличение в 6 раз по сравнению с базальным состоянием) получено в экспериментах [190], где ингибирование белков-регуляторов p53 и дополнительное воздействие противораковыми препаратами (этопозид+нутлин) влекло за собой смерть раковых клеток линии MCF7 (клетки аденокарциномы молочной железы). На рисунке 3.9 видно, что результаты расчетов при $\tau_1 = 20800$, $a_1 = 0.09a_1^0$, $b_1 = 0.03b_1^0$, $k_f = 0.008k_f^0$ для моделей 3.1 и 3.2, а при $\tau_1 = 20800$, $a_1 = 0.108a_1^0$, $b_1 = 0.03b_1^0$, $k_f = 0.08k_f^0$, $k_g = 37k_g^0$ для моделей 3.3 и 3.4 достаточно близки к лабораторным данным [190] (где резкий «обрыв» кривой p53 указывает на время гибели клетки). Эти изменения параметров по отношению к базальному набору значений согласуются (в самом общем виде) с условиями лабораторного эксперимента [190]. Отметим, что полученные здесь численные решения описывают высокий уровень p53 и чрезвычайно низкий уровень белка-ингибитора (более чем 80-кратное снижение в сравнении с нормой). Для лучшего согласования с измеренными *in vitro* уровнями p53 результаты расчетов были нормированы на максимум (рисунок 3.8) или на величину, обеспечивающую близость с лабораторными данными по начальным данным (рисунок 3.9).

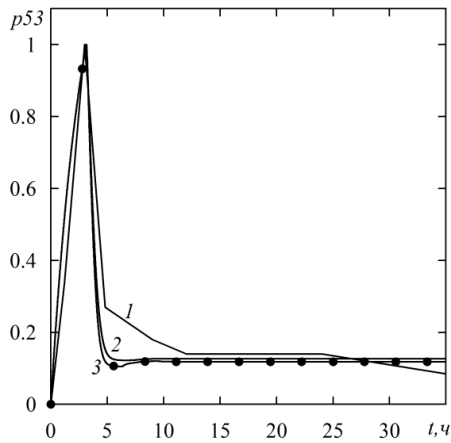


Рисунок 3.8. Динамика уровня p53 в состоянии C: 1 – экспериментальные данные [233], 2 – модели 3.1 и 3.2, 3 – модель 3.3, маркеры – модель 3.4.

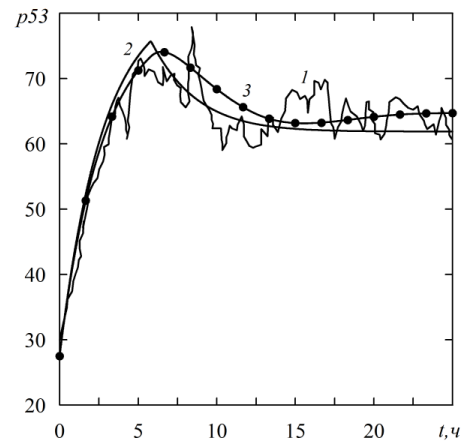


Рисунок 3.9. Динамика уровня p53 в состоянии D: 1 – экспериментальные данные [190], 2 – модели 3.1 и 3.2, 3 – модель 3.3, маркеры – модель 3.4.

Одним из важнейших свойств p53, позволяющее относить этот белок к противораковым мишеням, является его способность активироваться и запускать программу гибели клеток (в том числе раковых). Поэтому особое внимание исследователи уделяют изучению p53-зависимой активации микроРНК, которые, так же как p53, могут быть значимыми участниками запуска тех же программ (в каждом конкретном случае это свойство микроРНК должно быть доказано в лабораторных экспериментах). Так, например, в экспериментальной работе [59] исследуется изменение уровня miR-221 (см. рисунок 3.10) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы при воздействии противоракового препарата нутлин, который ингибирует генерацию Mdm2 и тем самым активирует p53.

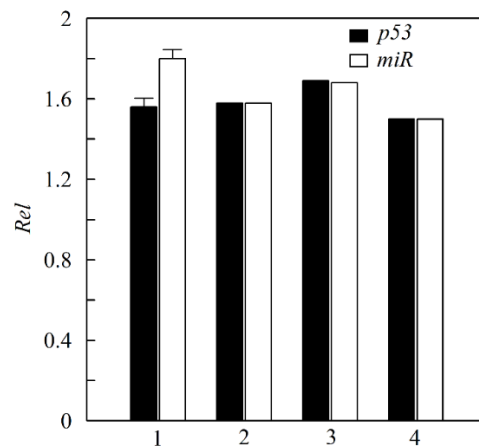


Рисунок 3.10. Относительное изменение уровней p53 и miR-221 при активации p53: 1 – лабораторные измерения [59] через 48 часов после воздействия нутлином; 2 – $b_1 = 0.67b_1^b$, 3 – $b_2 = 1.6b_2^b$, 4 – $b_3 = 8.4b_3^b$, модель 3.3.

На рисунке 3.10 приведены относительные (по отношению к норме) изменения уровней p53 и miR-221, полученные в лабораторном эксперименте и в рамках модели 3.3 при

варьировании одного из параметров b_i ($i = 1, 2, 3$), которое моделирует воздействие нутлина на Mdm2. Видно, что результаты расчетов при изменении каждого из параметров уравнения (3.11) согласуются с экспериментальными данными [59]. Проведенные численные эксперименты указывают на то, что численные решения моделей 3.1–3.2, 3.4, как и модели 3.3, согласуются с лабораторными данными [59].

Также проведено сопоставление численных решений моделей 3.1–3.4 с экспериментальными данными уровня белка Mdm2 и miR-143 в культивируемых клетках карциномы при стрессовом воздействии на p53 [58]. Отметим, что miR-143 относят к p53-зависимым микроРНК, которые с некоторой степенью вероятности могут негативно воздействовать на Mdm2 (см, например, работы [58, 59, 234]). На рисунке 3.11а приведены данные относительного (по отношению к норме) изменения уровней Mdm2 и miR-143, полученные в результате лабораторных экспериментов [58] и расчетов моделей 3.1–3.4. Решения моделей 3.1–3.4 удовлетворительно согласуются с лабораторными данными [58] о соотношении уровней Mdm2 и p53-зависимых микроРНК в норме и в условиях стресса. Экспериментальные данные [58] указывают на то, что в клетках с высоким уровнем Mdm2 (в 4–10 раз выше нормы) уровень miR-143 ниже нормы на 30% и более. Однако видно, что для решений представленных математических моделей характерно более существенное снижение уровня микроРНК. Анализ численных экспериментов показал, что при усилении отрицательного воздействия miR-143 на Mdm2 за счет увеличения параметров b_3 и k_m (на рисунке 3.11а приведены решения модели 3.4 при $b_3 = 22b_3^0$, $k_m = 30k_m^0$) характерные значения решений моделей 3.3 и 3.4 несколько лучше согласуются с наблюдаемыми в экспериментальной работе [58] соотношениями Mdm2 и miR-143.

Дополнительно были проведены расчеты для модели 3.4 при изменении параметров, описывающих особенности функционирования микроРНК. В результате численных экспериментов получено, что в рамках модели 3.4 за счет изменения параметров k_p (отвечающего за настройку уровня взаимосвязи p53–микроРНК) и b_3 достигается большее разнообразие состояний, которые лучше согласуются с экспериментальными данными [58] (см. рисунок 3.11б). Отметим, что одновременно параметры k_p и b_3 входят только в одну модель представленной иерархии, а именно в модель 3.4.

В параграфе 1.4 было выполнено сопоставление численных решений модели 3.1 с результатами лабораторных исследований [48, 206] изменения уровня различных микроРНК при активации p53. Для моделей 3.2–3.4 были проведены аналогичные численные эксперименты (некоторые результаты приведены на рисунке 3.2), которые указывают на то, что в рамках разработанной иерархии минимальных математических моделей может быть численно воспроизведена ситуация p53-зависимой активации микроРНК. Представленные в данном

параграфе результаты сопоставления численных решений моделей 3.1–3.4 с лабораторными данными свидетельствуют об адекватности принятого подхода к моделированию взаимосвязей в системе p53–белок-ингибитор–микроРНК.

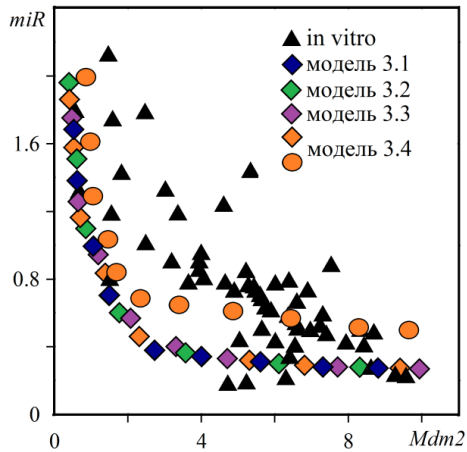


Рисунок 3.11а. Относительное изменение стационарных уровней Mdm2 и miR-143 в моделях 3.1–3.4: ромбы – решения при варьировании параметров b_1 и b_2 ; круги – решения при одновременном варьировании параметров b_3 , k_m и b_1 или b_2 ; треугольники – экспериментальные данные [58].

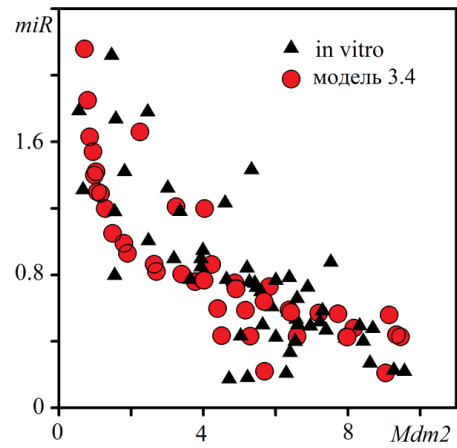


Рисунок 3.11б. Относительное изменение стационарных уровней Mdm2 и miR-143 в модели 3.4: круги – решения при одновременном варьировании параметров k_p и одного или нескольких параметров b_1 , b_2 , b_3 , c_1 ; треугольники – экспериментальные данные [58].

В результате расчетов получено, что численные решения математических моделей 3.1–3.4 достаточно хорошо согласуются с лабораторными данными об относительных изменениях p53, белка-ингибитора и различных p53-зависимых микроРНК (способных отрицательно воздействовать на белок-ингибитор). Вместе с тем проведенные численные исследования показали, что при усилении связи микроРНК–белок-ингибитор (за счет изменения параметров b_3 и k_m) и при уточненной аппроксимации взаимодействия p53 и микроРНК (с применением кинетической модели Гольдбетера–Кошланда с запаздыванием) удастся получить наиболее «реалистичную» модель – модель 3.4. Преимущество модели 3.4 обусловлено используемым в ней набором аппроксимаций, который представляет более широкую совокупность инструментов, обеспечивающую лучшее согласование с лабораторными данными [58] (рисунок 3.11б).

Таким образом, проведенный численный анализ решений и сопоставление с экспериментальными данными [58] позволяют определить модель 3.4 как базовую модель динамики системы p53–белок-ингибитор–микроРНК для класса микроРНК с положительной прямой (при достаточно малых b_3) или обратной связью с p53.

3.4. Численный анализ некоторых противораковых стратегий с применением базовой модели. Синергический эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53-микроРНК

В данном параграфе разработана базовая модель (модель 3.4) динамики системы p53–белок-ингибитор–микроРНК для микроРНК с положительной обратной связью с p53 используется для анализа эффективности ряда гипотетически возможных терапевтических противораковых стратегий, мишенью которых являются p53, его белок-ингибитор и p53-зависимые микроРНК. В рамках базовой модели «терапевтическая» стратегия считалась эффективной, если система, состояние которой описывается ранее определенным набором характерных значений уровней p53, белка-ингибитора p53 и микроРНК, переходит из онкоопасного состояния C в состояние D запуска массовой гибели дефектных клеток. В качестве успешной «профилактической» стратегии, которая приводит к нормальному, но недостаточно высокому для запуска программы клеточной смерти уровню p53, рассматриваем переход из онкоопасного состояния C в состояние условной (для системы p53–белок-ингибитор–микроРНК) нормы N .

Поскольку в данной серии численных экспериментов исследуются противораковые стратегии, то во всех расчетах исходным полагалось состояние C (соответствующие численные решения получены при $b_2 = 0.1b_2^0$). При постановке численных экспериментов предполагалось, что в качестве мишеней противораковых «терапевтических» стратегий можно рассматривать отдельные элементы системы p53–белок-ингибитор–микроРНК или все одновременно. На рисунке 3.12 в фазовом пространстве решений приведены основные результаты численных экспериментов, которые описывают гипотетические противораковые воздействия. Стрелки указывают направление перехода численных решений от состояния C к характерным состояниям D и N .

3.4.1. Воздействие на петлю отрицательной обратной связи p53–белок-ингибитор

На начальном этапе моделировались теоретически возможные противораковые воздействия, направленные только на петлю отрицательной обратной связи p53–белок-ингибитор. В результате расчетов получено, что при снижении более чем на два порядка скорости p53-зависимой генерации белка-ингибитора (параметр b_1), или существенном увеличении (в несколько раз относительно базального значения) скорости деградации белка-ингибитора (параметр b_2) уровень белка-ингибитора достигает критически низких значений. При этом происходит рост уровней p53 и p53-зависимых микроРНК, что характерно (см.,

например, [190]) для ситуации запуска программы гибели клетки (состояние D). Состояние, близкое к D , в рамках базовой модели может быть получено также за счет достаточно сильного ослабления взаимодействия p53 с геном ингибитора (при увеличении параметра k_g на три и более порядка).

Иллюстрация данных «терапевтических» стратегий представлена на рисунке 3.12: $b_1 = 0.01b_1^0$ – траектория 1, $b_2 = 4b_2^0$ – траектория 2, $k_g = 4000k_g^0$ – траектория 3. Отметим, что поочередное варьирование остальных параметров базовой модели, описывающих функционирование отрицательной обратной связи p53–белок-ингибитор, не позволяет описать переход из состояния C в состояние D .

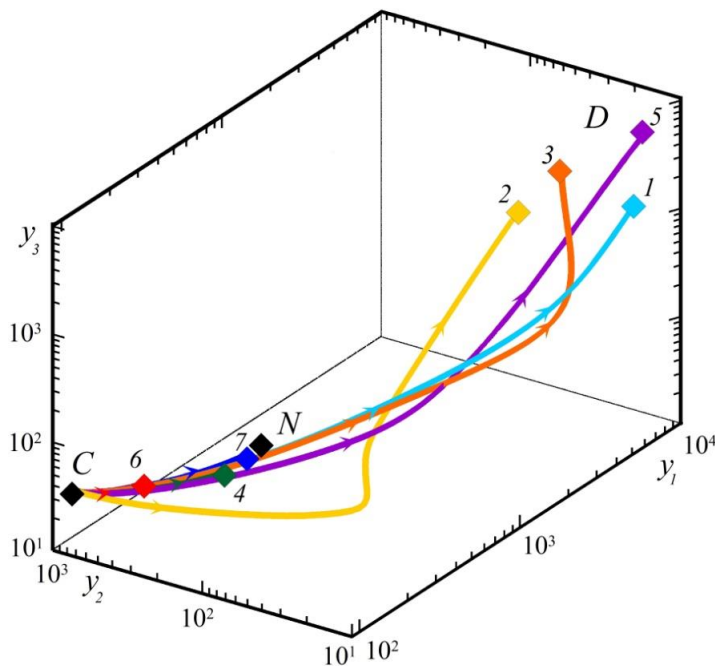


Рисунок 3.12. Фазовые траектории, иллюстрирующие возможные варианты «терапевтического» (траектории 1–3, 5) и «профилактического» (траектории 4, 7) воздействия на раковые клетки. Синергический эффект (траектория 5) достигается, когда реализуются одновременно стратегии, описываемые траекториями 6 и 7.

3.4.2. Воздействие на микроРНК как звено петли положительной обратной связи

Для исследования вопроса о влиянии на p53 усиления отрицательного воздействия микроРНК на белок-ингибитор p53 проводились расчеты при поочередном изменении значений параметров c_k ($k = 1, 2, 3$) и b_3 , которые регулируют функционирование микроРНК в рамках базовой модели. Все остальные параметры модели оставались базальными, т.е. соответствующими нормальному функционированию системы.

В результате анализа численных решений базовой модели при варьировании параметров c_k ($k = 1, 2, 3$) получено, что даже существенное (не менее чем на 50%) отклонение уровня

микроРНК приводит к изменению уровней белков лишь на 2–15% относительно состояния при базальных значениях c_k . Это, в некоторой степени, соответствует выводам лабораторных исследований [235] модели рака легких мыши о том, что «низкий уровень miR-34a не способен снизить проявления, вызванные критическим уровнем p53». Расчеты при поочередном изменении значений параметров $k_m = qk_m^0$ и $k_p = qk_p^0$ в достаточно широком интервале значений ($10^{-6} \leq q \leq 10^6$) показали аналогичные результаты: изменение уровня микроРНК практически не влияет на уровень p53 и белка-ингибитора.

В то же время, в результате численного анализа получено, что усиление отрицательного воздействия микроРНК на белок-ингибитор за счет увеличения значения параметра b_3 (при $b_3 > 11b_3^0$) оказывается наиболее эффективным, т.е. может вызвать весьма сильное изменение уровней p53 и его белка-ингибитора (от 50 до 300 процентов). Однако такие решения описывают только «профилактические» воздействия, при которых наблюдается восстановление нормального уровня белков и микроРНК (состояние N), но не переход в состояние D . В частности, на рисунке 3.12 видно, что неподвижная предельная точка решения при $b_3 = 15b_3^0$ (траектория 4) близка к неподвижной точке (см. маркер N на рисунке 3.12) решения при базальных (3.21) значениях параметров.

3.4.3. Воздействие на петлю положительной обратной связи p53–микроРНК

В данном разделе приведены результаты расчетов базовой модели при одновременном изменении значений нескольких параметров, которые регулируют функционирование петли положительной обратной связи p53–микроРНК. Получены варианты решений, которые описывают эффективные «терапевтические» противораковые стратегии (в рамках базовой модели). Пример такого решения при $b_1 = 0.1b_1^0$, $b_3 = 13.5b_3^0$, $k_m = 15k_m^0$ приведен на рисунке 3.12 (траектория 5). Видно, что фазовая траектория (линия 5 на рисунке 3.12) выходит из точки, соответствующей достаточно низким значениям уровней p53 и микроРНК (состояние C), и достигает точки с весьма высокими значениями уровней p53 и p53-зависимых микроРНК, которые характерны для ситуации запуска программы гибели дефектных клеток (состояние D).

Численный анализ показал, что данное «терапевтическое» воздействие является удачным (в рамках базовой модели) только при одновременном влиянии на все звенья положительной обратной связи p53–микроРНК за счет изменения параметров b_1 , b_3 и k_m . Так, численное решение, полученное при $b_3 = 13.5b_3^0$, $k_m = 15k_m^0$, которое соответствует состоянию системы p53–белок-ингибитор–микроРНК при усилении отрицательного воздействия микроРНК на белок-ингибитор (траектория 6 на рисунке 3.12), описывает состояние C , характерное для раковых клеток. Решение базовой модели при подавлении положительного воздействия p53 на

белок-ингибитор за счет $b_1 = 0.1b_1^0$ (траектория 7 на рисунке 3.12) иллюстрирует состояние близкое к условной норме N . При этом такое решение можно рассматривать в рамках принятой модели в качестве результата не «терапевтического» воздействия, а «профилактического», при котором в клетках с высоким риском развития рака восстанавливается нормальный уровень рассматриваемых белков и микроРНК.

Таким образом, здесь можно говорить, в определенной мере, о синергическом эффекте, который обусловлен подавлением положительного влияния p53 на белок-ингибитор и, одновременно, усилением отрицательного воздействия на белок-ингибитор со стороны микроРНК, и проявляющемся в гиперактивации петли положительной обратной связи p53–микроРНК. Согласно экспериментальным данным [60, 236], гиперактивация p53 и микроРНК является способом существенного повышения эффективности терапевтических противораковых стратегий. Отметим, что синергический эффект является фундаментальным свойством систем (в широком смысле), особенно систем с положительной обратной связью, поэтому способность базовой модели описывать синергический эффект является ее позитивной характеристикой.

Обсуждаемые здесь эффекты, связанные с гиперактивацией сигнального пути p53, наблюдались ранее в ряде лабораторных экспериментов, выполненных *in vitro* и *in vivo*. Так, в работе [60] гиперактивация p53 получена как результат воздействия на петлю положительной обратной связи, образованную системой белков p53–p73–Egr1. Результаты лабораторных экспериментов *in vivo* и *in vitro* указывают на существенно более быстрый запуск программы клеточной смерти в случае одновременного воздействия на несколько элементов рассматриваемой системы. Например, в [236] приведены данные о том, что сверхэкспрессия miR-34a существенно усиливает транскрипционную активность p53, которая дополнительно стимулируется также подавлением белка-ингибитора. В [40] получено, что в эпителиальных клетках дыхательных путей при ХОБЛ оксидативный стресс способствует снижению уровня белка Sirt1 и активации miR-34a, которая приводит к еще более значительному уменьшению уровня Sirt1. При этом происходит гиперактивация p53 и, как следствие, инициация клеточного старения.

В главе 4 проявления синергического эффекта будут подробно проанализированы при моделировании динамики системы p53–белок-ингибитор–микроРНК в условиях, приближенных к условиям ряда конкретных лабораторных экспериментов [11, 12, 39–41].

Таким образом, в настоящем разделе с использованием разработанной базовой модели изучены варианты гипотетических противораковых терапевтических стратегий, направленных на гиперактивацию регуляторов апоптоза p53 и микроРНК. Полученные результаты моделирования указывают на потенциально высокую эффективность противораковой терапии,

мишенью которой является белок-ингибитор p53 как основное звено петли положительной обратной связи p53–микроРНК, при этом, микроРНК выполняет регуляторную роль в функционировании системы p53–белок-ингибитор–микроРНК.

Результаты главы 3

1. Для биологической системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК рассмотрена иерархия четырех минимальных математических моделей, различающихся уровнем регуляторного воздействия микроРНК на белок-ингибитор и выбором аппроксимаций, описывающих взаимодействие p53 и микроРНК. Выполнен комплекс численных исследований, включающий в себя методические расчеты, калибровку моделей, численный анализ качественных свойств решений, анализ чувствительности, сопоставление с известными экспериментальными данными.
2. На основании результатов сравнительного численного анализа иерархии четырех моделей предложена новая базовая минимальная модель функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК, в которой микроРНК, воздействующие на белок-ингибитор p53, связаны с p53 петлей положительной обратной связи. Показано, что в рамках базовой модели за счет аппроксимации связи белок-ингибитор–микроРНК и p53–микроРНК кинетической моделью типа Гольдбетера–Кошланда удастся получить наиболее полный набор состояний системы p53–микроРНК, наблюдаемых *in vitro* в известном лабораторном эксперименте. Численно показано, что функционирование петли положительной обратной связи p53–микроРНК может приводить к возникновению в системе периодических и квазипериодических колебаний.
3. В рамках новой базовой модели численно исследованы гипотетические противораковые стратегии, связанные с воздействиями на отдельные сегменты сигнального пути p53 (петель отрицательной обратной связи p53–белок-ингибитор и положительной обратной связи p53–микроРНК) для активации p53 с целью запуска генетической программы p53-зависимого апоптоза (самоликвидации) раковых клеток. Показано, что подавление белка-ингибитора p53 с помощью микроРНК может приводить к синергическому эффекту – одновременной гиперактивации p53 и микроРНК, которая, согласно известным представлениям и ряду экспериментальных исследований функционирования сигнального пути p53, может обеспечивать существенно более высокую эффективность терапевтических противораковых стратегий.

Глава 4. Применение математических моделей для исследования механизмов функционирования, регуляторной функции и диагностического потенциала p53-зависимых микроРНК при дегенеративных заболеваниях

В данной главе разработанный подход к моделированию функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК применяется для количественного описания достаточно широкого круга лабораторных экспериментов, исследующих совместную динамику уровней p53, его белков-ингибиторов Mdm2, Wip1, Sirt1 и различных микроРНК (miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215).

В зависимости от исследуемой биомедицинской проблемы рассмотренные экспериментальные работы [11, 12, 39–41] можно разделить на две группы: в первой группе основной задачей является анализ терапевтических стратегий, связанных с p53-зависимым запуском апоптоза раковых клеток (за счет воздействия радиации или нутлина), а во второй – изучение основных механизмов регуляции p53-сети при дегенеративных процессах, вызванных окислительным (окислительным) стрессом и патологической гибелью нормальных клеток. Отметим, что в данных лабораторных исследованиях особое внимание уделяется уточнению роли микроРНК в рассматриваемой биологической системе, в частности, как фактора терапии дегенеративных заболеваний.

4.1. Базовая математическая модель

Общая модель структуры сигнального пути p53–микроРНК с учетом рассматриваемых в лабораторных экспериментах [11, 12, 39–41] внешних воздействий представлена на рисунке 4.1.

При создании более частных моделей динамики сигнального пути p53 (для описания конкретных условий экспериментальных исследований) использовалась разработанная в главе 3 базовая модель:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (4.1)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \quad (4.2)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), (y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (4.3)$$

взаимодействие белков определяется функциями

$$f(u, v, k) = \frac{1}{2} \left(u + v + k - \sqrt{(u + v + k)^2 - 4uv} \right), \quad (4.4)$$

$$g(u, v, k_g, k_f) = \frac{u - f(u, v, k_f)}{u + k_g - f(u, v, k_f)}. \quad (4.5)$$

Как и прежде, y_1, y_2, y_3 – уровни p53, белка-ингибитора p53 и микроРНК соответственно; a_1 и c_1 – константы скорости генерации белка p53 и микроРНК; a_2 – константа скорости деградации p53 под влиянием белка-ингибитора; a_3, b_2, c_3 – константы скорости деградации p53, белка-ингибитора и микроРНК; b_3 – константа скорости микроРНК-зависимого подавления генерации белка-ингибитора; b_1 и c_2 – константы скорости p53-зависимой генерации белка-ингибитора и микроРНК; параметры k_f, k_g, k_m и k_p позволяют описать уровень взаимодействия участников сигнального пути p53; параметры τ_1, τ_2 и τ_3 определяют время запаздывания реакции белка-ингибитора и микроРНК на изменение концентрации белка p53. Начальные условия задаются в виде функций «истории»:

$$y_k(\theta) = 0, \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad k = 1, 2, 3, \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3).$$

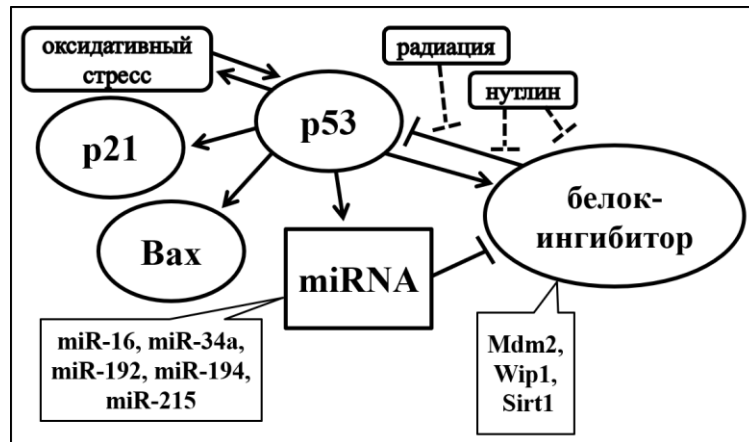


Рисунок 4.1. Схема биологических взаимосвязей сигнального пути белка p53. *Заостренные стрелки* указывают на наличие положительного воздействия, *тупые* – отрицательного; *сплошными линиями* обозначены взаимодействия внутри системы, *штриховыми* – внешние воздействия.

Решение прямых задач проводилось с использованием численного алгоритма, разработанного и подробно исследованного в главе 1. В качестве инструмента численного решения обратных коэффициентных задач, как и в главе 1, привлекался стохастический генетический алгоритм ВГА. В рамках данного алгоритма проводилась оптимизация функционала, определяющего близость численного решения к экспериментальным данным. Основные серии численных экспериментов выполнялись при следующих значениях параметров генетического алгоритма ВГА: $z \in [300, 400]$, $z_0 = z$, $N_{gen} \in [40, 60]$, $Z = 0.3z$, $d = 0.1$,

$\beta=0.1$ (подробное описание алгоритма и параметров приведено в разделе 1.2.2). В силу стохастичности BGA выбор оптимального набора значений параметров (решения обратной коэффициентной задачи) осуществлялся с учетом данных статистического анализа выборок, составленных из результатов от 40 до 60 равноценных запусков алгоритма BGA: при выборе оптимального набора оценивались значения функционалов, полученных для центральных 50% элементов выборки. Как и в главе 1, основными критериями выбора являлись соответствие качественных свойств полученного решения прямой и обратной задачи известным биологическим представлениям о моделируемом процессе. Выбор значений управляющих параметров BGA и размера рассматриваемых выборок основан на результатах проведенных в главе 1 методических расчетов и оценках работы BGA, представленных в [184].

При описании каждого лабораторного эксперимента оптимальный набор параметров *Opt* будет отмечен ссылкой на соответствующую экспериментальную работу, например *Opt*^[11], а отдельные параметры набора будут иметь отметку *Opt*. Для корректного сопоставления экспериментальных данных и результатов математического моделирования численные решения нормировались в согласии с представлением лабораторных данных в соответствующих работах. Отметим, что, как и прежде, на графиках уровни белков и микроРНК будут обозначаться их биологическими названиями, написанными курсивом, например, *p53*, *Mdm2*, *miR-16*.

4.2. Математическое моделирование функционирования системы p53-Wip1-miR-16 в клетках остеосаркомы человека

Данный параграф посвящен численному исследованию особенностей функционирования системы p53–Wip1–miR-16 в условиях, приближенных к условиям лабораторного эксперимента [11], в котором на раковые клетки остеосаркомы человека (клеточная линия U2OS со сниженным уровнем miR-16) воздействовали ионизирующим облучением. Отметим, что в [11] облучение проводилось для того, чтобы через искусственное повреждение ДНК активировать систему p53–Wip1–miR-16. Кроме того, этот метод применяется при радиотерапии раковых клеток. Белок Wip1 является отрицательным регулятором p53 и онкогеном, способствующим образованию и развитию опухолей. В некоторых раковых клетках человека (см., например, [237]) отмечают чрезмерную активацию белка Wip1, который ингибирует p53 при повреждении ДНК, а микроРНК miR-16, воздействуя на мРНК Wip1, регулируют Wip1 – таким образом, между miR-16 и p53 действует петля положительной обратной связи.

4.2.1. Математическая модель динамики системы p53–Wip1–miR-16

Для описания функционирования системы p53–Wip1–miR-16 на первом этапе привлекалась базовая модель (4.1)–(4.5), в которой y_1, y_2, y_3 – уровни p53, Wip1 и miR-16 соответственно. Начальные условия задавались равными нулю, для удобства согласования с условиями лабораторного эксперимента [11] характерный масштаб времени T полагался равным 1 минуте. Погрешность численного решения прямой задачи, как и прежде, оценивалась в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, с привлечением правила Рунге и составляла $5.25 \cdot 10^{-2}\%$ для метода предиктор-корректор 2-го порядка на сетке с шагом $h = 0.1$.

Решение обратной коэффициентной задачи проводилось с использованием генетического алгоритма BGA, в котором количество индивидуумов $z = 400$ и число поколений $N_{gen} = 40$. Начальный диапазон изменения значений каждого параметра в начальном поколении BGA задавался с учетом биологического смысла лабораторного эксперимента [11] и принятого в главе 3 базального набора параметров, описывающего состояние условной нормы для системы p53–микроРНК. В результате численного анализа выборки, состоящей из 60 запусков алгоритма BGA, получен оптимальный набор значений параметров $Opt^{[11]}$: $a_1 = 4 \cdot 10^{-1}$, $a_2 = 4.8 \cdot 10^{-2}$, $a_3 = 3 \cdot 10^{-4}$, $b_1 = 2.2$, $b_2 = 2 \cdot 10^{-3}$, $b_3 = 8 \cdot 10^{-3}$, $c_1 = 11.8$, $c_2 = 13.5$, $c_3 = 2.08$, $k_f = 274.8$, $k_g = 47.6$, $k_m = 41.8$, $k_p = 126.5$, $\tau_1 = 80$, $\tau_2 = 6$, $\tau_3 = 30$, обеспечивающий близость численного решения базовой модели с экспериментальными данными [11] в смысле минимума функционала.

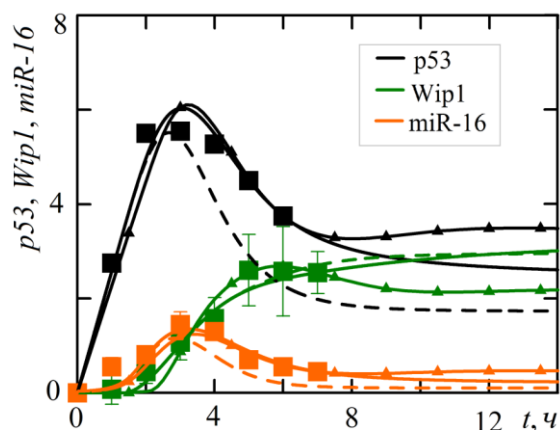


Рисунок 4.2. Динамика нормированных уровней p53, Wip1 и miR-16 в клетках линии U2OS остеосаркомы человека. Состояние после облучения: *квадраты* – экспериментальные данные [11], *сплошные линии* – базовая модель с набором параметров $Opt^{[11]}$, *сплошные маркированные линии* – модель 4.1; *штриховые линии* – моделирование состояния до облучения (базовая модель при $a_2 = 1.5a_2^{Opt}$).

На рисунке 4.2 видно, что численное решение базовой модели при $Opt^{[11]}$ количественно и качественно согласуется с лабораторными данными [11]: наблюдается один всплеск уровней белков и микроРНК, при этом уровень Wip1 изменяется в противофазе с p53 и miR-16, что полностью соответствует типу их взаимосвязи. В дальнейшем состояние системы p53–Wip1–miR-16 после облучения [11], которое в рамках принятой модели описывается набором параметров $Opt^{[11]}$, будем называть контрольным состоянием.

4.2.2. Численный анализ функционирования системы p53–Wip1–miR-16. Сопоставление с экспериментальными данными [32]

Цель проведенных в данном разделе численных экспериментов – получить представление о том, может ли базовая модель быть инструментом анализа состояний биологической системы p53–Wip1–miR-16 и условий проведения лабораторного эксперимента [11].

Численный анализ динамики системы p53–Wip1–miR-16 до облучения. Воспользуемся теперь полученным оптимальным решением прямой и обратной задачи для оценки того, каким могло быть состояние биологической системы в раковой клетке до ее облучения. Это состояние будем моделировать увеличением значения параметра a_2 (который описывает скорость деградации p53 под влиянием белка-ингибитора) в наборе $Opt^{[11]}$. При этом используются следующие соображения. Облучение нарушает регуляцию p53 его ингибитором (в рамках базовой модели это соответствует уменьшению значения параметра a_2), что способствует увеличению уровня p53. При этом активация p53 должна вызвать активацию петли положительной обратной связи p53–miR-16 и снижение уровня Wip1 под влиянием микроРНК.

Исходя из изложенного, можно ожидать, что в состоянии, предшествующем облучению, уровни p53 и miR-16 должны быть ниже, чем в контрольном состоянии, а уровень Wip1 – выше. На рисунке 4.2 представлено численное решение базовой модели при $a_2 = 1.5a_2^{Opt}$ (штриховые линии). Видно, что характерные уровни p53 и микроРНК (стационарные значения решений) снижаются по сравнению с контрольным состоянием на 30% и 50% соответственно. При этом, однако, получено, что уровень Wip1 практически не изменился. Похожая реакция системы наблюдается в рамках базовой модели и при $a_2 > 1.5a_2^{Opt}$.

Таким образом, вопреки ожиданиям, результаты математического моделирования состояния до облучения указывают на тенденцию к снижению экспрессии обоих белков и микроРНК, что можно интерпретировать как приближение к дострессовому состоянию сигнального пути p53 в нормальных клетках. При этом полученное в рамках принятой математической модели одновременное снижение уровней p53 и Wip1 может являться

проявлением нарушения отрицательной обратной связи p53–Wip1, что не характерно в случае нормального функционирования (в здоровых клетках). Однако нарушение отрицательной обратной связи p53–Wip1 соответствует представлениям о функционировании этой системы в случае раковых клеток (это согласуется с условиями лабораторных экспериментов [11]).

Сопоставление с экспериментальными данными [32]. Для удобства анализа и лучшего понимания полученных результатов приведенные выше численные решения рассмотрены с позиции более масштабного экспериментального исследования [32] (его подробное описание приведено в параграфе 1.4). Отметим, что в [32], как и в [11], анализировалась реакция системы p53–Wip1 в раковых клетках на стрессовое воздействие, вызванное облучением клеток.

На рисунке 4.3 приведены результаты лабораторных измерений [32], и результаты расчетов базовой модели (обезразмеренные значения, без дополнительной обработки данных) при поочередном изменении параметров относительно базального набора значений и при варьировании набора значений параметров $Opt^{[11]}$. Здесь же представлены верхние границы условной (относительно произвольно установленной в главе 1 в рамках принятого подхода к моделированию) нормы для значений уровней p53 и его ингибиторов, которые согласуются с оценками, сделанными в [13, 32]. Эти границы позволяют выделить характерные состояния системы – условная норма в здоровом организме (N), высокий риск развития рака (C) и массовая гибель клеток, приводящая к патологическим процессам (D).

На рисунке 4.3 маркером I показано полученное в расчетах контрольное состояние (при $Opt^{[11]}$). Можно видеть, что это состояние характеризуется достаточно низким уровнем активации системы p53–Wip1–miR-16 (обезразмеренные стационарные значения уровней p53, Wip1 и miR-16 составляют 23.1, 158.7 и 34.3 соответственно). Это на качественном уровне согласуется со всеми известными представлениями о состоянии системы в условиях низкого уровня стрессового воздействия или при его отсутствии. На это обстоятельство указывает также полученный в эксперименте [11] импульсный режим функционирования системы p53–Wip1–miR-16 (см. рисунок 4.2). Как уже отмечалось в разделе 1.4.1, импульсный режим динамики уровня p53 и его белка-ингибитора характерен для клеток с достаточно низким уровнем повреждения ДНК.

Неявная положительная обратная связь p53–Wip1. Полученная в рамках базовой модели оценка контрольного состояния системы p53–Wip1 не противоречит главной цели экспериментального исследования [11], которая заключается в изучении механизма активации пути p53 как такового. Численный анализ показывает, что при уменьшении значения параметра a_2 , которое описывает усиление стрессового воздействия, тенденция изменения уровней белков соответствует представлениям о нормальном функционировании петли отрицательной обратной связи p53–Wip1. Так, в расчетах получено, что с уменьшением a_2 значения уровней

p53 и микроРНК увеличиваются, а уровень Wip1, наоборот, снижается за счет увеличения негативного воздействия со стороны микроРНК. В качестве примера такого решения на рисунке 4.3 (маркер 2) приведены стационарные значения решения при $a_2 = 0.625a_2^{Opt}$ (уровни белков и микроРНК равны 44.6, 124.3 и 151.9 соответственно).

Однако дальнейшее уменьшение параметра a_2 в интервале значений $0.208a_2^{Opt} < a_2 < 0.625a_2^{Opt}$ меняет тенденцию экспрессии Wip1, и уровень Wip1 начинает расти (хотя пока не превышает контрольного уровня). При $a_2 < 0.208a_2^{Opt}$ стационарное решение, описывающее уровень p53, увеличивается 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 рисунке 4.3).

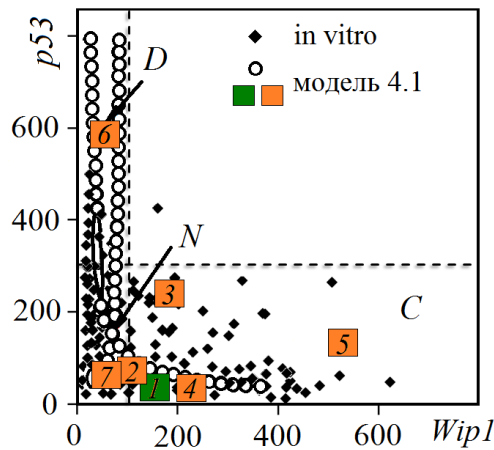


Рисунок 4.3. Фазовый портрет состояний сети p53–Wip1: ромбы – лабораторные данные [32]; круги – базовая модель, поочередное варьирование параметров относительно базальных значений; квадраты – базовая модель, варьирование параметров $Opt^{[11]}$ (1 – контрольное состояние при $Opt^{[11]}$, 2 – $a_2 = 0.625a_2^{Opt}$, 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 – $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$).

Такое поведение системы p53–Wip1–miR-16, не соответствующее известным представлениям о типе взаимосвязей в рассматриваемой системе (см. рисунок 4.1), очевидно, может возникать в случае преобладания положительного воздействия p53 на Wip1 над негативной регуляцией микроРНК. Для исследования данного предположения проведены расчеты при $b_3 = 0$, т.е. при полном отсутствии воздействия микроРНК на Wip1. Полученные результаты приведены на рисунке 4.3: маркер 4 – стационарные значения при $b_3 = 0$ и $a_2 = a_2^{Opt}$, маркер 5 – при $b_3 = 0$ и $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$. Видно, что в этом случае при уменьшении a_2 происходит увеличение уровня Wip1, то есть петля отрицательной обратной связи функционирует нормально.

Описанный эффект обусловлен тем, что на белок Wip1 одновременно воздействуют p53 (положительное воздействие) и miR-16 (негативное воздействие). При этом эффект увеличения уровня Wip1 с усилением стресса и снижения регуляторной функции микроРНК описывается в лабораторном исследовании [11] как проявление неявной положительной обратной связи в системе p53–белок-ингибитор. В целом ряде экспериментальных работ, включая [11], было отмечено, что в случае облучения клетки уровни p53 и микроРНК увеличиваются, а вместе с этим усиливаются и соответствующие воздействия на Wip1, результат которых, по-видимому, не всегда «однозначен».

4.2.3. Численное исследование сверхэкспрессии микроРНК как способа подавления Wip1 в терапевтических целях. Синергический эффект сверхактивации пути p53 под контролем микроРНК

С практической точки зрения наиболее интересной представляется задача об оценке (в рамках эксперимента [11]) роли miR-16 в рассматриваемой системе, в том числе – как мишени терапевтического противоракового воздействия. Для того чтобы продемонстрировать не только контрольное состояние, т.е. состояние p53–Wip1–miR-16 после слабого стрессового воздействия (вызванного ионизирующим облучением), но и эффективные терапевтические стратегии, динамика биологической системы p53–Wip1–miR-16 моделировалась в еще более широком, чем ранее, диапазоне фазовых состояний. Расчеты проводились при поочередном варьировании значений параметров (относительно оптимального набора $Opt^{[11]}$), описывающих функционирование микроРНК. Проведены численные эксперименты при изменении параметров, регулирующих генерацию (параметры c_1 и c_2) и деградацию (параметр c_3) микроРНК за счет конститутивных и неучтенных явно процессов. Полученные результаты расчетов подтверждают выводы [11]: активация miR-16 ингибирует экспрессию Wip1, чувствительную к повреждению ДНК, а подавление miR-16 способствует увеличению уровня Wip1. Однако численные эксперименты показывают, что полученные изменения приводят к достаточно слабой реакции p53, и их не следует расценивать как критические для всей биологической системы. Так, при $c_1 = 100c_1^{Opt}$ стационарное решение, соответствующее уровню miR-16, возросло в 32 раза, а решение, соответствующее уровню Wip1, уменьшилось только на 50% (относительно стационарного решения при $Opt^{[11]}$, описывающего контрольное состояние и отмеченного маркером I на рисунке 4.3). Расчеты при $c_3 = 10c_3^{Opt}$ показали, что уровень miR-16 близок к нулю, а уровень Wip1 увеличился лишь на 38%.

В результате проведенных численных экспериментов получено, что ослабление регуляции p53 его ингибитором (уменьшение a_2) или усиление воздействия микроРНК на Wip1

(увеличение b_3) не могут привести к гиперактивации p53 и значительному снижению уровня Wip1, и, следовательно, запуску p53-зависимого апоптоза в раковых клетках. Однако при одновременном моделировании данных воздействий (за счет уменьшения a_2 и увеличения b_3) получены решения, которые могут рассматриваться в качестве демонстрации синергического эффекта, который способен обеспечить (с большой долей вероятности) гибель раковых клеток за счет запуска p53-зависимого апоптоза. На рисунке 4.3 (маркер 6) представлен вариант такого решения базовой модели, полученный при $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$, $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$ (остальные параметры равны значениям из набора $Opt^{[11]}$). Видно, что в данном случае численное решение соответствует состоянию D : весьма высокий уровень p53 при достаточно низком уровне Wip1. При этом подобное состояние не достигается воздействием только на одно из звеньев положительной обратной связи p53–микроРНК – только за счет $a_2 = 0.104a_2^{Opt}$ (маркер 3 на рисунке 4.3) или только при $b_3 = 3.75b_3^{Opt}$ (маркер 7 на рисунке 4.3). Отметим, что полученные в ходе численного анализа результаты иллюстрируют проявление механизма «бимодального» переключения системы из состояния с достаточно низким уровнем p53 в состояние гиперактивации p53.

Напомним, что обнаруженный в ходе численного анализа лабораторных данных [11] синергический эффект при функционировании положительной обратной связи p53–микроРНК был описан ранее в результате исследования решений базовой модели в случае поочередного изменения значений параметров относительно базальных значений (см. параграф 3.4). Кроме того, сведения о синергическом эффекте, наблюдаемом при функционировании сложной биологической системы сигнального пути белка p53, приводятся в лабораторных исследованиях [40, 61, 236].

Таким образом, численный анализ динамики системы p53–Wip1–miR-16 в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов [11], указывает на достаточно сложный механизм функционирования данной биологической системы. Были получены данные, свидетельствующие о том, что этот механизм связан не только с рассмотренными в принятых моделях петлями отрицательной p53–Wip1 и положительной p53–микроРНК обратной связи, но и с действующей только в определенных интервалах изменения параметров системы положительной обратной связью p53–Wip1. Кроме того, в рамках базовой модели продемонстрирован синергический эффект, связанный именно с функцией микроРНК miR-16 как регулятора Wip1 и его способностью запустить в стрессовых условиях гиперактивацию петли положительной обратной связи p53–микроРНК, в том числе – с терапевтической целью активировать программу апоптоза раковых клеток.

4.2.4. Математическая модель динамики системы p53–Wip1–miR-16–мРНК Wip1 (модель 4.1)

Результаты лабораторных исследований (см., например, [11]) указывают на то, что miR-16 воздействуют непосредственно не на белок, а на мРНК белка-ингибитора. В то же время, вклад мРНК белков в базовой модели до сих пор учитывался лишь опосредовано, в предположении пропорциональности уровней мРНК и одноименного белка. Поэтому представляет интерес оценка адекватности принятого подхода на примере моделирования условий экспериментов [11]. Разработана модификация базовой модели, в которой учитывается динамика мРНК белка-ингибитора (модель 4.1):

$$\begin{aligned}\frac{dy_1}{dt} &= a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \\ \frac{dy_{2m}}{dt} &= b_0 + b_1 g(y_1(t - \tau_{1m}), y_{2m}(t - \tau_{1m}), k_g) \\ &\quad - b_2 y_{2m}(t) - b_3 f(y_{2m}(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \\ \frac{dy_2}{dt} &= b_{1p} y_{2m}(t - \tau_{1p}) - b_{2p} y_2(t), \\ \frac{dy_3}{dt} &= c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t).\end{aligned}$$

Здесь y_{2m} – уровень мРНК Wip1, остальные обозначения совпадают с принятыми в базовой модели; $\tau_{1m} + \tau_{1p} = \tau_1$; $y_{2m}(0) = 0$. Отметим, что в базовой модели и модели 4.1 совпадает вид уравнений для динамики p53 и микроРНК. В силу предположительной близости постановок задач для базовой модели и модели 4.1, в ходе решения обратной коэффициентной задачи определялись значения параметров $b_1, b_2, b_{1p}, b_{2p}, \tau_{1m}, \tau_{1p}$ модели 4.1, остальные параметры полагались равными оптимальным значениям, полученным для базовой модели. Погрешность численного решения прямой задачи, вычисленная в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, для метода предиктор-корректор 2-го порядка на сетке с шагом $h = 0.1$ составляет $3.90 \cdot 10^{-2}\%$.

В результате решения обратной коэффициентной задачи получены следующие значения параметров модели 4.1: $b_1 = 1, b_2 = 1.8 \cdot 10^{-2}, b_{1p} = 1.05, b_{2p} = 2.2 \cdot 10^{-1}, \tau_{1m} = 37, \tau_{1p} = 85$. Численное решение прямой задачи, соответствующее оптимальному набору параметров модели 4.1, приведено на рисунке 4.2. Видно, что полученное решение модели 4.1 весьма близко к результатам расчетов, проведенных с применением базовой модели, и к лабораторным данным [11]. Так, наблюдается постепенное увеличение уровня белка Wip1, который достигает максимального значения через 6 часов после облучения. При этом наибольшее значение уровня miR-16 получено через 2–4 часа после обработки, когда белок Wip1 еще держится на относительно низком уровне. Отметим, что в рамках модели 4.1 изменение уровня Wip1 имеет

замедленное начало в отличие от мРНК Wip1 в ответ на облучение, что согласуется с данными *in vitro* [11].

Таким образом, разработана более детальная, чем базовая модель, модель 4.1, включающая в рассмотрение мРНК белка-ингибитора p53. Представленные результаты численных и лабораторных экспериментов свидетельствуют об адекватности используемого в базовой модели подхода к моделированию функционирования белков и микроРНК без учета в явном виде мРНК белков. Особо отметим, что результаты численного анализа модели 4.1 повторяют выводы, полученные при использовании базовой модели, о синергическом эффекте и важнейшей регуляторной функции p53-зависимых микроРНК в процессе гиперактивации положительной обратной связи p53–микроРНК, а также о существовании неявной положительной обратной связи p53–Wip1.

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

Представляет интерес вопрос о том, можно ли и как на основе базовой модели построить математическую модель, учитывающую воздействия сразу нескольких микроРНК на рассматриваемую систему белка p53. Для этого была привлечена работа [12], в которой приведены результаты лабораторных экспериментов, исследующих совместную динамику уровней p53, его белка-ингибитора (Mdm2), белка p21 и четырех p53-зависимых микроРНК miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215 в клетках множественной миеломы при воздействии нутлина-3.

Множественная миелома (ММ) – это злокачественное заболевание крови, при котором происходят нарушения в механизмах регуляции сигнального пути p53, вызывая существенное уменьшение уровня p53 и подавление p53-зависимого апоптоза. Известно [12], что

1) микроРНК miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215 связаны с p53 положительной обратной связью, так как находятся под позитивным воздействием со стороны p53 и способны регулировать белок Mdm2;

2) экспрессия этих микроРНК в раковых клетках множественной миеломы снижена, но может быть активирована за счет p53;

3) белок p21 является одной из мишеней белка p53, координирует регуляцию клеточного цикла и старения; имеется прямая связь между активацией указанных микроРНК и белка p21;

4) малые молекулы нутлин-3 активируют экспрессию белка p53 дикого типа за счет сбоя во взаимодействии p53–Mdm2, ингибируя белок Mdm2, и рассматриваются в качестве химиотерапевтического противоракового препарата.

Главные выводы экспериментального исследования [12] о роли p53-зависимых микроРНК состоят в следующем:

а) miR-34a, miR-192, miR-194 и miR-215 играют ключевую роль в активации сигнального пути p53 и восстановлении контроля клеточного цикла в клетках ММ при активации белков p53 и p21 за счет воздействия молекулами нутлин-3;

б) сверхэкспрессия микроРНК в раковых клетках приводит к увеличению эффективности терапевтического воздействия нутлином за счет увеличения его p53-активирующего эффекта.

4.3.1. Математическая модель (модель 4.2)

Для описания динамики системы p53–Mdm2–miR-34a–miR-192–miR-194–miR-215–p21 в условиях, приближенных к условиям лабораторного эксперимента [12], на основе базовой модели разработана следующая математическая модель, которая учитывает влияние на систему p53 сразу четырех микроРНК:

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

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 [12]. В согласии с экспериментальными данными [12] начальные условия прямой задачи задавались равными нулю: $y_k(\theta) = 0$ ($k = 1, 2, 4$), $y_3^{m34}(\theta) = y_3^{m192}(\theta) = y_3^{m194}(\theta) = y_3^{m215}(\theta) = 0$, $\theta \in [-\tau, 0]$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4)$.

Учитывая условия лабораторного исследования [12], характерный масштаб времени полагался равным $T = 1$ мин. Для лучшего согласования с экспериментальными данными [12] в уравнение динамики Mdm2 был добавлен параметр b_0 . Отметим, что значение параметра b_0 полагалось достаточно близким к нулю.

4.3.2. Результаты математического моделирования

Для численного решения прямой задач использовался описанный ранее численный алгоритм, основанный на методе шагов и известных методах решения задачи Коши (см. главу 1). Как и прежде, погрешность численного решения прямой задачи оценивалась в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, с применением правила Рунге и для метода предиктор-корректор 2-го порядка равна $2.92 \cdot 10^{-2}\%$ на сетке с шагом $h = 0.05$.

Для решения обратной коэффициентной задачи применялся генетический алгоритм BGA, значения параметров которого полагались равными $z = 400$ и $N_{gen} = 50$ (значения остальных параметров алгоритма приведены в параграфе 4.1). Отметим некоторое сходство условий проведения лабораторных экспериментов в работах [13] и [12], а именно: активация белка p53 в раковых клетках за счет малых молекул (этопозид в [13] и нутлин в [12]), ингибирующих белок Mdm2. Поэтому при определении интервалов начальных приближений I_0 в алгоритме BGA опирались на данные, полученные в ходе методических расчетов при моделировании условий экспериментов [13] (для дозы нутлина 10 мкмоль/л). Оптимальный набор значений параметров $Opt^{[12]}$ определялся в результате численного анализа выборки, состоящей из 40 запусков алгоритма BGA и приведен в таблице 4.1.

Как и в целом ряде работ (см., например, [95]) в качестве функции, описывающей влияние нутлина, используется функция Хилла. Дополнительно кроме модели 4.2 рассматривалась модель 4.2а, в которой уравнение динамики p53 заменено на уравнение (4.1):

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

При этом влияние нутлина на систему p53–микроРНК моделируется выборочным изменением параметров уравнения (4.1). Отметим, что при использовании модели 4.2а уменьшается количество параметров, значения которых определяются в ходе решения обратной задачи. Однако привлечение функции $N(t)$ представляется более универсальным и удобным при проведении дальнейших расчетов.

В рамках модели 4.2а согласованность с лабораторными измерениями [12] может достигаться при изменении только параметра a_2 (при $a_2 = 3.46 \cdot 10^{-3}$), остальные параметры равны значениям из набора $Opt^{[12]}$, полученного для модели 4.2.

Таблица 4.1 – Оптимальные значения параметров модели 4.2 для описания экспериментальных данных [12], полученные в ходе решения обратной коэффициентной задачи.

	$Opt^{[12]}$		$Opt^{[12]}$		$Opt^{[12]}$
a_1	$3.8 \cdot 10^{-1}$	c_1^{m34}	40.47	k_p^{m194}	69.06
a_2	$1.5 \cdot 10^{-2}$	c_2^{m34}	5.03	c_1^{m215}	20.77
a_3	$3 \cdot 10^{-4}$	c_3^{m34}	2.68	c_2^{m215}	4.56
α_n	1	k_m^{m34}	30.72	c_3^{m215}	3.22
k_n	3.17	k_p^{m34}	91.29	k_m^{m215}	25.03
b_0	10^{-3}	c_1^{m192}	44.87	k_p^{m215}	41.05
b_1	1.72	c_2^{m192}	5.76	d_1	4.15
b_2	$3.25 \cdot 10^{-3}$	c_3^{m192}	4.12	d_2	$1.62 \cdot 10^{-2}$
b_3^{m34}	$6.93 \cdot 10^{-3}$	k_m^{m192}	8.96	d_3	24.17
b_3^{m192}	$5.23 \cdot 10^{-4}$	k_p^{m192}	72.81	k_b	36.48
b_3^{m194}	$2.45 \cdot 10^{-3}$	c_1^{m194}	42.56	τ_1	210
b_3^{m215}	$4.81 \cdot 10^{-3}$	c_2^{m194}	6.54	τ_2	50
k_f	246.81	c_3^{m194}	4.73	τ_3	30
k_g	51.01	k_m^{m194}	30.93	τ_4	130

На рисунке 4.4 представлены результаты численного решения задачи. Видно, что решения моделей 4.2 и 4.2а при соответствующих оптимальных наборах параметров практически совпадают и достаточно близки к лабораторным данным [12]. Расчеты показали, что при воздействии нутлином происходит повышение уровня р53 и связанных с ним белка р21 и микроРНК miR-34а, miR-192, miR-194, miR-215 при достаточно низком уровне белка Mdm2.

Воспользуемся полученным решением, описывающим воздействие нутлина на сигнальный путь р53 в раковых клетках ММ, для приближенной оценки динамики системы до этого воздействия. Для этого достаточно в модели 4.2 положить $N(t) = 0$, а значения параметров положить равными значениям из набора $Opt^{[12]}$. Численный анализ показывает, что при $N(t) = 0$ уровни р53, микроРНК и р21 ниже, а уровень Mdm2 выше, чем в случае воздействия нутлином, что согласуется с биомедицинскими представлениями (см., например, [12, 32]).

Важно отметить, что принятые минимальные математические модели 4.2 и 4.2а и алгоритм BGA способны различать особенности кинетики разных микроРНК, измеряемых в лабораторных экспериментах [12]. Результаты проведенных численных экспериментов указывают на то, что математические модели 4.2 и 4.2а и алгоритм BGA достаточно хорошо

описывают особенности кинетики разных микроРНК miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215, полученные в ходе лабораторных измерений [12]. В рамках принятых моделей получено, что все рассматриваемые микроРНК демонстрируют достаточно высокую чувствительность к обработке нутлином, при этом реакция miR-34 была наиболее сильной.

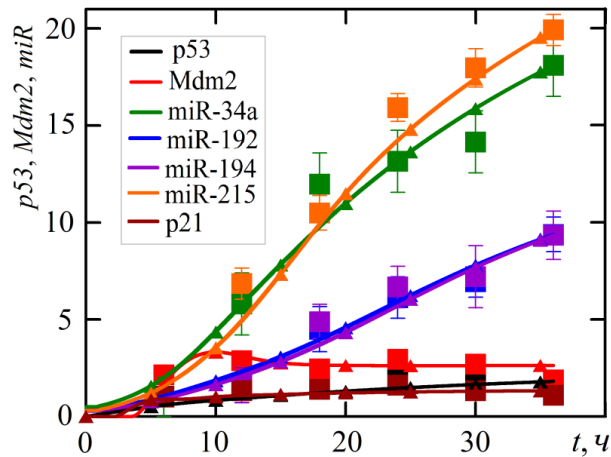


Рисунок 4.4. Динамика системы p53–Mdm2–miR-34a–miR-192–miR-194–miR-215–p21 в раковой клетке под воздействием нутлина: *квадраты* – экспериментальные данные [12]; *сплошные линии* – модель 4.2 при оптимальных значениях параметров $Opt^{[12]}$; *линии, маркированные треугольниками* – модель 4.2а. Представление данных согласовано с принятым в [12].

Анализ численных решений модели 4.2 и экспериментальных данных [12] позволил вновь выдвинуть гипотезу о наличии синергического эффекта в механизме гиперактивации петли положительной обратной связи p53–микроРНК при воздействии нутлина в условиях стресса. Для проверки данной гипотезы проведен ряд численных экспериментов, в ходе которых с использованием модели 4.2 проанализировано влияние на систему p53–микроРНК двух воздействий: активация p53 за счет нутлина и отрицательное воздействие микроРНК на белок-ингибитор.

В качестве «исходного» состояния системы p53–микроРНК рассматривается состояние при исключении влияния нутлина и отсутствии воздействия на Mdm2 со стороны рассматриваемых микроРНК, которое соответствует решениям 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 рисунке 4.5). Для описания «финального» состояния, под которым понимаем состояние системы p53–микроРНК, наблюдаемое после воздействия нутлина в лабораторном эксперименте [12], использовались численные решения при оптимальном наборе значений параметров (траектории 2 на рисунке 4.5). В случае воздействия заданной дозы нутлина (10 мкмоль/л) и отсутствии отрицательного влияния каждого из рассматриваемых микроРНК на Mdm2 ($b_3^m = 0$) наблюдается достаточно умеренная активация p53 и микроРНК (семейство

траекторий 3 на рисунке 4.5). Похожий эффект получен (см. семейство траекторий 4 на рисунке 4.5) и в случае исключения влияния нутлина и активации всех четырех микроРНК (за счет $c_1 = 20c_1^{Opt}$ для каждого микроРНК) до уровня, соответствующему контрольному состоянию. Отметим, что результаты численного анализа, наглядно представленные на рисунке 4.5, указывают на наличие «бимодального» переключения сценария нормального функционирования системы p53–микроРНК («исходное» состояние) на сценарий гиперактивации p53 и микроРНК («финальное» состояние) при стрессовом воздействии.

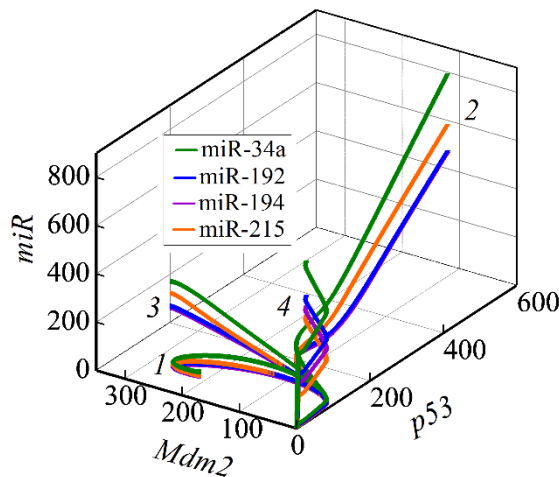


Рисунок 4.5. Синергический эффект гиперактивации пути p53 в эксперименте [12], полученный в рамках модели 4.2 при варьировании параметров $Opt^{[12]}$: 1 – при отсутствии нутлиновой терапии и воздействия микроРНК на Mdm2, 2 – совместное воздействие нутлина и микроРНК (синергия), 3 – нутлиновая терапия без учета микроРНК, 4 – активация микроРНК при отсутствии нутлина.

Таким образом, анализ результатов численных экспериментов показал, что в рамках принятой математической модели микроРНК-зависимое подавление Mdm2 в случае отсутствия обработки нутлином не приводит к гиперактивации p53 в раковых клетках ММ с p53 дикого типа. И точно так же, недостаточно только воздействия нутлина в случае относительно слабо выраженной роли микроРНК как ингибитора Mdm2. Согласно модели, синергический эффект совокупного влияния нутлина и p53-зависимых микроРНК является ключевым механизмом, который способен запустить гиперактивацию петли положительной обратной связи p53–микроРНК в лабораторных экспериментах [12]. Следовательно, микроРНК, связанные с p53 положительной обратной связью, действительно могут играть одну из ключевых ролей в увеличении эффективности противораковой терапии.

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 (см. рисунок 4.6). В численных экспериментах отсутствие

влияния конкретного микроРНК моделировалось посредством обнуления соответствующего ему параметра b_3 . Результаты численных экспериментов показали, что воздействие только одного из микроРНК miR-34a, miR-192, miR-194 или miR-215 (пунктирные линии на рисунке 4.6) достаточно слабо влияет на подавление Mdm2.

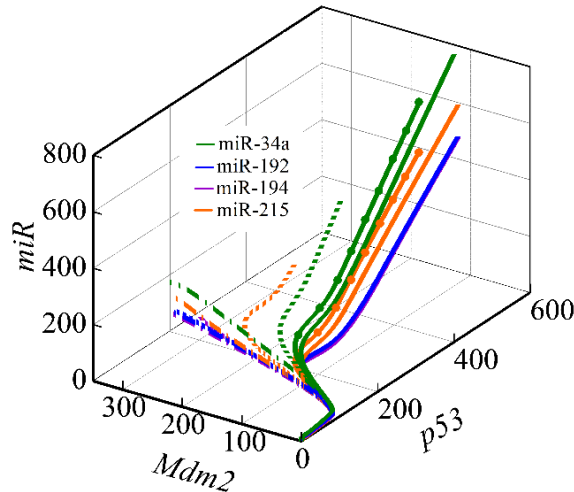


Рисунок 4.6. Иллюстрация аддитивного эффекта влияния микроРНК на Mdm2 в эксперименте [12], полученный в рамках модели 4.2 при варьировании параметров $Opt^{[12]}$: *сплошные линии* – одновременное воздействие miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215, *пунктирные линии* – воздействие только одного микроРНК, *штрихпунктирные линии* – отсутствие воздействия всех рассматриваемых микроРНК, *маркированные линии* – совместное воздействие miR-34a и miR-215.

Расчеты показали также, что в рамках модели 4.2 совместное влияние miR-34a и miR-215 (маркированные линии на рисунке 4.6) приводит систему в состояние, близкое к наблюдаемому в экспериментах [12] (сплошные линии на рисунке 4.6). Таким образом, результаты численного анализа указывают на наличие аддитивного (синергического) эффекта, связанного с усилением влияния на сигнальный путь p53 при одновременном воздействии miR-34a и miR-215.

Результаты математического моделирования об аддитивном (синергическом) эффекте гиперактивации пути p53 несколькими микроРНК (включая miR-34) согласуются с данными *in vitro* и выводами опубликованной недавно экспериментальной работы [238], где детально анализировалось совместное влияние miR-34a и miR-200c. Авторы [238] обращают внимание на то, что аддитивные эффекты с участием микроРНК недостаточно изучены. Например, как miR-34a, так и miR-200c индивидуально подавляют развитие различных типов рака, но клеточные эффекты их комбинированного действия остаются неизвестными. Отметим, что микроРНК miR-200c можно отнести к тому же классу микроРНК, что и miR-215, поскольку они связаны с p53 положительной обратной связью. Так, известно, что белок p53 способен трансаktivировать miR-200c [239], и miR-200c ингибирует белок Sirt1 [240], который, как и Mdm2, является белком-ингибитором p53. Опубликованные в работе [238] результаты лабораторных

исследований свидетельствуют о том, что совместное индуцирование miR-34a и miR-200c в клеточных линиях рака молочной железы с большей вероятностью запускает программу апоптоза (через активацию сигнального пути p53) и остановку клеточного цикла по сравнению с индуцированием только miR-34a или только miR-200c.

4.4. Математическое моделирование ингибирования Sirt1 при оксидативном стрессе в эпителиальных клетках дыхательных путей при ХОБЛ

Второй тип рассмотренных в данной главе задач направлен на изучение основных механизмов регуляции p53-пути при дегенеративных процессах, вызванных окислительным стрессом и связанной с ним патологической гибелью нормальных клеток. Оксидативный стресс обусловлен повышенным уровнем токсичных активных форм кислорода и азота и считается одним из основных факторов, запускающих программу клеточного старения, которые отягощают патогенез ХОБЛ (хроническое воспалительное заболевание легких), фиброза печени, синдрома Дауна и многих других заболеваний.

Известно, что клеточное старение регулируется белками p53, p21 и Sirt1 (один из белков-ингибиторов p53), однако под наиболее пристальным вниманием исследователей в целом ряде работ находятся p53-зависимые микроРНК как потенциальные терапевтические мишени при ХОБЛ и анализ их регуляторной функции. Так, в экспериментальной работе [40] для эпителиальных клеток бронхов человека (клеточная линия BEAS2B) продемонстрировано, что при оксидативном стрессе активация miR-34a приводит к уменьшению уровня белка Sirt1, что может ускорить патологические процессы гибели клеток. В [40] для исследования реакции системы Sirt1–miR-34a на оксидативный стресс клетки линии BEAS2B обрабатывали в течение 48 часов перекисью водорода H_2O_2 .

Ряд лабораторных исследований (см., например, [241]) указывают на то, что, по-видимому, оксидативный стресс вызывает активацию микроРНК за счет активации p53. Поэтому для описания условий этого эксперимента разработана модификация базовой модели, учитывающая уровень оксидативного стресса и его влияние на активацию miR-34a через активацию p53.

4.4.1. Математическая модель динамики системы p53–микроРНК под влиянием оксидативного стресса (модель 4.3)

Предложена модификация базовой модели, которая может быть представлена в следующем достаточно общем виде (модель 4.3):

$$\frac{dR}{dt} = k_1 + k_2 \frac{y_1}{y_1 + k_3} R - k_4 R, \quad (4.6)$$

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 + \frac{a_{1R}R}{R + a_{2R}} - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (4.7)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_0 + b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \quad (4.8)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (4.9)$$

Здесь, как и прежде, y_1 , y_2 – уровни белков p53 и белка-ингибитора, y_3 – уровень микроРНК, R – уровень оксидативного стресса. Отметим, что при $k_1 = 0$ модель 4.3 описывает динамику сигнального пути p53 в случае отсутствия оксидативного стресса (состояние условной нормы) и совпадает с базовой моделью.

Применительно к рассматриваемой в данном параграфе задаче о математическом моделировании функционирования системы p53–Sirt1–miR-34a в условиях оксидативного стресса в модели 4.3 будем полагать: y_1 , y_2 – уровни белков p53 и Sirt1, y_3 – уровень miR-34a, R – уровень оксидативного стресса. Для удобства сопоставления с лабораторными данными [40] характерный масштаб времени устанавливался равным $T = 1$ мин. Для системы (4.6)–(4.9) в согласии с экспериментальными измерениями [40] задавались следующие начальные условия: $y_k(\theta) = 0$ ($k = 1, 2, 3$), $R(\theta) = 0$, $\theta \in [-\tau, 0]$, $\tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3)$.

4.4.2. Результаты математического моделирования

Для решения основной начальной задачи использовался численный алгоритм, представленный в главе 1. Погрешность численного решения прямой задачи в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, составляла $1.31 \cdot 10^{-2}\%$ на сетке с шагом $h = 0.1$.

Для определения набора значений параметров, обеспечивающего согласие численных решений модели 4.3 с экспериментальными данными [40] решалась обратная коэффициентная задача. Как и прежде, для решения обратной задачи использовался алгоритм BGA при $z = 400$ и $N_{gen} = 40$ (значения остальных параметров алгоритма приведены в параграфе 4.1). Оценка интервала изменения значений каждого параметра в начальном поколении BGA основывалась на известных биологических соображениях. Выбор оптимального набора

значений параметров $Opt^{[40]}$ осуществлялся в результате численного анализа выборки, состоящей из 40 равноценных запусков алгоритма BGA. Отметим, что численные решения прямой задачи нормировались в согласии с представлением лабораторных данных [40].

При решении обратной коэффициентной задачи, наблюдается разрыв между количеством неизвестных параметров и экспериментальных измерений, поэтому применялась вычислительная технология расщепления [184], которая позволяет решить эту проблему. При использовании технологии расщепления на первом шаге по лабораторным данным уровня miR-34a строится кубический сплайн, на который в каждой точке расчетной сетки заменяется численное решение уравнения (4.9). Затем, на втором шаге решается обратная задача для вычисления значений параметров уравнений (4.6)–(4.8). На третьем шаге фиксировалась часть полученных значений параметров и запускался алгоритм BGA для поиска значений следующих параметров: a_{1R} , a_{2R} , k_2 , c_1 , c_2 , k_p , c_3 , τ_2 . Отметим, что при использовании данной технологии требуется близость построенного на первом шаге кубического сплайна и численного решения уравнения (4.9), полученного на третьем шаге.

В результате решения обратной задачи с применением генетического алгоритма BGA и описанной технологии расщепления определен оптимальный набор параметров $Opt^{[40]}$, значения которых приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Оптимальные значения параметров модели 4.3 для описания экспериментальных данных [40], полученные в ходе решения обратной коэффициентной задачи.

	$Opt^{[40]}$		$Opt^{[40]}$		$Opt^{[40]}$
a_1	1.5	b_3	$9.5 \cdot 10^{-3}$	k_1	1.5
a_2	$5.2 \cdot 10^{-3}$	k_f	270	k_2	$2.89 \cdot 10^{-2}$
a_3	10^{-4}	k_g	47	k_3	3.56
a_{1R}	2.93	k_m	80	k_4	$6.38 \cdot 10^{-2}$
a_{2R}	$1.82 \cdot 10^{-1}$	c_1	35	τ_1	80
b_0	10^{-3}	c_2	3	τ_2	35
b_1	1	c_3	1.85	τ_3	30
b_2	$2 \cdot 10^{-3}$	k_p	82.27		

На рисунке 4.7 показано численное решение модели 4.3 при полученном наборе оптимальных значений параметров $Opt^{[40]}$ и лабораторные измерения динамики miR-34a и Sirt1 [40]. Полученные в расчетах кинетические кривые достаточно хорошо согласуются с лабораторными измерениями уровня белка Sirt1 и микроРНК miR-34a. Как и в лабораторном эксперименте, в численном решении максимальное значение уровня Sirt1 достигается через 4 часа после обработки перекисью. Для сравнения здесь же приведено численное решение модели 4.3, соответствующее динамике системы p53–Sirt1–miR-34a при отсутствии

оксидативного стресса (при $k_1 = 0$, $R(0) = 0$, остальные параметры равны оптимальным значениям). Можно видеть, что под воздействием оксидативного стресса наблюдается существенное увеличение уровней p53 и miR-34a (по сравнению с их уровнями до стресса) и снижение уровня Sirt1, что указывает на «бимодальное» переключение функционирования системы p53 в ответ на стресс.

Представляет интерес проанализировать в рамках модели 4.3 роль отрицательного воздействия микроРНК на Sirt1 при активации сигнального пути p53 в ответ на оксидативный стресс. Для этого на рисунке 4.8 приведен фазовый портрет численных решений (обезразмеренные значения, без дополнительной обработки данных) при наличии оксидативного стресса (решения при $Opt^{[40]}$), отсутствии оксидативного стресса (при $k_1 = 0$, $R(0) = 0$) и в случае воздействия оксидативного стресса, но при отсутствии влияния miR-34a на Sirt1 (при $b_3 = 0$). Видно, что при ослаблении отрицательного воздействия miR-34a на Sirt1 (линия 3 на рисунке 4.8) происходит увеличение уровня Sirt1, который сдерживает активацию p53 и микроРНК. Результаты численных экспериментов указывают на синергический эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53–miR-34a, обусловленный одновременным воздействием оксидативного стресса, активирующего p53, и отрицательным влиянием на Sirt1 со стороны miR-34a. Полученные результаты моделирования согласуются с представленными в работе [40] результатами лабораторного исследования в эпителиальных клетках дыхательных путей при ХОБЛ. Так, авторы [40] указывают на то, что оксидативный стресс активирует miR-34a, сверхэкспрессия которого приводит к более существенному снижению уровня Sirt1. При этом ингибирование miR-34a в эпителиальных клетках при ХОБЛ может предотвратить уменьшение уровня белка Sirt1 и инициацию программы клеточного старения.

Таким образом, результаты проведенных в рамках модели 4.3 расчетов согласуются с заключением экспериментальной работы [40] о том, что оксидативный стресс влияет одновременно на экспрессию Sirt1 и miR-34a в эпителиальных клетках бронхов. Согласно результатам численного анализа, такое воздействие приводит к ярко выраженному синергическому эффекту гиперактивации петли положительной обратной связи p53–miR-34a, причем особую роль здесь играет ингибирующее воздействие miR-34a на Sirt1. Этот результат показывает, что miR-34a могут рассматриваться в качестве перспективной терапевтической мишени при ХОБЛ, поскольку ослабление регуляторной функции микроРНК способствует сдерживанию активации p53 белком-ингибитором при воздействии оксидативного стресса, и, следовательно, ослаблению p53-зависимых патологических процессов гибели основных функциональных клеток бронхов.

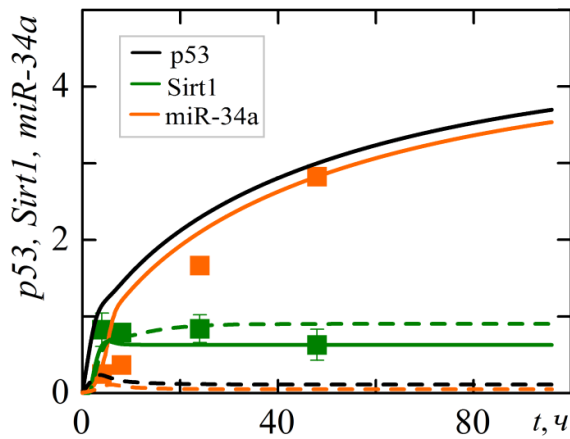


Рисунок 4.7. Динамика системы p53–Sirt1–miR-34a в иммортализованных эпителиальных клетках бронхов человека (BEAS2B) после обработки перекисью водорода H_2O_2 : *маркеры* – экспериментальные данные [40], *сплошные линии* – модель 4.3 при значениях параметров $Opt^{[40]}$; *штриховые линии* – модель 4.3 при $k_1 = 0$ (отсутствие оксидативного стресса).

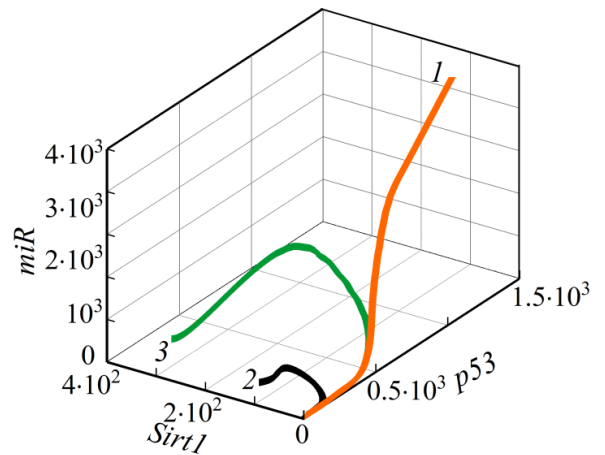


Рисунок 4.8. Фазовые траектории численных решений, описывающих динамику системы p53–Sirt1–miR-34a в клетках BEAS2B после обработки перекисью водорода H_2O_2 : 1 – при наличии оксидативного стресса (при $Opt^{[40]}$), 2 – при отсутствии оксидативного стресса (при $k_1 = 0$), 3 – при наличии оксидативного стресса и ослаблении влияния miR-34a на Sirt1 ($b_3 = 0$).

4.5. Математическое моделирование дегенеративных процессов при фиброзе печени у крыс: численный анализ роли пути p53–miR-34a

В экспериментальной работе [41] приведены данные о динамике системы p53–Sirt1–miR-34a у крыс при фиброзе печени. Известно, что при фиброзе печени происходит массовый апоптоз гепатоцитов (это основные клетки печени) и избыточное образование клеток соединительной ткани, которые не способны обеспечить нормальное функционирование печени. Одним из регуляторов апоптоза гепатоцитов является сигнальный путь p53–Sirt1–miR-34a, который рассматривается в биомедицинских исследованиях в качестве потенциальной терапевтической мишени при фиброзе.

В лабораторном исследовании [41] фиброз печени крыс инициировали внутрибрюшинным введением препарата *CCL4* (0.2 мл/кг), который вызывает оксидативный стресс и апоптоз (см. также [242]). Известно, что система p53–miR-34a взаимодействует по принципу положительной обратной связи: p53 способствует экспрессии miR-34a, а miR-34a активирует p53 через подавление белка Sirt1. При этом белок Sirt1 ингибирует p53 посредством его деацетилирования, однако подавление Sirt1 может способствовать усилению ацетилирования p53, то есть увеличению уровня активной формы белка p53. В [41] приведены данные, указывающие на то, что после введения препарата *CCL4* наблюдается рост ацетилированной формы p53 и сверхактивация miR-34a. Исходя из этого, для описания

динамики сигнального пути p53–Sirt1–miR-34a использовалась модель 4.3, в которой полагаем, что y_1 – уровень ацетилированной формы белка p53, а смысл остальных переменных и параметров модели такие же, что и в параграфе 4.4.

Для численного решения задачи привлекался тот же численный алгоритм и вычислительная технология расщепления обратной коэффициентной задачи, что и в параграфе 4.4. При моделировании динамики системы p53–Sirt1–miR-34a в качестве характерного масштаба времени использовался $T = 1$ час, что согласуется с условиями лабораторного исследования [41]. Погрешность (в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой) численного решения прямой задачи составляет $2.45 \cdot 10^{-2}\%$ на сетке с шагом $h = 0.1$.

Для решения обратной коэффициентной задачи привлекался генетический алгоритм BGA при $z = 400$ и $N_{gen} = 50$ (значения остальных параметров алгоритма приведены в параграфе 4.1). В силу сходства условий проведения лабораторных измерений в работах [41] и [40] (воздействие оксидативного стресса на систему p53–Sirt1–miR-34a) интервалы значений параметров в начальном поколении BGA определялись с учетом данных, полученных в результате моделирования условий экспериментов [40]. Выбор оптимального набора значений параметров осуществлялся в результате численного анализа выборки, состоящей из 40 равноценных запусков алгоритма BGA. Отметим, что в согласии с представлением лабораторных данных [41] компоненты численного решения прямой задачи нормировались на характерные значения, полученные при $k_1 = 0$, $R(0) = 0$, которые соответствуют уровню белков и miR-34a в момент последнего лабораторного измерения в [41] при отсутствии оксидативного стресса. Полученные оптимальные наборы значений параметров $Opt^{[41]}$ для базовой модели и модели 4.3 представлены в таблице 4.3.

На рисунке 4.9 видно, что численные решения базовой модели и модели 4.3 при оптимальных значениях параметров достаточно хорошо согласуются с лабораторными измерениями [41]. Как в расчетах, так и в лабораторных экспериментах получено, что оксидативный стресс приводит к увеличению уровня p53 и miR-34a и снижению Sirt1 относительно нормы (примерно на $18 \div 25\%$).

Для более тщательного анализа влияния оксидативного стресса на динамику системы p53–Sirt1–miR-34a на рисунке 4.10 сопоставляются численные решения модели 4.3, полученные а) при наличии оксидативного стресса [41], б) при отсутствии оксидативного стресса (условная норма) и в) при наличии оксидативного стресса и ослаблении влияния miR-34a на Sirt1. Эти решения получены с привлечением оптимального набора параметров $Opt^{[41]}$, в котором полагалось $k_1 = k_1^{Opt}$ (а), $k_1 = 0$ (б) или $b_3 = 0.06b_3^{Opt}$ (в) соответственно.

Таблица 4.3 – Оптимальные значения параметров базовой модели и модели 4.3 для описания экспериментальных данных [41], полученные в ходе решения обратной коэффициентной задачи.

	$Opt^{[41]}$, базовая модель	$Opt^{[41]}$, модель 4.3		$Opt^{[41]}$, базовая модель	$Opt^{[41]}$, модель 4.3
a_1	4.43	1.5	c_3	1.19	1.85
a_2	$1.73 \cdot 10^{-2}$	$5.7 \cdot 10^{-2}$	k_p	74.05	100
a_3	$4.77 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	τ_1	271	120
b_0	10^{-3}	10^{-3}	τ_2	48	40
b_1	$9.77 \cdot 10^{-1}$	1.05	τ_3	28	45
b_2	$3.54 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	a_{1R}		4.9
b_3	$1.44 \cdot 10^{-2}$	$9 \cdot 10^{-3}$	a_{2R}		$2.54 \cdot 10^{-1}$
k_f	197.75	270	k_1		2.89
k_g	59.13	47	k_2		$6.33 \cdot 10^{-1}$
k_m	18.84	41	k_3		44.28
c_1	34.17	20	k_4		2.29
c_2	3.57	3.76			

Видно, что, в рамках принятой модели p53 активируется в ответ на оксидативный стресс только в случае, когда miR-34a регулирует Sirt1. При этом, как и в параграфе 4.4, результаты численного анализа указывают на «бимодальное» переключение сценария нормального функционирования (линия 2 на рисунке 4.10) на сценарий гиперактивации p53 и микроРНК при воздействии оксидативного стресса (линия 1 на рисунке 4.10). При ослаблении влияния miR-34a на Sirt1 наблюдается увеличение уровня Sirt1, который препятствует чрезмерной активации p53 и miR-34a.

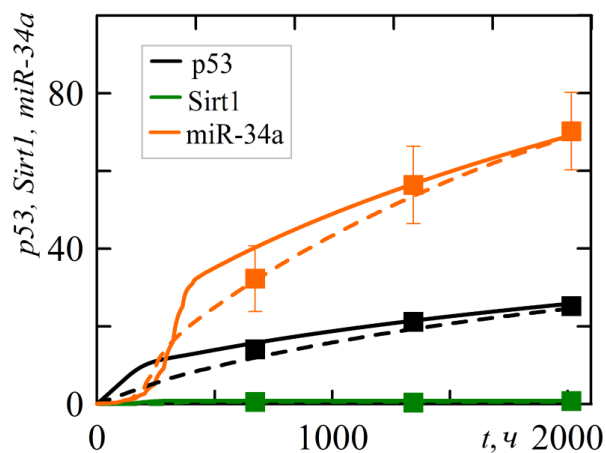


Рисунок 4.9. Динамика системы p53–Sirt1–miR-34a в гепатоцитах крыс после введения препарата CCL4 (инициация фиброза печени): *маркеры* – экспериментальные данные [41], *сплошные линии* – модель 4.3, *штриховые линии* – базовая модель.

Представленные на рисунке 4.10 данные иллюстрируют синергический эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53–miR-34a, индуцированной

оксидативным стрессом под контролем микроРНК. Отметим, что в рамках принятой модели 4.3 ослабление воздействия на *Sirt1* со стороны *miR-34a* может рассматриваться в качестве эффективной терапевтической стратегии при фиброзе печени, поскольку наблюдаемая при этом сдержанная активация *p53* с меньшей долей вероятности приведет к запуску *p53*-зависимого апоптоза.

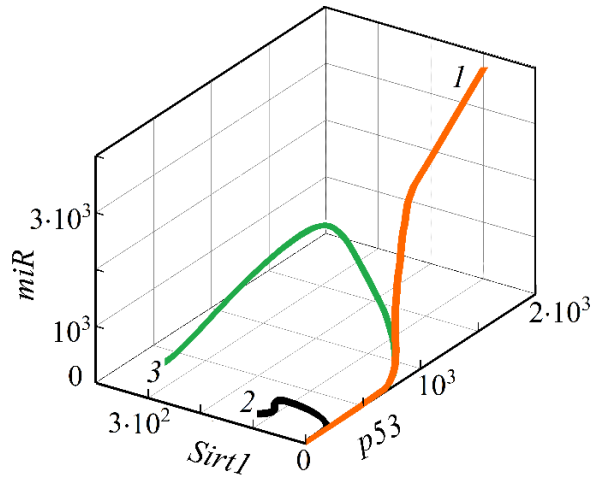


Рисунок 4.10. Фазовые траектории численных решений, описывающих динамику системы *p53*–*Sirt1*–*miR-34a* в гепатоцитах крыс: 1 – при наличии оксидативного стресса, 2 – при отсутствии оксидативного стресса (условная норма), 3 – при наличии оксидативного стресса и ослаблении влияния *miR-34a* на *Sirt1*.

Таким образом, проведенный в рамках модели 4.3 численный анализ подтверждает предположение из экспериментальной работы [41] о том, что воздействие на петлю положительной обратной связи *p53*–*miR-34a* может привести к терапевтическому эффекту при фиброзе печени.

4.6. Математическое моделирование активации пути *p53*, ассоциированной с ранними признаками болезни Альцгеймера при синдроме Дауна

Синдром Дауна (СД) – это генетическое нарушение, которое сопровождается нарушением когнитивных функций мозга и ускоренным апоптозом нейронов еще в относительно раннем возрасте. 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 *p53* 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, [39, 243]). В экспериментальной работе [39] приведены результаты исследования функционирования системы p53–Sirt1–Bax в иммортализованных клетках мозга трансгенной мыши линии Ts65Dn, демонстрирующие, что запуск апоптоза при СД связан с гиперактивацией p53. Белок Bax, являющийся мишенью p53 (прямая положительная связь), признается одним из ключевых белков, обеспечивающих запуск программы p53-зависимого апоптоза. Отметим, что трансгенные мыши линии Ts65Dn часто становятся предметом лабораторных исследований, поскольку обладают многими признаками, которые близки к фенотипическим проявлениям СД у человека, включая типичные проблемы обучения и памяти, нейроанатомические и другие характеристики [244].

4.6.1. Математическая модель динамики системы p53–Sirt1–miR–Bax под влиянием оксидативного стресса (модель 4.4)

Математическая модель (модель 4.4), предназначенная для описания полученных в лабораторных экспериментах [39] данных о динамике системы p53–Sirt1–Bax, включает в себя систему уравнений (4.6)–(4.9) (модель 4.3) и уравнение динамики уровня белка Bax:

$$\frac{dR}{dt} = k_1 + k_2 \frac{y_1}{y_1 + k_3} R - k_4 R, \quad (4.10)$$

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 + \frac{a_{1R} R}{R + a_{2R}} - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (4.11)$$

$$\begin{aligned} \frac{dy_2}{dt} = & b_0 + b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1), k_g) - b_2 y_2(t) \\ & - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \end{aligned} \quad (4.12)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t), \quad (4.13)$$

$$\frac{dy_4}{dt} = d_0 + d_1 g(y_1(t - \tau_4), y_4(t - \tau_4), k_b, d_3) - d_2 y_4(t). \quad (4.14)$$

Здесь y_1 – уровень активной (ацетилированной) формы белка p53, y_2 – уровень Sirt1, y_3 – уровень miR-34a, y_4 – уровень белка Bax, R – уровень оксидативного стресса. Исходя из условий лабораторных измерений [39], характерный масштаб времени $T = 1$ сутки. В согласии с экспериментальными данными [39] задавались следующие начальные условия:

$$y_k(\theta) = 0 \quad (k = 1, 2, 3, 4), \quad R(\theta) = 0, \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4).$$

4.6.2. Результаты математического моделирования

Для решения прямой задачи привлекался численный алгоритм, основанный на использовании метода шагов и известных численных методах решения задачи Коши, подробное описание и методические расчеты приведены в главе 1. Погрешность численного решения прямой задачи оценивалась в матричной норме, согласованной с чебышёвской векторной нормой, и составляет для метода предиктор-корректор 2-го порядка $2.73 \cdot 10^{-2}\%$ на сетке с шагом $h = 0.1$.

Решение обратной коэффициентной задачи проводилось с использованием генетического алгоритма BGA, в котором количество индивидуумов $z = 400$ и число поколений $N_{gen} = 50$ (значения остальных параметров алгоритма приведены в параграфе 4.1) и технологии расщепления обратной задачи, описанной в параграфе 4.4. Отметим, что в работах [39, 40] приведены результаты лабораторных экспериментов, направленных на исследование функционирования сигнального пути p53 при воздействии оксидативного стресса. Поэтому при определении интервалов начальных приближений значений параметров в алгоритме BGA опирались на результаты моделирования условий экспериментов [40, 41]. Как и прежде, при выборе оптимального набора значений параметров оценивались значения функционалов, вычисленных для центральных 50% элементов выборки, полученной в результате 40 запусков BGA. Для корректного сопоставления с экспериментальными данными численные решения прямой задачи нормировались в согласии с представлением лабораторных данных [39].

Поскольку в работе [39] не приведены лабораторные данные об уровне микроРНК, то предполагается, что динамика микроРНК может быть близка к динамике miR-34a при оксидативном стрессе [40, 41], который не только провоцирует p53-зависимый апоптоз в клетках ткани печени и легких (см. параграфы 4.4–4.5), но и, согласно имеющимся данным [245], принимает участие в процессах, связанных с нейродегенерацией. Поэтому при определении значений параметров уравнения (4.13), описывающего динамику микроРНК, опирались на результаты, полученные при моделировании условий экспериментов [40, 41].

В данном разделе реализация технологии расщепления обратной коэффициентной задачи состояла в следующем: на первом шаге по экспериментальным данным уровня p53 строится кубический сплайн, на втором шаге решается обратная задача для вычисления значений параметров уравнений (4.12)–(4.14) (при этом численное решение уравнения (4.11) заменялось в каждой точке расчетной сетки построенным сплайном), на третьем шаге фиксировались полученные значения параметров и решалась обратная задача для следующих параметров: a_{1R} , a_{2R} , a_1 , a_2 , a_3 , k_1 , k_2 , k_3 , k_4 . Полученные оптимальные наборы значений параметров $Opt^{[39]}$ для модели 4.4 представлены в таблице 4.4.

На рисунке 4.11 приведено решение прямой задачи при оптимальных значениях параметров, соответствующих результатам лабораторных экспериментов [39] для мышей Ts65Dn. Видно, что результаты расчетов и лабораторные измерения достаточно близки. В частности, наблюдается уменьшение уровня Sirt1 и активация p53 и белка Вах, что, как предполагают в [39], может привести к запуску p53-зависимого апоптоза и способствовать развитию характерной для болезни Альцгеймера невропатологии у пациентов с синдромом Дауна.

Таблица 4.4 – Оптимальные значения параметров модели 4.4 для описания экспериментальных данных [39], полученные в ходе решения обратной коэффициентной задачи.

	$Opt^{[39]}$		$Opt^{[39]}$		$Opt^{[39]}$
a_1	1.5	k_g	47	k_b	28.9
a_2	$6 \cdot 10^{-2}$	k_m	41	k_1	$2.61 \cdot 10^{-1}$
a_3	10^{-4}	c_1	20	k_2	$7.71 \cdot 10^{-1}$
a_{1R}	4.93	c_2	3	k_3	14
a_{2R}	$3.81 \cdot 10^{-1}$	c_3	1.85	k_4	$9 \cdot 10^{-1}$
b_0	10^{-3}	k_p	100	τ_1	1
b_1	1	d_0	10^{-4}	τ_2	23
b_2	$2 \cdot 10^{-3}$	d_1	5.7	τ_3	46
b_3	10^{-2}	d_2	$5 \cdot 10^{-3}$	τ_4	158
k_f	270	d_3	29.8		

Отметим, что в [39] микроРНК не изучались. Однако в результате математического моделирования и лабораторных экспериментов [40, 41] (см., например, параграфы 4.3 и 4.4) показано, что микроРНК, связанные с p53 положительной обратной связью, способны регулировать функционирование сигнального пути p53. Несмотря на отсутствие данных, представляет интерес приближенная оценка роли микроРНК при нейродегенерации в условиях, приближенных к условиям лабораторного исследования [39].

В рамках модели 4.4 рассмотрена динамика системы p53–Sirt1–микроРНК с привлечением оптимального набора параметров $Opt^{[39]}$, в котором дополнительно моделировалось ослабление отрицательного воздействия микроРНК на Sirt1 за счет уменьшения значения параметра b_3 (от $b_3 = b_3^{opt}$ до $b_3 = 0$). Численные решения, описывающие изменение уровней p53, Sirt1 и микроРНК с течением времени, и фазовые состояния данной системы при значениях $0 \leq b_3 \leq b_3^{opt}$ приведены на рисунках 4.11, 4.12. Видно, что микроРНК играет роль «переключателя», способного регулировать динамику сигнального пути p53. Уменьшение параметра b_3 снижает уровень активного p53 при ослаблении роли микроРНК, обеспечивая снижение уровня повреждения нейронов при синдроме Дауна. В частности, при практически полном отсутствии воздействия микроРНК на Sirt1 (линия 2 на рисунке 4.12) наблюдается

существенное снижение уровня p53, и соответственно, снижение вероятности запуска p53-зависимого апоптоза.

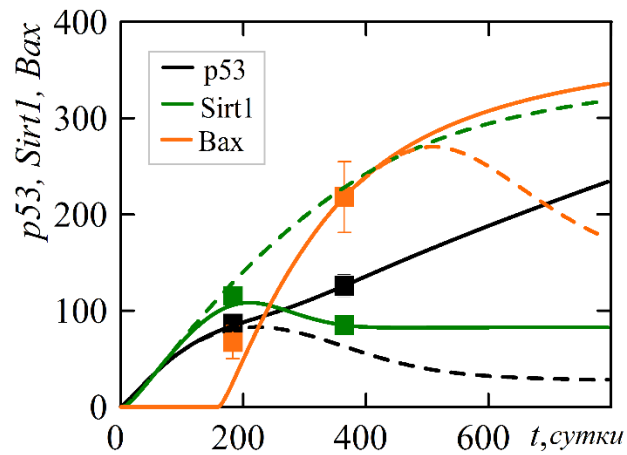


Рисунок 4.11. Динамика системы p53–Sirt1–Bax в клетках мозга трансгенных мышей Ts65Dn. Маркеры – экспериментальные данные [39], сплошные линии – модель 4.4, штриховые линии – модель 4.4 при $b_3 = 10^{-2} b_3^{opt}$ (терапевтическое воздействие при ослаблении роли микроРНК).

Таким образом, результаты математического моделирования указывают на то, что микроРНК могут обеспечивать контроль функционирования системы p53–Sirt1–miR при оксидативном стрессе, способствуя ослаблению нейродегенеративных патологий при синдроме Дауна.

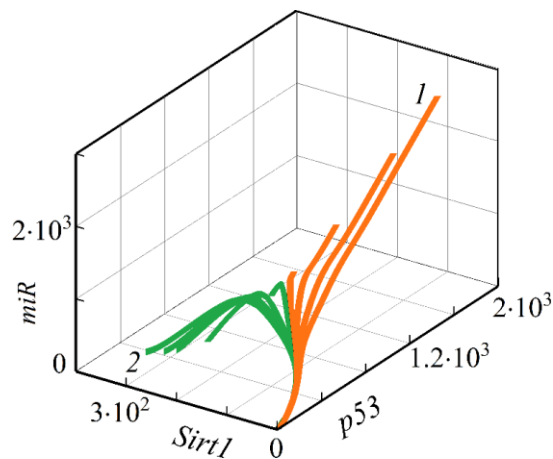


Рисунок 4.12. Фазовые траектории численных решений, описывающих состояния системы p53–Sirt1–miR в клетках мозга трансгенных мышей Ts65Dn при постепенном ослаблении ингибирующего влияния микроРНК на Sirt1: 1 – $b_3 = b_3^{opt}$ (воздействие микроРНК на Sirt1, соответствующее лабораторному исследованию [39]), 2 – $b_3 = 0$ (отсутствие воздействия микроРНК на Sirt1), промежуточные траектории соответствуют $0 < b_3 < b_3^{opt}$.

На рисунке 4.13 представлены оптимальные наборы значений параметров всех представленных в настоящей работе математических моделей, которые были определены в ходе решения обратной коэффициентной задачи с применением стохастического генетического алгоритма VGA и лабораторных экспериментов [11–13, 39–41]. Здесь же для сравнения показаны базальные значения параметров предложенной базовой модели для системы общего вида (модель 3.4, желтые ромбы на рисунке 4.13). Можно видеть, что, несмотря на определенный разброс в значениях одних и тех же параметров, фигурирующих в разных моделях и численных экспериментах, эти данные демонстрируют согласованность оптимальных наборов параметров, а их отклонения относительно базальных значений (описывающих в рамках принятой базовой модели состояние условной нормы для системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК) соответствуют смыслу описываемых лабораторных экспериментов. Например, при моделировании противораковой терапии под воздействием нутлина [12] решение обратной задачи требует в рамках принятой модели уменьшения параметра a_2 , и это соответствует известным представлениям о механизме действия нутлина, который способствует снижению ингибирующего воздействия на p53 со стороны белка-ингибитора Mdm2 и активации p53. В результате моделирования функционирования системы p53–Sirt1–miR-34a при фиброзе печени у крыс, который был инициирован введением препарата CCL4 [41], полученное значение параметра a_1 базовой модели существенно выше базального значения. Увеличение значения параметра a_1 соответствует активации p53, которая наблюдается в экспериментальной работе [41] после введения CCL4 и вызванного им повышения оксидативного стресса. При этом анализ полученных результатов показывает, что при моделировании особенностей функционирования сигнального пути p53, наблюдаемых в лабораторных исследованиях, основную роль преимущественно играют параметры a_2 , b_1 , b_3 , c_2 , k_g , k_p , характеризующие взаимодействия белок–белок и белок–микроРНК.

Таким образом, в рамках разработанных математических моделей изучены основные механизмы функционирования системы p53–белок-ингибитор–микроРНК и пути ее регуляции при патологических состояниях. В результате численного исследования влияния на динамику системы p53–микроРНК воздействия ионизирующего облучения [11], противоракового препарата нутлин [12] или оксидативного стресса [40, 41] получены данные, демонстрирующие способность моделей описывать фундаментальный механизм «бимодального» переключения сценария нормального функционирования на сценарий гиперактивации p53 и микроРНК в условиях стресса. В рамках ряда принятых моделей и ряда лабораторных данных [11–13, 40–41] выполнен численный анализ механизма функционирования положительной обратной связи p53–микроРНК. Обнаружены два важных свойства этой системы (ключевого сегмента

сигнального пути p53): синергический (сверхаддитивный) эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53–микроРНК и аддитивный эффект гиперактивации p53 одновременно несколькими микроРНК (включая miR-34), превышающий эффект от активации каждого из этих микроРНК. Проведенные численные эксперименты указывают на то, что синергический эффект гиперактивации положительной обратной связи p53–микроРНК возникает именно в результате проявления функции p53-зависимых микроРНК как отрицательных регуляторов белков, являющихся ингибиторами p53. При этом, с одной стороны, синергический эффект гиперактивации проапоптозного пути p53 может обеспечивать в раковых клетках эффективное терапевтическое воздействие. С другой стороны, он может способствовать развитию дегенеративных заболеваний, связанных с массовым апоптозом клеток, вызванным оксидативным стрессом. В этом случае отмена синергического эффекта за счет существенного ослабления (или даже полной ликвидации) отрицательного воздействия микроРНК на белок-ингибитор может привести к снижению негативных повреждений. Значимость аддитивного эффекта гиперактивации p53 одновременно несколькими микроРНК, по-видимому, состоит в том, что он подтверждает перспективы использования сразу нескольких микроРНК а) для повышения точности микроРНК-диагностики онкологических и других дегенеративных заболеваний, б) для возможного усиления терапевтического воздействия при дегенеративных заболеваниях с целью предотвращения гибели здоровых или уничтожения раковых клеток.

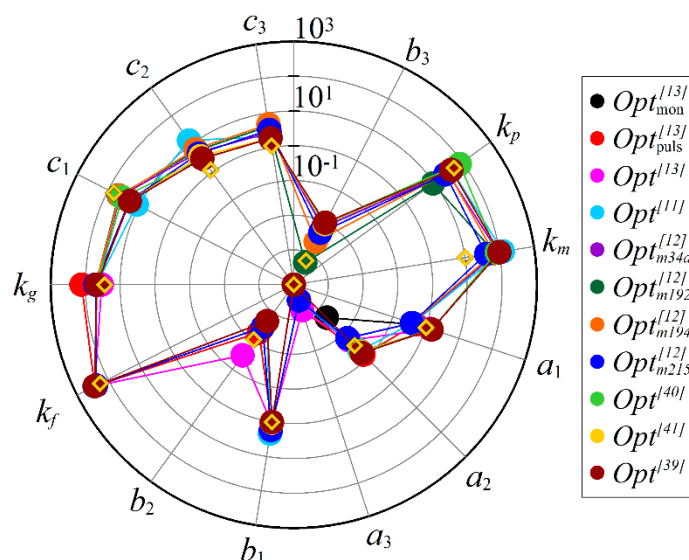


Рисунок 4.13. Круговая диаграмма, представляющая оптимальные наборы значений параметров математических моделей 4.1–4.4 и базовой модели (4.1)–(4.5), полученных при описании лабораторных экспериментов [11–13, 39–41] (круги). Ромбами показан набор базальных значений параметров базовой модели для системы общего p53–белок-ингибитор–микроРНК (модель 3.4).

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

Одной из основных задач современной биомедицины является разработка новых эффективных и общедоступных способов диагностики дегенеративных заболеваний. В настоящее время одним из наиболее важных достижений в области изучения клеточно-молекулярных механизмов патогенеза этих заболеваний стало выявление таких параметров состояния белковых систем, которые могут служить индикаторами (молекулярными биомаркерами) нормы и патологии. При этом вопрос о надежности такой диагностики остается крайне актуальным, особенно с учетом опасности заболеваний. Белок p53, который даже в клинической практике уже воспринят как биомаркер, способный указать на риск развития многих видов рака или нейродегенеративных заболеваний, из-за его внутриклеточной дислокации и нестабильности (в биологических жидкостях) сложен в использовании и дорогостоящ. Современные тенденции развития биомедицины таковы, что новыми более доступными для анализа биомаркерами тех же самых заболеваний могут стать p53-зависимые микроРНК. В связи с этим полезно проанализировать (в рамках принятого подхода к математическому моделированию), может ли и при каких условиях достигаться полное совпадение или серьезное различие результатов диагностики заболеваний, выполненной на основе анализа уровней p53 и микроРНК при малых «ошибках» в механизме функционирования микроРНК. Проблема актуальна, поскольку ошибки лабораторных измерений остаются достаточно высокими, а кроме того, в целом ряде лабораторных и клинических исследований отмечается возможность сбоя (дерегуляции) в функционировании микроРНК, которые способны не только повлиять на результат диагностики заболевания с помощью микроРНК, но даже изменить течение заболевания (см., например, [246–248]).

Ответ на поставленный вопрос основывается на применении разработанного в настоящей работе подхода к моделированию и оценке полученных данных с точки зрения статистики. Исследование проведено с привлечением полученных в главах 1, 3, 4 результатов описания экспериментальных данных, которое производилось с использованием разных математических моделей, построенных в рамках единого подхода к моделированию на основе предложенной базовой модели.

4.7.1. Количественная оценка границ характерных состояний *N*, *C* и *D* системы p53–микроРНК

Хорошо известно, что точность диагностики в немалой степени зависит от того, насколько достоверно очерчены границы изменения уровней биомаркеров в характерных биологических состояниях, т.е. в норме и при разного вида патологиях.

Исходя из представленных ранее (см., например, главы 1 и 3) результатов математического моделирования и лабораторных экспериментов полагаем, что сигнальный путь p53 характеризуется, по меньшей мере, тремя типичными состояниями системы p53–белок-ингибитор: *N*, *C*, *D*, которые проиллюстрированы для базовой модели в параграфе 3.2. Как и прежде, состояние *N* соответствует условно нормальному (относительно низкому) уровню p53 и белка-ингибитора; состояние *C* – низкому уровню p53 при высоком уровне белка-ингибитора, что часто наблюдается в клетках разных видов рака; состояние *D* – чрезмерно высокому уровню p53 при достаточно низком уровне белка-ингибитора (признак массовой гибели клеток через механизм p53-зависимого апоптоза, характерный для нейродегенеративных и ряда других заболеваний).

Количественное определение границ изменения характерных значений микроРНК (в качестве которых в данных расчетах рассматривались стационарные значения решений), соответствующих типичным состояниям *N*, *C* и *D*, затруднено рядом причин. Среди них основными являются дефицит и разномасштабность экспериментальных измерений и многообразие микроРНК, взаимодействующих с p53 по принципу положительной прямой или обратной связи (известно более 20 таких микроРНК).

Анализ лабораторных измерений [11, 12, 39–41] позволил в параграфах 4.2–4.6 соотнести полученные решения с наблюдаемыми медико-биологическими состояниями системы p53–ингибитор–микроРНК, при этом показано, что принятые модели способны описывать особенности кинетики различных p53-зависимых микроРНК: miR-16 [11], miR-34a [12, 40, 41], miR-192 [12], miR-194 [12], miR-215 [12]. На рисунке 4.14 эти данные приведены в обезразмеренном виде, но (для универсальности) без дополнительной нормировки, используемой в экспериментальных работах. Здесь маркеры одного цвета обозначают состояния системы p53–микроРНК, относящиеся к одному и тому же лабораторному эксперименту. При этом маркеры-квадраты соответствуют стационарному решению при оптимальном наборе параметров, описывающем условия экспериментов [11, 12, 39–41], маркеры-круги – решение, полученное с привлечением этих же данных, но при моделировании терапевтического воздействия [11, 39] или состояния биологической системы до воздействия [12, 40, 41], применяемого в эксперименте. В частности, в параграфе 4.2 проведено

сопоставление численных решений базовой модели с экспериментальными измерениями уровней p53, Wip1 и miR-16 в раковых клетках после воздействия ионизирующим облучением [11]. Получен набор оптимальных значений параметров принятой модели, при которых численные решения достаточно хорошо согласуются с лабораторными данными и соответствуют состоянию *C* (голубой маркер-квадрат на рисунке 4.14). На рисунке 4.14 маркером-кругом отмечено стационарное решение базовой модели, полученное в параграфе 4.2 в результате моделирования гипотетического терапевтического воздействия, направленного на активацию p53-зависимого апоптоза (состояние *D*). Отметим, что данное решение описывает состояние *D*: весьма высокий уровень p53 при достаточно низком уровне Wip1.

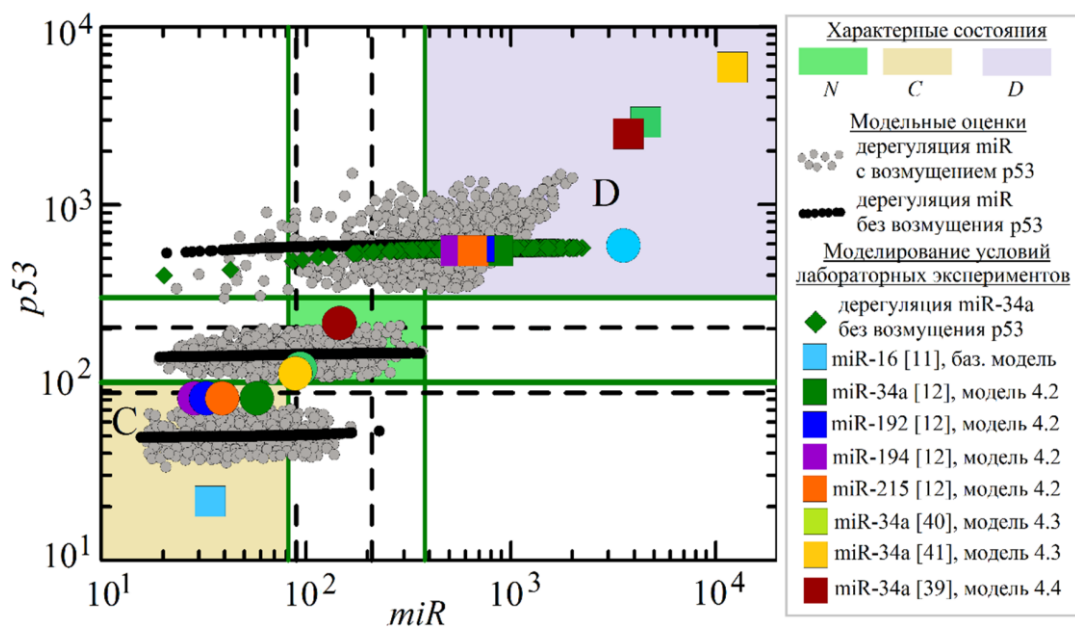


Рисунок 4.14. Фазовый портрет характерных значений численных решений: *квадраты* – моделирование условий лабораторных экспериментов; *круги* – моделирование терапевтических воздействий ([11, 39]), состояния до воздействия нутлином ([12]) и до оксидативного стресса ([40, 41]). Статистические выборки: *точки* – методические расчеты; *ромбы* – умеренная дерегуляция miR-34a в условиях [12]. Границы условной нормы для уровней p53 и различных микроРНК: *сплошные линии* – усредненная оценка, полученная при описании экспериментальных данных, *штриховые линии* – оценка, используемая в методических расчетах.

Кроме того, на рисунке 4.14 приведены стационарные решения модели 4.2 при наборе оптимальных значений параметров $Opt^{[12]}$, определенном в параграфе 4.3. Этот набор обеспечивает близость численного решения к экспериментальным данным динамики miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215 в клетках множественной миеломы при активации сигнального пути p53 за счет воздействия нутлина [12]. Экспериментальные данные [12] и численные решения при $Opt^{[12]}$, описывают весьма высокий уровень p53 и микроРНК, которые соответствуют состоянию *D*. Дополнительно на рисунке 4.14 маркерами-кругами отмечены стационарные

решения модели 4.2 при значениях параметров $Opt^{[12]}$ и $N(t) = 0$ (функция, описывающая изменение концентрации нутлина). Данные решения иллюстрируют состояние сигнального пути p53 в клетках множественной миеломы до рассматриваемого в [12] воздействия нутлина и характеризуются сниженным уровнем p53 и микроРНК (состояние C).

Результаты моделирования воздействия оксидативного стресса на систему p53–Sirt1–miR-34a в условиях, приближенных к условиям лабораторных экспериментов [39–41], отмечены на рисунке 4.14 маркерами-квадратами светло-зеленого цвета (решение модели 4.3 при $Opt^{[40]}$), желтого цвета (решение модели 4.3 при $Opt^{[41]}$) и коричневого цвета (решение модели 4.4 при $Opt^{[39]}$). При этом данные численные решения описывают активацию p53 и микроРНК, что соответствует состоянию D . Маркерами-кругами на рисунке 4.14 обозначены стационарные решения модели 4.3, полученные при моделировании состояния системы p53–miR-34a до воздействия оксидативного стресса в клетках бронхов человека [40] и в клетках печени крыс [41], и соответствующие состоянию близкому к условной норме N . Кроме того, там же приведено решение модели 4.4 (коричневый маркер-круг на рисунке 4.14), иллюстрирующее гипотетическое терапевтическое воздействие, направленное на ослабление отрицательного воздействия микроРНК на Sirt1. При этом в рамках модели 4.4 значения уровня p53 и p53-зависимого микроРНК снижаются и соответствуют состоянию N .

Анализ этих данных показывает достаточную согласованность результатов моделирования, что позволяет приближенно установить границы состояния условной нормы N : [100; 300] для p53 и [81.9; 380.8] для микроРНК. На рисунке 4.14. зеленым цветом выделена область, очерченная приведенными границами, в которой значения уровней p53 и микроРНК одновременно соответствуют состоянию условной нормы N . Области значений уровней p53 и микроРНК, описывающих характерные состояния C и D , выделены желтым и сиреневым цветом соответственно. Следует отметить достаточно хорошую согласованность данных для miR-34a, полученных в результате моделирования разных условий функционирования системы p53–микроРНК.

Дополнительно для уточнения границ характерных состояний N , C и D на рисунке 4.14 приведены оценки (штриховые линии), полученные в главе 1 в результате анализа расчетов базовой модели для системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК в согласии с экспериментальными данными. Такая оценка количественного представления границ ниже подтверждена статистическим анализом доверительных интервалов достаточно представительной выборки, характеризующей слабые изменения фазовых переменных в окрестности состояния условной нормы. Отметим, что в данной серии численных экспериментов не моделировалось какое-либо конкретное семейство микроРНК с положительной обратной связью с p53, однако в силу выбора базальных значений параметров

(которые были определены для описания нормы на основе экспериментальных данных для miR-34a) и результатов проведенных сопоставлений численных решений с лабораторными измерениями miR-34, полученные здесь оценки ориентированы на семейство miR-34.

Для оценки статистической значимости определенных условных границ состояния N выполнен статистический анализ стационарных решений базовой модели, полученных при одновременном случайном отклонении значений параметров в 15-процентном интервале относительно базальных значений. В результате проведенного анализа получено, что принятые границы состояния нормы для p53 и микроРНК соответствуют примерно 95-процентному доверительному интервалу логнормальных теоретических распределений плотностей вероятностей с параметрами $\mu \approx 5$ и $\sigma \approx 0.194 \div 0.217$. Для выборки из значений p53 медианное значение $Med_{3200} = 147.008$, интерквартильный размах – [128.97, 167.57], 95-процентный доверительный интервал [94.7, 216.75]; для выборки из значений микроРНК медианное значение – $Med_{3200} = 151.765$, интерквартильный размах – [131.067, 175.73], 95-процентный доверительный интервал определяется значениями [96.25, 234.41]; принятая в данном разделе на основе эмпирических соображений оценка границ нормы – [87.27, 203.63] для p53 и [89.64, 209.16] для микроРНК.

Определенные границы характерных состояний N , C и D (штриховые линии на рисунке 4.14) согласуются не только с оценками [32], но и с оценками, полученными при численном анализе условий лабораторных экспериментов [11] (состояния C и D), [12] (состояния C и D), [39–41] (состояния N и D). Полученные оценки границ для условной нормы miR-192, miR-194, miR-215 весьма близки к границам для miR-34a и границам, определенным на основе [48].

4.7.2. О диагностических свойствах микроРНК при нормальном функционировании системы p53–микроРНК

В этом параграфе резюмируем полученные ранее данные о нормальной реакции p53-зависимых микроРНК на стрессовое воздействие. Главный вывод численных экспериментов, представленных в параграфах 1.4 и 3.2–3.3 для моделей функционирования системы p53–микроРНК с положительной прямой или обратной связью состоит в том, что при нормальном функционировании (соответствующем базальным значениям параметров, входящих в уравнение динамики микроРНК) поведение микроРНК аналогично p53. Как показывают расчеты, уровни микроРНК уменьшаются относительно нормального состояния при снижении уровня p53 и, наоборот, резко возрастают в случае чрезмерного роста p53. Эти результаты соответствуют общепринятым представлениям и, в частности, согласуются с лабораторными исследованиями (см., например, [48, 204]), которые указывают на снижение в раковых клетках

не только уровня p53, но и miR-34 [204], и активацию miR-34 пропорциональную активации p53 дикого типа [48].

Кроме того, в параграфе 1.4 для численных решений более простой модели динамики сети p53–белок-ингибитор–микроРНК (для класса микроРНК с прямой положительной связью с p53) показано согласие с экспериментальными данными изменения уровней микроРНК miR-34 и miR-145 в характерных состояниях *C* и *D* и при p53-зависимой активации. Отметим, что по результатам биологических исследований для miR-34 и miR-145 с некоторой степенью достоверности может быть принята положительная обратная связь с p53 за счет отрицательного воздействия микроРНК на белок-ингибитор p53. В рамках базовой модели получены весьма близкие результаты, указывающие на способность различных p53-зависимых микроРНК активироваться в ответ на активацию p53.

Полученные в расчетах результаты о положительной корреляции уровня микроРНК и уровня p53 при нормальном функционировании микроРНК в лабораторной и клинической практике обычно указывают на то, что микроРНК могут быть использованы вместо p53 в качестве диагностического биомаркера дегенеративных заболеваний. Вновь отметим, что это важно, поскольку микроРНК, как известно, более стабильны, чем p53, в биологических жидкостях, и методы их измерения проще и менее дорогостоящи.

4.7.3. Математическое моделирование нарушения функционирования системы p53–микроРНК

Как уже упоминалось выше, ряд биомедицинских исследований указывают на возможность дерегуляции микроРНК, то есть отклонения уровня микроРНК от нормы, в том числе из-за незначительных нарушений функционирования микроРНК, которые можно расценивать как случайные. В настоящих численных экспериментах предполагалось, что p53 и его ингибитор функционируют нормально, а дерегуляция микроРНК обусловлена только сбоями в функционировании микроРНК. В рамках принятых математических моделей это означает, что значения всех параметров уравнений динамики p53 и его белка-ингибитора будут соответствовать принятым для описания характерных состояний *N*, *C*, *D*, а для моделирования дерегуляции микроРНК в значения параметров c_1 , c_2 , c_3 и k_p будут вноситься случайные возмущения (параметры c_1 , c_2 , c_3 – константы скорости собственной генерации, p53-зависимой генерации и деградации микроРНК соответственно, а k_p отвечает за регуляцию уровня взаимосвязи p53 и микроРНК). Отметим, что в численных экспериментах рассматривалась достаточно слабая и умеренная дерегуляция микроРНК, которые, согласно проведенным оценкам, не приводят к значимому изменению состояний p53 и белка-ингибитора. Поэтому при

проведении расчетов проводилась строгая проверка выполнения условия о том, что во всех сценариях дерегуляции изменение параметров модели не должно приводить к выходу значений уровня p53 за границы рассматриваемого характерного состояния, предшествующего дерегуляции.

Анализировались два сценария дерегуляции – весьма слабая дерегуляция и (для сравнения) более выраженная, но все же умеренная дерегуляция. Перед реализацией первого сценария в численных экспериментах устанавливались допустимые интервалы малых возмущений каждого параметра, к которым решение оказывалось слабочувствительным. Исходя из этих оценок, слабая дерегуляция моделировалась посредством одновременного изменения всех параметров в данных интервалах. Умеренная дерегуляция имитировалась поочередным или одновременным отклонением параметров от базального значения в различных достаточно широких диапазонах значений. В частности, рассматривалось изменение параметров c_1 , c_2 , c_3 и k_p в интервалах от c_i^0/q до qc_i^0 ($i = 1, 2, 3$) и k_p^0/q до qk_p^0 , где q изменялось от 2 до 10, c_i^0 и k_p^0 – базальные значения (3.21).

Как и в значительной части биомедицинских исследований, будем полагать, что p53 является надежным биомаркером дегенеративных заболеваний, т.е., в терминологии настоящей работы, анализ уровня p53 верно определяет состояния условной нормы N , риска рака C и риска массовой гибели клеток D . Поэтому при анализе диагностической надежности микроРНК опираемся на показания уровня p53: если уровень микроРНК соответствует тому же характерному состоянию, что и p53, тогда считаем, что диагностика на основе микроРНК верна, иначе – диагностика, полученная в результате анализа уровня микроРНК, «ошибочна».

Для каждого варианта численного эксперимента проводилось не менее 800 равноценных запусков решения прямой задачи при случайном изменении значений параметров, описывающих динамику микроРНК в рамках выбранного сценария дерегуляции. В рассматриваемом интервале изменения значений параметров решения принятых математических моделей выходят на стационарные значения, из которых и формировались выборки для оценки уровней p53 и микроРНК. Для статистического анализа полученных выборок проводился анализ близких к полученной выборке теоретических распределений (в качестве критерия согласия использовался критерий Колмогорова). В методических целях полученные данные сопоставлялись с результатами непосредственного подсчета попаданий значений уровней p53 и микроРНК в соответствующие границы, и было получено хорошее согласие. Для проведения статистического анализа использовались инструменты MATLAB (описание и примеры статистических функций MATLAB приведены в [191]).

4.7.4. Численный анализ диагностической надежности микроРНК при нарушении функционирования системы p53–микроРНК

На первом этапе проведена оценка возможности замены анализа на основе p53 на анализ микроРНК при дерегуляции конкретных микроРНК в условиях, приближенных к условиям лабораторных измерений [12]. Представленные в параграфе 4.3 результаты моделирования динамики miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215 при активации p53 за счет воздействия нутлина (решения при оптимальных значениях параметров, отмечены маркерами-квадратами на рисунке 4.14) использовались в дальнейшем при моделировании поочередной умеренной дерегуляции одного из четырех рассматриваемых микроРНК. Статистический анализ (размер выборки для каждого микроРНК – 1200) указывает на то, что вероятность «ошибки» в результатах диагностического исследования, основанного на miR-34a, составляет 0.2, miR-192 – 0.3, miR-194 – 0.58, miR-215 – 0.3. Для наглядности для одного из рассматриваемого микроРНК, а именно для miR-34a, на рисунке 4.14 приведены данные, полученные в ходе моделирования умеренной дерегуляции (зеленые маркеры-ромбы). Кроме того, получено, что в случае слабой дерегуляции miR-34a вероятность диагностической «ошибки» (в смысле различия результатов анализа на основе p53 и микроРНК) близка к 0.06, что полностью согласуется с оценками, полученными на основе модельных представлений.

В параграфе 4.2 получен набор оптимальных значений параметров, при которых численные решения базовой модели (маркер-квадрат голубого цвета на рисунке 4.14) достаточно хорошо согласуются с лабораторными измерениями уровней p53, Wip1 и miR-16 в клетках остеосаркомы человека после воздействия ионизирующим облучением [11]. В рамках базовой модели анализ (выборка из 1200 элементов) диагностических свойств miR-16 показал следующее: вероятность «ошибочной» диагностики близка к 0.08 при слабой дерегуляции miR-16 и к 0.084 в случае умеренной дерегуляции. Отметим, что в данных численных экспериментах уровень p53 практически не изменялся при дерегуляции микроРНК и оставался на достаточно низком уровне. Статистический анализ данных, полученных при моделировании дерегуляции miR-16 с применением модели 4.1, продемонстрировал близкие результаты.

Для получения более полной картины проводилась еще одна серия численных экспериментов, целью которых было рассмотреть вопрос о сравнении диагностических свойств микроРНК с p53-диагностикой при дерегуляции микроРНК с использованием базовой модели функционирования системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК. При этом дерегуляция микроРНК моделировалась за счет случайного отклонения значений параметров уравнения (4.3) вблизи базальных значений (3.21). В результате анализа выборок (каждая состоит из результатов 800 расчетов), сформированных при рассмотрении слабой дерегуляции,

получено, что рассчитанные плотности распределения вероятностей достаточно близки к гамма-распределению в состояниях N и C и нормальному распределению в состоянии D соответственно. Статистический анализ полученных выборок показывает, что для состояния N вероятность «ошибочной» диагностики, основанной на измерении микроРНК, составляет 0.57, для состояния C – 0.08, для состояния D – 0.09. При этом с высокой долей вероятности у условно здорового пациента (с нормальными показателями уровня p53) будет обнаружено противоречие в результатах диагностики, основанной на анализе p53, с анализом по уровню микроРНК. С другой стороны, у пациентов с высоким риском развития патологий, связанных с p53-зависимым апоптозом (состояния C и D), результаты диагностики, полученные на основе измерения p53 и микроРНК, практически совпадают. Увеличение объема выборок до 1600 практически не повлияло на статистику. Можно отметить, что, полученные результаты согласуются, в частности, с оценками для miR-424, miR-375 [249] и miR-125 [250] при использовании их в качестве потенциальных биомаркеров рака шейки матки.

Проведен анализ данных, полученных при имитации нескольких вариантов умеренной дерегуляции, в рамках которых рассматривались различные интервалы случайного изменения одного или всех одновременно параметров c_1 , c_2 , c_3 , k_p , описывающих динамику уровня микроРНК. Объем каждой исследуемой выборки равен 1200. Статистический анализ свидетельствует о том, что для условно здорового пациента вероятность «ошибочной» диагностики (по сравнению с p53-диагностикой), полученной на основе микроРНК, может составлять $0.4 \div 0.65$. В состояниях C и D вероятность того, что исследование уровня микроРНК в результате приведет к расхождению в результатах диагностики, достигает $0.22 \div 0.5$ в случае риска развития рака и $0.15 \div 0.5$ в случае патологических состояний, связанных с массовой p53-зависимой гибелью клеток.

Дополнительно исследован вопрос о влиянии относительно слабых возмущений p53 на полученные оценки согласованности анализа на основе микроРНК с p53-диагностикой. Проведена серия численных экспериментов для нескольких вариантов дерегуляции микроРНК, в рамках которой возмущение p53 моделировалось как случайное одновременное изменение значений параметров a_1 , a_2 , a_3 (не более чем на 15% для состояний N и D и на 25% – состояния C). Исследовалось влияние слабого возмущения p53, которое не изменяет результат диагностического анализа, основанного на p53, то есть после возмущения уровень p53 не выходит за границы рассматриваемого характерного состояния. Для каждого состояния и каждого варианта дерегуляции микроРНК анализировались выборки, сформированные из 1600 результатов расчетов.

Численный анализ полученных стационарных решений уровней микроРНК показал, что выборочные плотности вероятности в состояниях N и C достаточно близки к гамма-

распределению, в состоянии D – к нормальному распределению (для выборки без возмущения p53) и Вейбулловскому (для выборки при слабом возмущении p53). Как и в остальных расчетах этой серии численных экспериментов, в качестве критерия согласия использовался критерий Колмогорова. Зеленым, желтым и сиреневым цветом на рисунке 4.15 выделены условные области согласованной диагностики на основе микроРНК и p53 в характерных состояниях N , C и D соответственно. Можно видеть, что оценки вероятности «ошибочной» диагностики, основанной на микроРНК, при дополнительном малом возмущении p53 и без возмущения весьма близки, разница составляет не более 1.5–2%. На рисунке 4.15 приведены плотности распределения вероятностей для выборки, полученной при слабом возмущении p53 (данные выделены зеленым цветом) и без него (данные оранжевого цвета) в случае умеренной дерегуляции микроРНК и графики плотностей вероятностей теоретического распределения.

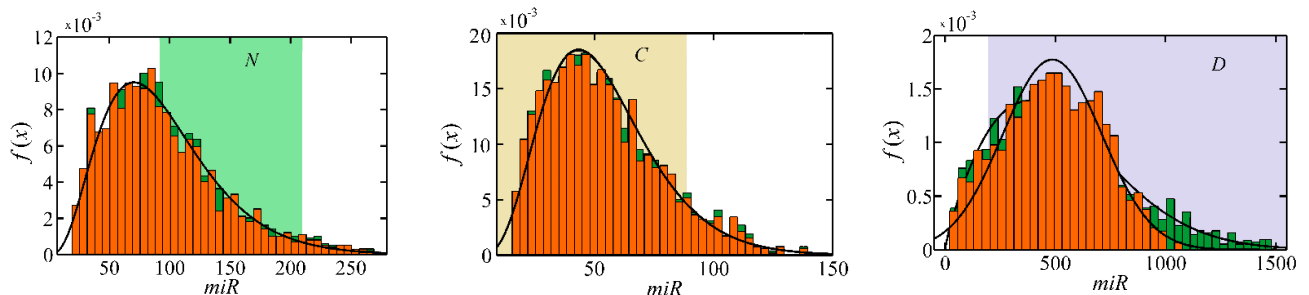


Рисунок 4.15. Плотность распределения вероятностей рассчитанных уровней микроРНК при возмущении p53 (зеленый цвет) и без возмущения (оранжевый цвет) в состояниях N , C и D . Цветными полосами помечены условные области согласованной диагностики на основе микроРНК и p53; сплошные черные линии – теоретические распределения.

Продемонстрированные выше результаты получены в рамках базовой модели при $b_3 = b_3^0$, что соответствует биологической системе p53–ингибитор–микроРНК для микроРНК с достаточно слабым отрицательным воздействием на белок-ингибитор. Поэтому дополнительно проведена оценка надежности диагностического потенциала микроРНК (в смысле согласия с результатами анализа p53) с более выраженной регуляторной функцией (при $b_3 = 10b_3^0$). Статистический анализ результатов расчетов в случае умеренной дерегуляции таких микроРНК (объем выборок для каждого состояния составляет 1600 элементов) указывает на то, что у условно здоровых пациентов (состояние N) вероятность диагностической «ошибки», близка к 0.7, а у пациентов с низким (состояние C) и чрезвычайно высоким уровнем p53 (состояние D) – близка к 0.4 и 0.47 соответственно. Таким образом, численный анализ показал, что при дерегуляции микроРНК с более выраженными регуляторными функциями вероятность рассогласования показаний на основе p53 и микроРНК остается весьма значимой.

Для общей оценки результатов методических исследований выполнен статистический анализ данных, полученных во всех проведенных расчетах при моделировании дерегуляции микроРНК. Анализ показал, что в случае условной нормы (при нормальном уровне p53) вероятность «ошибки» в диагностике, полученной на основе микроРНК, близка к 0.6 (размер выборки – 28000), при сверхвысоких (размер выборки – 26000) и сниженных уровнях p53 (размер выборки – 32000) – близка к 0.35 и 0.5 соответственно.

В настоящее время для клинических и лабораторных исследований является актуальной задача оценки надежности диагностики дегенеративных заболеваний на основе анализа микроРНК (см., например, [248–250]). В частности, подобные исследования производятся на образцах тканей с признаками различных онкологических новообразований, для которых сравниваются результаты цитологического, гистологического анализов и анализа по профилю микроРНК. Хотя направленность такого анализа, как правило, существенно отличается 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. Примеры исследования нового подхода диагностики рака шейки матки на основе анализа микроРНК в клинических условиях приведены, в частности, в работах [249, 250]. Авторы [249, 250] указывают на то, что точность обнаружения рака на основе оценки уровня отдельных микроРНК может достигать более 75%, а для повышения надежности такого метода диагностики, по-видимому, следует проводить анализ широкого спектра микроРНК. С учетом этих и многих других подобных оценок можно сделать заключение о достаточной реалистичности выводов, сделанных по результатам моделирования в настоящей работе.

Таким образом, результаты проведенного анализа свидетельствуют об адекватности минимальных математических моделей функционирования сигнального пути p53 как одного из возможных инструментов для исследования диагностического потенциала p53-зависимых микроРНК. Очевидно, что степень надежности микроРНК как диагностического маркера дегенеративных заболеваний в сравнении с p53-диагностикой зависит от уровня дерегуляции. Так, интересно отметить, что в случае достаточно слабой дерегуляции весьма высока вероятность рассогласования показаний, полученных на основе p53 и микроРНК, у условно здоровых пациентов (с нормальным уровнем p53), а у пациентов с патологически низким или высоким уровнем p53 рассогласование пренебрежимо мало. В случае повышения уровня дерегуляции микроРНК (при этом не изменяющем существенным образом динамику p53), как и ожидалось, значительно увеличивается вероятность рассогласования в диагностике на основе p53 и микроРНК во всех характерных состояниях. Проведенная в рамках принятого подхода к моделированию динамики сигнального пути p53 и анализу дерегуляции оценка диагностических свойств ряда конкретных микроРНК в условиях, приближенным к условиям

лабораторных измерений (при раке, ХОБЛ, фиброзе печени и синдроме Дауна), подтвердила эти выводы.

Результаты главы 4

1. С применением базовой модели функционирования системы общего вида p53–белок-ингибитор–микроРНК разработана иерархия новых математических моделей для описания достаточно широкого круга лабораторных экспериментов, исследующих динамику уровней p53, его белков-ингибиторов (Mdm2, Wip1 или Sirt1), одного или нескольких семейств p53-зависимых микроРНК (miR-16, miR-34a, miR-192, miR-194, miR-215, для которых *in vitro* установлена положительная обратная связь с p53). Разработана модификация базовой модели и в численных экспериментах показана адекватность принятого подхода к моделированию динамики p53-зависимых микроРНК, при котором вклад мРНК белка-ингибитора учитывается опосредовано, в предположении пропорциональности уровней мРНК и одноименного белка.
2. С применением разработанных численных моделей и широкого круга экспериментальных данных изучены базовые механизмы и выявлены системные свойства, характеризующие функционирование конкретных сегментов сигнального пути p53 в раковых клетках остеосаркомы и множественной миеломы, в эпителиальных клетках дыхательных путей при ХОБЛ, при фиброзе печени у крыс и в клетках мозга трансгенных мышей с синдромом Дауна:
 - продемонстрирован механизм «бимодального» переключения, определяющий ответную реакцию пути p53 на стрессовое воздействие;
 - показано, что, как и в экспериментах [11], в рамках принятой модели механизм функционирования p53–Wip1–miR-16 включает в себя неявную положительную обратную связь p53–Wip1, действующую только в определенных интервалах изменения параметров;
 - обнаружен синергический эффект гиперактивации петли положительной обратной связи p53–микроРНК под влиянием микроРНК, проявляющийся в двух случаях – при принудительной активации p53 в раковых клетках в терапевтических целях и при патологической сверхактивации p53, влияющей на развитие дегенеративных заболеваний, связанных с массовой гибелью нормальных клеток;
 - продемонстрирован аддитивный эффект гиперактивации p53 несколькими микроРНК (включая miR-34a), превышающий эффект от активации каждого из этих микроРНК.

Результаты расчетов нашли подтверждение в экспериментальных исследованиях [238], где miR-34a и miR-200c (ингибиторы белка Sirt1) действуют как аддитивные подавители опухолевого процесса, стимулируя апоптоз раковых клеток *in vitro*.

3. В рамках принятого подхода к моделированию на основе анализа экспериментальных и расчетных данных даны реалистичные оценки вероятности рассогласования в диагностике дегенеративных заболеваний на основе p53 и p53-зависимых микроРНК (с положительной прямой или обратной связью с p53).

Основные результаты диссертации

1. Разработаны, реализованы в виде комплекса программ и применены к решению широкого круга задач эффективные численные алгоритмы, ориентированные на решение прямых и/или обратных коэффициентных задач для нелинейных систем функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием и систем ОДУ высокой размерности, возникающих при математическом моделировании биокинетических процессов и гипотетических генных сетей.
2. Разработана новая минимальная базовая математическая модель функционирования биологической системы общего вида р53–белок-ингибитор–микроРНК (отрицательная обратная связь р53–белок-ингибитор и положительная обратная связь р53–микроРНК, реализующаяся через воздействие микроРНК на белок-ингибитор), основанная на известной биокинетической модели типа Гольдбетера–Кошланда и функционально-дифференциальных уравнениях с запаздывающими аргументами.
3. Для упрощенного варианта биологической системы и ряда ее моделей, основанных на использовании функционально-дифференциальных уравнений с запаздыванием, численно показана связь с моделями в виде системы ОДУ высокой размерности, которые описывают функционирование системы как многостадийный процесс передачи биохимических сигналов. Получено согласие с результатами известных теоретических исследований. Уточнена известная вычислительная схема анализа предельного перехода от системы ОДУ высокой размерности к уравнению с запаздыванием.
4. Разработана иерархия математических моделей и выполнено численное моделирование функционирования ряда наиболее важных сегментов проапоптозного сигнального пути р53 с характерным типом связей – отрицательной обратной связью р53–белок-ингибитор и положительной обратной связью р53–микроРНК, реализующейся через воздействие микроРНК на белок-ингибитор – при дегенеративных заболеваниях, стрессовых воздействиях облучением и химиопрепаратами.
5. С привлечением разработанной иерархии математических моделей и широкого круга экспериментальных данных изучены общие закономерности функционирования систем вида р53–белок-ингибитор–микроРНК, определяющие особую роль и значение р53-зависимых микроРНК как диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней при дегенеративных заболеваниях. С привлечением результатов этих исследований даны реалистичные оценки надежности микроРНК-диагностики нормы и дегенеративных заболеваний.

Основные публикации по теме работы

Публикации в периодических изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Воропаева, О. Ф. Численный анализ перехода от уравнения с запаздыванием к системе ОДУ в математической модели сети онкомаркеров / О. Ф. Воропаева, А. О. Козлова, С. Д. Сенотрусова // Вычислительные технологии. – 2016. – Т. 21. – № 2. – С. 12–25.
2. Воропаева, О. Ф. Дерегуляция p53-зависимых микроРНК: результаты математического моделирования / О. Ф. Воропаева, С. Д. Сенотрусова, Ю. И. Шокин // Математическая биология и биоинформатика. – 2017. – Т. 12. – № 1. – С. 151–175.
3. Воропаева, О. Ф. Переход от уравнения с запаздыванием к системе обыкновенных дифференциальных уравнений в модели сети онкомаркеров / О. Ф. Воропаева, С. Д. Сенотрусова // Математическое моделирование. – 2017. – Т. 29. – № 9. – С. 135–154.
4. Voropaeva, O. F. Numerical investigation of diagnostic properties of p53-dependent microRNAs / O. F. Voropaeva, S. D. Senotrusova, Y. I. Shokin // RJNAMM. – 2017. – Vol. 32. – No. 3. – P. 203-213.
5. Сенотрусова, С. Д. Математическое моделирование функционирования положительной связи в системе онкомаркеров p53–микроРНК / С. Д. Сенотрусова, О. Ф. Воропаева // СибЖВМ. – 2019. – Т. 22. – № 3. – С. 325–344.
Senotrusova, S. D. Mathematical modeling of a positive connection in the p53–microRNA tumor marker system / S. D. Senotrusova, O. F. Voropaeva // Numerical Analysis and Applications. – 2019. – Vol. 12. – No. 3. – P. 270–283.
6. Воропаева, О. Ф. Гиперактивация сигнального пути p53–микроРНК: математическое моделирование вариантов противоопухолевой терапии / О. Ф. Воропаева, П. Д. Лисачев, С. Д. Сенотрусова, Ю. И. Шокин // Математическая биология и биоинформатика. – 2019. – Т. 14. – № 1. – С. 355–372.
7. Воропаева, О. Ф. Применение минимальных математических моделей динамики сигнального пути белка p53–микроРНК к анализу лабораторных данных / О. Ф. Воропаева, С. Д. Сенотрусова, Ю. И. Шокин // Вычислительные технологии. – 2020. – Т. 25. – № 6. – С. 4–49.

Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ:

8. Сенотрусова, С. Д. Программа для расчета динамики онкомаркеров p53 и Mdm2 и оценки реакции p53-зависимых микроРНК на стрессовые воздействия / С. Д. Сенотрусова,

О. Ф. Воропаева. – Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2018612326 от 15.02.2018 г.

Публикации в трудах международных и всероссийских конференций:

9. Воропаева, О. Ф. Численное моделирование функционирования сети онкомаркеров / О. Ф. Воропаева, С. Д. Сенотрусова // Труды международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики». – Воронеж, 2015. – С. 150–152.
10. Сенотрусова, С. Д. Численное моделирование динамики сети онкомаркеров p53-микроРНК / С. Д. Сенотрусова // Труды международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики». – Воронеж, 2016. – С. 278–281.
11. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование функционирования сети онкомаркеров / О. Ф. Воропаева, Ю. И. Шокин, С. Д. Сенотрусова // Труды VI Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». – Пущино, 2016. – С. 102–103.
12. Воропаева, О. Ф. Численное моделирование функционирования сети онкомаркеров / О. Ф. Воропаева, Ю. И. Шокин, С. Д. Сенотрусова // Труды международной научно-технической конференции «Информационные технологии и математическое моделирование систем». – Одинцово, 2016. – С. 17–19.
13. Воропаева, О. Ф. Численный анализ диагностических свойств p53-зависимых микроРНК / О. Ф. Воропаева, С. Д. Сенотрусова // Труды международной конференции «Марчуковские научные чтения–2017». – Новосибирск, 2017. – С. 795–802.
14. Воропаева, О. Ф. Численные модели динамики p53-зависимых микроРНК / О. Ф. Воропаева, С. Д. Сенотрусова // Труды XVI Всероссийской конференции «Распределенные информационно-вычислительные ресурсы. Наука – цифровой экономике». – Новосибирск, 2017. – С. 246–252.
15. Voropaeva, O. F. Mathematical modeling of degenerative diseases / O. F. Voropaeva, T. V. Bayadilov, S. V. Leontiev, S. D. Senotrusova, Ch. A. Tsgoev, Yu. I. Shokin // 19th International Conference on the Methods of Aerophysical Research (ICMAR 2018) / AIP Conference Proceedings. – Novosibirsk, 2018. – Vol. 2027. – P. 030075-1–030075-6.
16. Senchukova, S. R. Mathematical models of p53–microRNA and their applications / S. R. Senchukova, T. V. Bayadilov, K. S. Gavrilova, N. D. Ivanov, S. V. Leontiev, S. D. Senotrusova, Ch. A. Tsgoev, O. F. Voropaeva // 27th EADV Congress. – Paris, 2018. – P2157.

17. Воропаева, О. Ф. Минимальные математические модели функционирования белковой сети p53-mdm2-wip1-p21 / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Труды международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики». – Воронеж, 2018. – С. 672–679.
18. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование функционирования системы биомаркеров дегенеративных заболеваний / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Труды международной конференции «Марчуковские научные чтения–2019». – Новосибирск, 2019. – С. 86–91.
19. Сенотрусова, С. Д. Влияние дерегуляции p53-зависимых микроРНК на диагностику дегенеративных заболеваний: результаты математического моделирования / С. Д. Сенотрусова // Труды международной научной конференции «Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики». – Воронеж, 2019. – С. 1069–1073.
20. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование динамики сети биомаркеров дегенеративных заболеваний / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Труды XVII Международной конференции «Распределенные информационно-вычислительные ресурсы: Цифровые двойники и большие данные. (DICR 2019)». – Новосибирск, 2019. – С. 185–190.
21. Сенотрусова, С. Д. Численный анализ терапевтического потенциала p53-зависимых микроРНК на основе лабораторных данных и минимальных математических моделей / С. Д. Сенотрусова, О. Ф. Воропаева // Труды VIII Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». – Пущино, 2020. – Статья № е20. 6 стр.
22. Voropaeva, O. F. Mathematical modeling of the mechanisms of Socially significant diseases / O. F. Voropaeva, T. V. Bayadilov, S. D. Senotrusova, Ch. A. Tsgoev // Abstracts International Conference Dedicated To The 1150th Anniversary Of The Great Philosopher And Mathematician Al-Farabi «Computational And Information Technologies In Science, Engineering And Education (SITECH-2020)». – Алматы, 2020. – P. 23.
23. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование противораковых терапевтических воздействий / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Сб. трудов Международной конференции «Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики». – Воронеж, 2021. – С. 789–796.

Публикации в тезисах международных и всероссийских конференций:

24. Сенотрусова, С. Д. Численное моделирование функционирования сети онкомаркеров / С. Д. Сенотрусова // Материалы 54-й международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2016. – С. 187.
25. Сенотрусова, С. Д. Численное моделирование динамики сети онкомаркеров p53-микроРНК / С. Д. Сенотрусова // Материалы XVII Всероссийской конференции молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям. – Новосибирск, 2016. – С. 65–66.
26. Сенотрусова, С. Д. Численный анализ диагностических свойств онкомаркеров / С. Д. Сенотрусова // Материалы 55-й международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2017. – С. 171.
27. Сенотрусова, С. Д. Численный анализ диагностических свойств 53-зависимых микроРНК / С. Д. Сенотрусова, О. Ф. Воропаева // Тезисы международной конференции Марчуковские научные чтения – 2017. – Новосибирск, 2017. – С. 196–197.
28. Senotrusova, S. D. Numerical analysis of the diagnostic properties of tumor markers / S. D. Senotrusova, O. F. Voropaeva // Systems Biology and Bioinformatics: the Ninth International Young Scientists School SBB-2017. – Novosibirsk, 2017. – P. 61–62.
29. Сенотрусова, С. Д. Численные модели динамики p53-зависимых микроРНК / С. Д. Сенотрусова, О. Ф. Воропаева // Тезисы XVI Всероссийской конференции «Распределенные информационно-вычислительные ресурсы. Наука – цифровой экономике». – Новосибирск, 2017. – С. 24.
30. Сенотрусова, С. Д. Математические модели динамики p53-зависимых микроРНК / С. Д. Сенотрусова // Материалы 56-й Международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2018. – С. 141.
31. Voropaeva, O. F. Mathematical modeling of degenerative diseases / O. F. Voropaeva, T. V. Bayadilov, S. V. Leontiev, S. D. Senotrusova, Ch. A. Tsgoev, Yu. I. Shokin // International Conference on the Methods of Aerophysical Research (ICMAR 2018). Abstracts. Part I. – Novosibirsk, 2018. – P. 297–298.
32. Senotrusova, S. D. Mathematical models of p53-microRNA and their applications / S. D. Senotrusova, O. F. Voropaeva // Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology (MM-HPC-BBB-2018): The 3rd International Symposium (21–24 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia). – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. – P. 62.
33. Сенотрусова, С. Д. Численные модели динамики p53-зависимых микроРНК / С. Д. Сенотрусова, О. Ф. Воропаева // Материалы IV Международной научной

- конференции «Актуальные проблемы прикладной математики». – Нальчик – Эльбрус, 2018. – С. 226.
34. Сенотрусова, С. Д. Математические модели динамики p53-зависимых микроРНК / С. Д. Сенотрусова // Тезисы выступлений участников Второй Школы молодых ученых MolMod-2018. Компьютерное моделирование структуры и динамики биомолекул. – Новосибирск, 2018. – С. 47–48.
35. Сенотрусова, С. Д. Математические модели динамики p53-сети / С. Д. Сенотрусова // Тезисы XIX Всероссийской конференции молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям. – Новосибирск, 2018. – С. 42.
36. Воропаева, О. Ф. Численное моделирование функционирования системы биомаркеров дегенеративных заболеваний / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Тезисы международной конференции «Актуальные проблемы вычислительной и прикладной математики». – Новосибирск, 2019. – С. 150.
37. Сенотрусова, С. Д. Математическое моделирование функционирования p53-сети / С. Д. Сенотрусова // Тезисы XX Всероссийской конференции молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям. – Новосибирск, 2019. – С. 42–43.
38. Сенотрусова, С. Д. Минимальные математические модели функционирования системы p53–микроРНК / С. Д. Сенотрусова, О. Ф. Воропаева // Марчуковские научные чтения 2020: Тезисы Междунар. конф., посв. 95-летию со дня рождения акад. Г. И. Марчука. – Новосибирск, 2020. – С. 169.
39. Сенотрусова, С. Д. Применение минимальных математических моделей к анализу терапевтического потенциала p53-зависимых микроРНК на основе лабораторных данных / С. Д. Сенотрусова // Тезисы XXI Всероссийской конференции молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям. – Новосибирск, 2020. – С. 19.
40. Сенотрусова, С. Д. Применение минимальных математических моделей к исследованию механизмов функционирования системы биомаркеров дегенеративных заболеваний / С. Д. Сенотрусова // Тезисы XXII Всероссийской конференции молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям. – Новосибирск, 2021. – С. 29.

Список литературы

1. Непомнящих, Л. М. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: Морфологические основы и молекулярные механизмы / Л. М. Непомнящих, Е. Л. Лушникова, Д. Е. Семенов. – М.: Изд-во РАМН, 2003. – 255 с.
2. Biomarkers definitions working group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework // *Clinical Pharmacology Therapeutics*. – 2001. – Vol. 69. – No. 3. – P. 89–95.
3. Мирошниченко, И. И. Биомаркеры в современной медико-биологической практике / И. И. Мирошниченко, С. Н. Птицина // *Биомедицинская химия*. – 2009. – Т. 55. – № 4. – С. 425–440.
4. Алмазов, В. П. p53 – инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека / В. П. Алмазов, Д. В. Кочетков, П. М. Чумаков // *Молекулярная биология*. – 2007. – Т. 41. – № 6. – С. 947–963.
5. Vousden, K. H. Blinded by the light: The growing complexity of p53 / K. H. Vousden, C. Prives // *Cell*. – 2009. – Vol. 137. – Iss. 3. – P. 413–431.
6. Желтухин, А. О. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 / А. О. Желтухин, П. М. Чумаков // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 447–516.
7. Чумаков, П. М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П. М. Чумаков // *Успехи биологической химии*. – 2007. – Т. 47. – С. 3–52.
8. Muller, P. A. p53 mutations in cancer / P. A. Muller, K. H. Vousden // *Nature Cell Biology*. – 2013. – Vol. 15. – No. 1. – P. 2–8.
9. Ljungman, M. Transcription-guardian the genome by sensing DNA damage / M. Ljungman, D. P. Lane // *Nature Reviews*. – 2004. – Vol. 4. – P. 727–737.
10. Riley, T. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2008. – Vol. 9. – P. 402–412.
11. Zhang, X. Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway / X. Zhang, G. Wan, S. Mlotshwa, V. Vance, F. G. Berger, H. Chen, X. Lu // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – Iss. 18. – P. 7176–7186.
12. Pichiorri, F. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development / F. Pichiorri, S. S. Suh, A. Rocci, L. De Luca, C. Taccioli, R. Santhanam, W. Zhou, D. M. Jr Benson, C. Hofmainster, H. Alder et al. // *Cancer Cell*. – 2010. – Vol. 18. – P. 367–381.

13. Chen, X. DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control / X. Chen, J. Chen, S. Gan, H. Guan, Y. Zhou, Q. Ouyang, J. Shi // *BMC Biology*. – 2013. – Vol. 11. – Article No. 73.
14. Lane, D. P. p53, guardian of the genome / D. P. Lane // *Nature*. –1992. – Vol. 358. – P. 15–16.
15. Kohn, K. W. Molecular interaction map of p53 and Mdm2 logic elements, which control the Off-On switch of p53 in response to DNA damage / K. W. Kohn, Y. Pommier // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 331. – P. 816–827.
16. Lahav, G. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells / G. Lahav, N. Rosenfeld, A. Sigal, N. Geva-Zatorsky, A. J. Levine, M. B. Elowitz, U. Alon // *Nature Genetics*. – 2004. – Vol. 36. – No. 2. – P. 147–150.
17. Geva-Zatorsky, N. Oscillations and variability in the p53 system / N. Geva-Zatorsky, N. Rosenfeld, S. Itzkovitz, R. Milo, A. Sigal, E. Dekel, T. Yarnitzky, Y. Liron, P. Polak, G. Lahav et al. // *Molecular System Biology*. – 2006. – Vol. 2. – P. 1–13.
18. Ramalingam, S. Quantitative assessment of the p53- Mdm2 feedback loop using protein lysate microarrays / S. Ramalingam, P. Honkanen, L. Young, T. Shimura, J. Austin, P. S. Steeg, S. Nishizuka // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – Iss. 13. – P. 6247–6252.
19. Loewer, A. Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells / A. Loewer, E. Batchelor, G. Gaglia, G. Lahav // *Cell*. – 2010. – Vol. 142. – Iss. 1. – P. 89–100.
20. Harton, M. D. p53 pulse modulation differentially regulates target gene promoters to regulate cell fate decisions / M. D. Harton, W. S. Koh, A. D. Bunker, A. Singh, E. Batchelor // *Molecular System Biology*. – 2019. – Vol. 15. – Article No. e8685.
21. Alarcon-Vargas, D. p53-Mdm2-the affair that never ends / D. Alarcon-Vargas, Z. Ronai // *Carcinogenesis*. – 2002.– Vol. 23. – No. 4. – P. 541–547.
22. Culmsee, C. p53 in neuronal apoptosis / C. Culmsee, M. P. Mattson // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 331. –Iss. 3. – P. 761–777.
23. Fiorini, A. Lack of p53 affects the expression of several brain mitochondrial proteins: insights from proteomics into important pathways regulated by p53 / A. Fiorini, R. Sultana, E. Barone, G. Cenini, M. Perluigi, C. Mancuso, J. Cai, J. B. Klein, D. St. Clair, D. A. Butterfield // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – Iss. 11. – Article No. e49846.
24. Rufini, A. Senescence and aging: the critical roles of p53 / A. Rufini, P. Tucci, I. Celardo, G. Melino // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32. – P. 5129–5143.
25. Checler, F. p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers / F. Checler, C. Alves da Costa // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2014. –Vol. 142. – Iss. 1. – P. 99–113.
26. Harris, S. L. The p53 pathway: positive and negative feedback loops / S. L. Harris, A. J. Levine // *Oncogene*. – 2005. – Vol. 24. – P. 2899–2908.

27. Lu, X. Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53 / X. Lu // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Vol. 2. – No. 5. – Article No. a000984.
28. Liu, J. MicroRNA control of p53 / J. Liu, C. Zhang, Y. Zhao, Z. Feng // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2017. – Vol. 118. – Iss. 1. – P. 7–14.
29. Wu, X. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop / X. Wu, J. H. Bayle, D. Olson, A. J. Levine // *Genes and Development*. – 1993. – Vol. 7. – P. 1126–1132.
30. Leng, R. P. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation / R. P. Leng, Y. Lin, W. Ma, H. Wu, B. Lemmers, S. Chung, J. M. Parant, G. Lozano, R. Hakem, S. Benchimol // *Cell*. – 2003. – Vol. 112. – Iss. 6. – P. 779–791.
31. Dornan, D. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53 / D. Dornan, I. Wertz, H. Shimizu, D. Arnott, G. D. Frantz, P. Dowd, K. O'Rourke, H. Koeppen, V. M. Dixit // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – P. 86–92.
32. Batchelor, E. Recurrent initiation: A mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage / E. Batchelor, C. S. Mock, I. Bhan, A. Loewer, G. Lahav // *Molecular Cell*. – 2008. – Vol. 30. – No. 3. – P. 277–289.
33. van Leeuwen, I. Sirtuins and p53 / I. van Leeuwen, S. Lain // *Advances in Cancer Research*. – 2009. – Vol. 102. – P. 171–195.
34. Zhang, J. Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas / J. Zhang, S. J. Cho, L. Shu, W. Yan, T. Guerrero, M. Kent, K. Skorupski, H. Chen, X. Chen // *Genes and Development*. – 2011. – Vol. 25. – P. 1528–1543.
35. Cho, S. J. Ninjurin1, a target of p53, regulates p53 expression and p53-dependent cell survival, senescence, and radiation-induced mortality / S. J. Cho, A. Rossi, Y. S. Jung, W. Yan, G. Liu, J. Zhang, M. Zhang, X. Chen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – No. 23. – P. 9362–9367.
36. Лисачев, П. Д. Mdm2-зависимая регуляция экспрессии p53 при долговременной потенциации / П. Д. Лисачев, В. О. Пустыльняк, М. Б. Штарк // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 158. – № 9. – С. 317–319.
37. Aubrey, B. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? / B. Aubrey, G. Kelly, A. Janic, M. Herold, A. Strasser // *Cell Death Differ*. – 2018. – Vol. 25. – P. 104–113.
38. Banin, S. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage / S. Banin, L. Moyal, S.-Y. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, Y. Ziv // *Science*. – 1998. – Vol. 281. – P. 1674–1677.
39. Tramutola, A. Activation of p53 in down syndrome and in the Ts65Dn mouse brain is associated with a pro-apoptotic phenotype / A. Tramutola, G. Pupo, F. D. Domenico, E. Barone, A. Arena,

- C. Lanzillotta, D. Brokeart, C. Blarzino, E. Head, D. A. Butterfield et al. // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2016. – Vol. 52. – No. 1. – P. 359–371.
40. Baker, J. R. Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K α reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells / J. R. Baker, C. Vuppusetty, T. Colley, A. I. Papaioannou, P. Fenwick, L. Donnelly, K. Ito, P. J. Barnes // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – Article No. 35871.
41. Tian, X.-F. 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 / X.-F. Tian, F.-J. Ji, H.-L. Zang, H. Cao // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – Article No. e0158657.
42. He, L. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network / L. He, X. He, L. P. Lim, E. D. Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon et al. // *Nature*. – 2007. – Vol. 447. – P. 1130–1134.
43. Jansson, M. D. MicroRNA and cancer / M. D. Jansson, A. H. Lund // *Molecular oncology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 590–610.
44. Hermeking, H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumor suppression / H. Hermeking // *Nature reviews cancer*. – 2012. – Vol. 12. – No. 9. – P. 613–626.
45. Колесников, Н. Н. МикроРНК, эволюция и рак / Н. Н. Колесников, С. Е. Титов, Ю. А. Веряскина, Е. В. Карпинская, С. П. Шевченко, Л. Г. Ахмерова, М. К. Иванов, В. В. Козлов, Е. А. Елисафенко, Л. Ф. Гуляева и др. // *Цитология*. – 2013. – Т. 55. – № 3. – С. 159–164.
46. Tarasov, V. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest / V. Tarasov, P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister, H. Hermeking // *Cell Cycle*. – 2007. – Vol. 6. – No. 13. – P. 1586–1593.
47. Shin, S. MicroRNAs that respond to histone deacetylase inhibitor SAHA and p53 in HCT116 human colon carcinoma cells / S. Shin, E.-M. Lee, H. J. Cha, S. Bae, J. H. Jung, S.-M. Lee, Y. Yoon, H. Lee, S. Kim, H. Kim et al. // *International Journal of Oncology*. – 2009. – Vol. 35. – Iss. 6. – P. 1343–1352.
48. Bisio, A. Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis / A. Bisio, V. Sanctis, V. Vescovo, M. Denti, A. Jegga, A. Inga, Ya. Ciribilli // *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – Article No. 552.
49. Ren, Z. J. Mir-509-5p joins the Mdm2/p53 feedback loop and regulates cancer cell growth / Z. J. Ren, X.-Y. Nong, Y.-R. Lv, H.-H. Sun, P.-P. An, F. Wang, X. Li, M. Liu, H. Tang // *Cell Death and Disease*. – 2014. – Vol. 5. – Article No. e1387.

50. Xie, C. MDM4 regulation by the let-7 miRNA family in the DNA damage response of glioma cells / C. Xie, W. Chen, M. Zhang, Q. Cai, W. Xu, X. Li, S. Jiang // *FEBS Letters*. – 2015. – Vol. 589. – P. 1958–1965.
51. Rahman, M. miR-15b/16-2 regulates factors that promote p53 phosphorylation and augments the DNA damage response following radiation in the lung / M. Rahman, F. Lovat, G. Romano, F. Calore, M. Acunzo, E. H. Bell, P. Nana-Sinkam // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – No. 38. – P. 26406–26416.
52. Issler, M. V. C. MicroRNA-16 feedback loop with p53 and Wip1 can regulate cell fate determination between apoptosis and senescence in DNA damage response / M. V. C. Issler, J. C. M. Mombach // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – Article No. e0185794.
53. Ugalde, A. P. Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53 / A. P. Ugalde, A. J. Ramsay, J. de la Rosa, I. Varela, G. Mariño, J. Cadiñanos, J. Lu, J. M. Freije, C. López-Otín // *The EMBO Journal*. – 2011. – Vol. 30. – Iss. 11. – P. 2219–2232.
54. Wang, B. A suppressive role of ionizing radiation-responsive miR- 29c in the development of liver carcinoma via targeting WIP1 / B. Wang, D. Li, C. Sidler, R. Rodriguez-Juarez, N. Singh, M. Heyns, Y. Ilnytsky, R. T. Bronson, O. Kovalchuk // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – No. 12. – P. 9937–9950
55. Bommer, G. T. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes / G. T. Bommer, I. Gerin, Y. Feng, A. J. Kaczorowski, R. Kuick, R. E. Love, Y. Zhai, T. J. Giordano, Z. S. Qin, B. B. Moore et al. // *Current Biology*. – 2007. – Vol. 17. – Iss. 15. – P. 1298–1307.
56. Yamakuchi, M. MiR-34, SIRT1, and p53: The feedback loop / M. Yamakuchi, C. J. Lowenstein // *Cell Cycle*. – 2009. – Vol. 8. – Iss. 5. – P. 712–715.
57. Neault, M. Molecular regulation of cellular senescence by microRNAs: implications in cancer and age-related diseases / M. Neault, F. Couteau, É. Bonneau, V. De Guire, F. A. Mallette // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 334. – P. 27–98.
58. Zhang, J. Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the Mdm2–p53 feedback loop / J. Zhang, Q. Sun, Z. Zhang, S. Ge, Z. G. Han, W. T. Chen // *Oncogene*. – 2013. – Vol. 32. – P. 61–69.
59. Fornari, F. p53/mdm2 feedback loop sustains miR-221 expression and dictates the response to anticancer treatments in hepatocellular carcinoma / F. Fornari, M. Milazzo, M. Galassi, E. Callegari, A. Veronese, H. Miyaaki, S. Sabbioni, V. Mantovani, E. Marasco, P. Chieco et al. // *Molecular Cancer Research*. – 2014. – Vol. 12. – Iss. 2. – P. 203–216.

60. Yu, J. A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells / J. Yu, V. Baron, D. Mercola, T. Mustelin, E. D. Adamson // *Cell Death and Differentiation*. – 2007. – Vol. 14. – P. 436–446.
61. Castro, R. E. 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 / R. E. Castro, D. M. S. Ferreira, M. B. Afonso, P. M. Borralho, M. V. Machado, H. Cortez-Pinto, C. M. Rodrigues // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – P. 119–125.
62. Kato, R. Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease / R. Kato, S. Mizuno, M. Kadowaki, K. Shiozaki, M. Akai, K. Nakagawa, T. Oikawa, M. Iguchi, K. Osanai, T. Ishizaki et al. // *Respiratory Research*. – 2016. – Vol. 17. – Article No. 139.
63. Гареев, И. Ф. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? / И. Ф. Гареев, О. А. Бейлерли // *Профилактическая медицина*. – 2018. – № 6. – С. 142–150.
64. Sun, T. Dynamics of P53 in response to DNA damage: Mathematical modeling and perspective / T. Sun, J. Cui // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 119. – Iss. 2. – P. 175–182.
65. Batchelor, E. Recent progress and open challenges in modeling p53 dynamics in single cells / E. Batchelor, A. Loewer // *Curr. Opin. Syst. Biol.* – 2017. – Vol. 3. – P. 54–59.
66. Kim, E. Mathematical modeling of p53 pathways / E. Kim, J.-Y. Kim, J.-Y. Lee // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – P. 1–12.
67. Zhao, C. Mechanistic computational models of microRNA-mediated signaling networks in human diseases / C. Zhao, Y. Zhang, A. S. Popel // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – P. 1–15.
68. Yang, N. Deciphering p53 dynamics and cell fate in DNA damage response using mathematical modeling / N. Yang, T. Sun, P. Shen // *Genome Instability and Disease*. – 2020. – Vol. 1. – P. 265–277.
69. Lev Bar-Or, R. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: A theoretical and experimental study / R. Lev Bar-Or, R. Maya, L. A. Segel, U. Alon, A. J. Levine, M. Oren // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97. – No. 21. – P. 11250–11255.
70. Mihalas, G. I. Possible oscillatory behaviour in p53-mdm2 interaction computer simulation / G. I. Mihalas, Z. Simon, G. Balea, E. Popa // *J. of Biological Systems*. – 2000. – Vol. 8. – No. 1. – P. 21–29.
71. Tiana, G. Time delay as a key to apoptosis induction in the p53 network / G. Tiana, M. H. Jensen, K. Sneppen // *Eur. Phys. J. B*. – 2002. – Vol. 29. – P. 135–140.

72. Monk, N. A. Oscillatory expression of Hes1, p53, and NFkappaB driven by transcriptional time delays / N. A. Monk // *Current Biology*. – 2003. – Vol. 13. – P. 1409–1413.
73. Horhat, R. F. Mathematical models and numerical simulations for the p53-Mdm2 network / R. F. Horhat, M. Neamtu, G. Mircea // *Applied Sciences*. – 2008. – Vol. 10. – P. 94–106.
74. Chickarmane, V. A model for p53 dynamics triggered by DNA damage / V. Chickarmane, A. Ray, H. M. Sauro, A. Nadim // *Society for Industrial and Applied Mathematics (SIAM) in SIAM Journal on Imaging Sciences*. – 2007. – Vol. 6. – No. 1. – P. 61–78.
75. Воропаева, О. Ф. Численное моделирование обратной связи p53-Mdm2 в биологическом процессе апоптоза / О. Ф. Воропаева, Ю. И. Шокин // *Вычислительные технологии*. – 2012. – Т. 17. – № 6. – С. 47–63.
76. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование функционирования и регуляции биологической системы p53-Mdm2 / О. Ф. Воропаева, Ю. И. Шокин, Л. М. Непомнящих, С. Р. Сенчукова. – М.: Изд-во РАМН, 2014. – 176 с.
77. Воропаева, О. Ф. Численное моделирование ультрадианных колебаний в биологической системе p53-Mdm2 в условиях стресса / О. Ф. Воропаева, С. Р. Сенчукова, К. В. Бродт, К. Е. Гарбузов, А. В. Мельниченко, А. А. Старикова // *Математическое моделирование*. – 2014. – Т. 26. – № 11. – С. 105–122.
78. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование функционирования системы белков p53-Mdm2 / О. Ф. Воропаева, Ю. И. Шокин, Л. М. Непомнящих, С. Р. Сенчукова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 157. – № 2. – С. 261–264.
79. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование регуляции биологической системы p53-Mdm2 / О. Ф. Воропаева, Ю. И. Шокин, Л. М. Непомнящих, С. Р. Сенчукова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 157. – № 4. – С. 539–542.
80. Tyson, J. J. Snifers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell / J. J. Tyson, K. C. Chen, B. Novak // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2003. – Vol. 15. – P. 221–231.
81. Tian, X. J. A two-step mechanism for cell fate decision by coordination of nuclear and mitochondrial p53 activities / X. J. Tian, F. Liu, X. P. Zhang, J. Li, W. Wang // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – Iss. 6. – Article No. e38164.
82. Wagner, J. p53-Mdm2 loop controlled by a balance of its feedback strength and effective dampening using ATM and delayed feedback / J. Wagner, L. Ma, J. J. Rice, W. Hu, A. J. Levine, G. A. Stolovitzky // *Systematic Biology (Stevenage)*. – 2005. – Vol. 152. – P. 109–118.
83. Ma, L. A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage / L. Ma, J. Wagner, J. J. Rice, W. Hu, A. J. Levine, G. A. Stolovitzky // *PNAS*. – 2005. – Vol. 102. – No. 40. – P. 14266–14271.

84. Golubyatnikov, V. P. Topological index of the p53-Mdm2 circuit / V. P. Golubyatnikov, E. Mjolsness, Yu. A. Gaidov // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 160–162.
85. Ciliberto, A. Steady states and oscillations in the p53-Mdm2 network / A. Ciliberto, B. Novak, J. J. Tyson // Cell Cycle. – 2005. – Vol. 4. – P. 107–112.
86. Proctor, C. J. Explaining oscillations and variability in the p53-Mdm2 system / C. J. Proctor, D. A. Gray // BMC Systems Biology. – 2008. – Vol. 2. – No. 75. – P. 35–55.
87. Puszynski, K. Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation / K. Puszynski, B. Hat, T. Lipniacki // Journal of Theoretical Biology. – 2008. – Vol. 254. – P. 452–465.
88. Sun, T. Modeling the basal dynamics of p53 system / T. Sun, W. Yang, J. Liu, P. Shen // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – Article No. e27882.
89. Zhang, X. P. Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response / X. P. Zhang, F. Liu, W. Wang // PNAS. – 2011. – Vol. 108. – P. 8990–8995.
90. Li, Z. Decision making of the p53 network: death by integration / Z. Li, M. Ni, J. Li, Y. Zhang, Q. Ouyang, C. Tang // J. Theor. Biol. – 2011. – Vol. 271. – P. 205–211.
91. Chong, K. H. Mathematical modelling of p53 basal dynamics and DNA damage response / K. H. Chong, S. Samarasinghe, D. Kulasiri // Mathematical Biosciences. – 2015. – Vol. 259. – P. 27–42.
92. Hamada, H. Sophisticated framework between cell cycle arrest and apoptosis induction based on p53 dynamics / H. Hamada, Y. Tashima, Y. Kisaka, K. Iwamoto, T. Hanai, Y. Eguchi, M. Okamoto // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – No. 3. – Article No. e4795.
93. Gordon, K. E. Spatio-temporal modelling of the p53–mdm2 oscillatory system / K. E. Gordon, I. M. M. van Leeuwen, S. La, M. A. J. Chaplain // Mathematical Modelling of Natural Phenomena. – 2009. – Vol. 4. – No. 3. – P. 97–116.
94. Elias, J. The dynamics of p53 in single cells: physiologically based ODE and reaction-diffusion PDE models / J. Elias, L. Dimitrio, J. Clairambault, R. Natalini // Phys. Biol. – 2014. – Vol. 11. – Article No. 045001.
95. Purvis, J. E. p53 dynamics control cell fate / J. E. Purvis, C. S. Mock, E. Batchelor, A. Loewer, G. Lahav // Science. – 2012. – Vol. 336. – No. 6087. – P. 1440–1444.
96. Sun, T. A plausible model for bimodal p53 switch in DNA damage response / T. Sun, J. Cui // FEBS Letters. – 2014. – Vol. 588. – P. 815–821.
97. Zhang, T. Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis / T. Zhang, P. Brazhnik, J. J. Tyson // Cell Cycle. – 2007. – Vol. 6. – No. 1. – P. 85–94.

98. Воропаева, О. Ф. Минимальные математические модели функционирования белковой сети p53–mdm2–wip1–p21 / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики: сборник трудов Международной научно-технической конференции (Воронеж, 3–5 декабря 2018 г.) – Воронеж : Издательство «Научно-исследовательские публикации». – 2019. – С. 672–679.
99. Воропаева О. Ф. Математическое моделирование динамики сети биомаркеров дегенеративных заболеваний / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Распределенные информационно-вычислительные ресурсы. Цифровые двойники и большие данные (DICR-2019): Труды XVII Международной конференции (Новосибирск, 03.12-06.12.2019). – Новосибирск: ИВТ СО РАН. – 2019. – С. 185–190.
100. Воропаева, О. Ф. Математическое моделирование противораковых терапевтических воздействий / О. Ф. Воропаева, К. С. Гаврилова, С. Д. Сенотрусова // Актуальные проблемы прикладной математики, информатики и механики: сборник трудов Международной научно-технической конференции (Воронеж, 7–9 декабря 2020 г.). – Воронеж: Издательство «Научно-исследовательские публикации». – 2021. – С. 672–679.
101. Zhang, T. Computational analysis of dynamical responses to the intrinsic pathway of programmed cell death / T. Zhang, P. Brazhnik, J. J. Tyson // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 97. – P. 415–434.
102. Toettcher, J. E. Distinct mechanisms act in concert to mediate cell cycle arrest / J. E. Toettcher, A. Loewer, G. J. Ostheimer, M. B. Yaffe, B. Tidor, G. Lahav // *PNAS USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 785–790.
103. Zhang, X. P. Cell fate decision mediated by p53 pulses / X. P. Zhang, F. Liu, Z. Cheng, W. Wang // *PNAS USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 12245–12250.
104. Zhuge, C. PDCD5 functions as a regulator of p53 dynamics in the DNA damage response / C. Zhuge, X. Sun, Y. Chen, J. Lei // *J. Theor. Biol.* – 2016. – Vol. 388. – P. 1–10.
105. Chong, K. H. Mathematical modelling of core regulatory mechanism in p53 protein that activates apoptotic switch / K. H. Chong, S. Samarasinghe, D. Kulasiri, J. Zheng // *J. Theor. Biol.* – 2019. – Vol. 462. – P. 134–147.
106. Kutumova, E. Model composition through model reduction: a combined model of CD95 and NF- κ B signaling pathways / E. Kutumova, A. Zinovyev, R. Sharipov, F. Kolpakov // *BMC Systems Biology.* – 2013. – Vol. 7. – Article No. 13.
107. Bentele, M. Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis / M. Bentele, I. Lavrik, M. Ulrich, S. Stößer, D. W. Heermann, H. Kalthoff, P. H. Kramer, R. Eils // *The Journal of Cell Biology.* – 2004. – Vol. 166. – No. 6. – P. 839–851.

108. Neumann, L. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells / L. Neumann, C. Pforr, J. Beaudouin, A. Pappa, N. Fricker, P. H. Kramer, I. N. Lavrik, R. Eils // *Mol. Syst. Biol.* – 2010. – Vol. 6. – Article No. 352.
109. Levine, E. Target-specific and global effectors in gene regulation by microRNA / E. Levine, E. Ben-Jacob, H. Levine // *Biophysical Journal.* – 2007. – Vol. 93. – Iss. 11. – P. L52–L54.
110. Nissan, T. Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition / T. Nissan, R. Parker // *RNA.* – 2008. – Vol. 14. – No. 8. – P. 1480–1491.
111. Zinovyev, A. Dynamical modeling of microRNA action on the protein translation process / A. Zinovyev, N. Morozova, N. Nonne, E. Barillot, A. Harel-Bellan, A. N. Gorban // *BMC Systems Biology.* – 2010. – Vol. 4. – Article No. 13.
112. Zhdanov, V. P. Effect of non-coding RNA on bistability and oscillations in mRNA-protein interplay / V. P. Zhdanov // *Biophys. Rev. Lett.* – 2010. – Vol. 5. – No. 2. – P. 89–107.
113. Zhdanov, V. P. Kinetic models of gene expression including non-coding RNAs / V. P. Zhdanov // *Physics Reports.* – 2011. – Vol. 500. – No. 1. – P. 1–42.
114. Zinovyev, A. Mathematical modeling of microRNA-mediated mechanisms of translation repression / A. Zinovyev, N. Morozova, A. Gorban, A. Harel-Bellan // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 774. – P. 189–224.
115. Zhdanov, V. P. Intracellular miRNA or siRNA delivery and function / V. P. Zhdanov // *BioSystems.* – 2018. – Vol. 171. – P. 20–25.
116. Nikolov, S. A model-based strategy to investigate the role of microRNA regulation in cancer signalling networks / S. Nikolov, Ju. Vera, U. Schmitz, O. Wolkenhauer // *Theory in Biosciences.* – 2011. – Vol. 130. – No. 1. – P. 55–69.
117. Lai, X. Computational analysis of target hub gene repression regulated by multiple and cooperative miRNAs / X. Lai, U. Schmitz, S. K. Gupta, A. Bhattacharya, M. Kunz, O. Wolkenhauer, Ju. Vera // *Nucleic Acids Research.* – 2012. – Vol. 40. – No. 18. – P. 8818–8834.
118. Lai, X. Modeling miRNA regulation in cancer signaling systems: mir-34a regulation of the p53/Sirt1 signaling module / X. Lai, O. Wolkenhauer, Ju. Vera // *Computational Modeling of Signaling Networks. Methods in Molecular Biology.* – 2012. – Vol. 880. – P. 87–108.
119. Nikolov, S. Dynamics of a miRNA model with two delays / S. Nikolov, Ju. Vera Gonzalez, M. Nenov, O. Wolkenhauer // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* – 2012. – Vol. 26. – P. 3315–3320.
120. Vera, Ju. Kinetic modeling-based detection of genetic signatures that provide chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 network / Ju. Vera, U. Schmitz, X. Lai, D. Engelmann,

- F. M. Khan, O. Wolkenhauer, B. M. Putzer // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – No. 12. – P. 3511–3524.
121. Lai, X. A systems' biology approach to study microRNA-mediated gene regulatory networks / X. Lai, A. Bhattacharya, U. Schmitz, M. Kunz, Ju. Vera, O. Wolkenhauer // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – Article No. 703849.
122. Lai, X. Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling / X. Lai, O. Wolkenhauer, Ju. Vera // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – No. 13. – P. 6019–6035.
123. Nikolov, S. The role of cooperativity in a p53-miR34 dynamical mathematical model / S. Nikolov, O. Wolkenhauer, Ju. Vera, M. Nenov // *Journal of Theoretical Biology*. – 2020. – Vol. 495. – Article No. 110252
124. Ooi, H. K. Integral control feedback circuit for the reactivation of malfunctioning p53 pathway [Electronic resource] / H. K. Ooi, L. Ma – arXiv: 1510.04136 [q-bio.MN], 2015. – URL: arxiv.org/abs/1510.04136 (accessed 17.03.2019).
125. Moore, R. MiR-192-mediated positive feedback loop controls the robustness of stress-induced p53 oscillations in breast cancer cells / R. Moore, H. K. Ooi, T. Kang, L. Bleris, L. Ma // *PLoS Computational Biology*. – 2015. – Vol. 11. – No. 12. – Article No. e1004653.
126. Jonak, K. A novel mathematical model of ATM/p53/NF- κ B pathways points to the importance of the DDR switch-off mechanisms / K. Jonak, M. Kurpas, K. Szoltysek, P. Janus, A. Abramowicz, K. Puszynski // *BMC Systems Biology*. – 2016. – Vol. 10. – Article No. 75.
127. Liu, Z. MicroRNA regulatory network: structure and function / Z. Liu, J. Shen, S. Cai, F. Yan. – Springer, 2018. – 231 p.
128. Gupta, S. Modeling the role of microRNA-449a in the regulation of the G2/M cell cycle checkpoint in prostate LNCaP cells under ionizing radiation / S. Gupta, D. A. Silveira, J. C. M. Mombach // *PLoS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – No. 7. – Article No. e0200768.
129. Guha, A. Integrated regulation of HuR by translation repression and protein degradation determines pulsatile expression of p53 under DNA damage / A. Guha, D. Ahuja, S. D. Mandal, B. Parasar, K. Deyasi, D. Roy, V. Sharma, B. Willard, A. Ghosh, P. S. Ray // *iScience*. – 2019. – Vol. 15. – P. 342–359.
130. Gao, C. Dynamic behavior of p53 driven by delay and a microrna-34a-mediated feedback loop / C. Gao, H. Liu, F. Yan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – Article No. 1271.
131. Марчук, Г. И. Математические модели в иммунологии / Г. И. Марчук. – М.: Наука, 1980. – 264 с.
132. Ризниченко, Г. Ю. Математические модели биологических продукционных процессов / Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин. – М.: Изд-во МГУ, 1993. – 302 с.

133. Братусь, А. С. Дискретные динамические системы и математические модели в экологии: Учебное пособие / А. С. Братусь, А. С. Новожилов, Е. В. Родина. – М.: МИИТ, 2005. – 139 с.
134. Lappa, A. V. A non-invasive diffuse reflectance calibration-free method for absolute determination of exogenous biochemicals concentration in biological tissues / A. V. Lappa, A. N. Kulikovskiy, O. G. Busarov // *Proceedings of SPIE*. – 2014. – Vol. 8952. – P. 895216-1–895216-12.
135. Khe, A. K. Viscous dissipation energy as a risk factor in multiple cerebral aneurysms / A. K. Khe, A. P. Chupakhin, A. A. Cherevko, S. S. Eliava, Y. V. Pilipenko. // *Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling*. – 2015. – Vol. 30. – No. 5. – P. 277–287.
136. Kabanikhin, S. I. Inverse problems of immunology and epidemiology / S. I. Kabanikhin, O. I. Krivorot'ko, V. A. Latyshenko, D. V. Yermolenko, V. N. Kashtanova // *Eurasian Journal of Mathematical and Computer Applications*. – 2017. – Vol. 5. – Iss. 2. – P. 14–35.
137. Baker, C. T. Computational approaches to parameter estimation and model selection in immunology / C. T. Baker, G. A. Bocharov, J. M. Ford, P. M. Lumb, S. J. Norton, C. A. H. Paul, T. Junt, P. Krebs, B. Ludewig // *Journal of Computational and Applied Mathematics*. – 2005. – Vol. 184. – No. 1. – P. 50–76.
138. Романюха, А. А. Математические модели в иммунологии и эпидемиологии инфекционных заболеваний / А. А. Романюха – М.: Лаборатория знаний, 2020. – 296 с.
139. Логинов, К. К. Асимптотическое поведение решений интегро-дифференциального уравнения с запаздыванием, возникающего в моделях живых систем / К. К. Логинов, Н. В. Перцев // *Математические труды*. – 2020. – Т. 23. – № 2. – С. 122–147.
140. Goldbeter, A. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems / A. Goldbeter, D. E. Koshland // *PNAS*. – 1981. – Vol. 78. – P. 6840–6844.
141. Лихошвай, В. А. Моделирование уравнением с запаздывающим аргументом многостадийного синтеза без ветвления / В. А. Лихошвай, С. И. Фадеев, Г. В. Демиденко, Ю. Г. Матушкин // *Сиб. журн. индустр. математики*. – 2004. – Т. 7. – № 1 (17). – С. 73–94.
142. Эльсгольц, Л. Э. Введение в теорию дифференциальных уравнений с отклоняющимся аргументом / Л. Э. Эльсгольц, С. Б. Норкин. – М.: Наука, 1971. – 296 с.
143. Мышкис, А. Д. Линейные дифференциальные уравнения с запаздывающим аргументом / А. Д. Мышкис. – М.: Наука, 1972. – 352 с.
144. Бахвалов, Н. С. Численные методы / Н. С. Бахвалов, Н. П. Жидков, Г. М. Кобельков. – М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2008. – 636 с.
145. Калиткин, Н. Н. Численные методы / Н. Н. Калиткин; под ред. А. А. Самарского. – М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1978. – 512 с.

146. Белых, Л. Н. Анализ математических моделей в иммунологии / Л. Н. Белых; под ред. Г. И. Марчука. – М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1988. – 192 с.
147. Stewart-Ornstein, J. Conservation and divergence of p53 oscillation dynamics across species / J. Stewart-Ornstein, H. W. (Jacky) Cheng, G. Lahav // *Cell Systems*. – 2017. – Vol. 5. – P. 410–417.
148. Wu, M. p53 dynamics orchestrates with binding affinity to target genes for cell fate decision / M. Wu, H. Ye, Z. Tang, C. Shao, G. Lu, B. Chen, Y. Yang, G. Wang, H. Hao // *Cell Death and Disease*. – 2017. – Vol. 8 – Article No. e3130.
149. Вабищевич, П. Н. Численные методы: Вычислительный практикум / П. Н. Вабищевич. – М.: Книжный дом «Либроком», 2010. – 320 с.
150. Мышкис, А. Д. Линейные дифференциальные уравнения с запаздывающим аргументом / А. Д. Мышкис. – М., Л.: Государственное издательство технико-теоретической литературы, 1951. – 256 с.
151. Зверкин, А. М. Дифференциальные уравнения с отклоняющимся аргументом / А. М. Зверкин, Г. А. Каменский, С. Б. Норкин, Л. Э. Эльсгольц // *Успехи математических наук*. – 1962. – Т. 17. – Вып. 2(104). – С. 77–164.
152. Зверкина, Т. С. Модификация конечноразностных методов для интегрирования обыкновенных дифференциальных уравнений с негладкими решениями / Т. С. Зверкина // *Журн. вычисл. математики и матем. физики*. – 1964. – Т. 4, дополнение к № 4. – С. 149–160.
153. Батчер, Дж. К. Современные численные методы решения обыкновенных дифференциальных уравнений / Дж. К. Батчер, Дж. Л. Лэмберт, А. Протеро, Х. Х. Робертсон, С. Т. Х. Бейкер; под ред. Дж. Холл, Дж. Уатт; пер. с англ. В. В. Поспелов, Б. П. Герасимова; под ред. А. Д. Горбунова. – М.: Мир, 1979. – 312 с.
154. Хайрер, Э. Решение обыкновенных дифференциальных уравнений. Нежесткие задачи / Э. Хайрер, С. Нерсетт, Г. Ваннер. – М.: Мир, 1990. – 512 с.
155. Bellen, A. Numerical methods for delay differential equations. / A. Bellen, M. Zennaro. – Oxford university press, Oxford, 2003. – 392 p.
156. Kuang, J. Stability of numerical methods for delay differential equations / J. Kuang, Y. Cong. – Science Press, Beijing, 2005. – 293 p.
157. Shampine, L. F. Numerical solutions of delay differential equations. / L. F. Shampine, S. Thompson. – In: *Delay Differential Equations: Recent Advances and New Directions*. Springer, New York, 2009. – P. 245–271.

158. Dorodnitsyn, V. A. Lie group classification of first-order delay ordinary differential equations / V. A. Dorodnitsyn, R. Kozlov, S. V. Meleshko, P. Winternitz // *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*. – 2018. – Vol. 51. – No. 20. – Article No. 205202.
159. Годунов, С. К. Разностные схемы / С. К. Годунов, В. С. Рябенкий. – М.: Наука, 1977. – 440 с.
160. Новиков, Е. А. Одношаговые безытерационные методы решения жестких систем / Е. А. Новиков, Ю. А. Шитов, Ю. И. Шокин // *Докл. АН СССР*. – 1988. – Т. 301. – № 6. – С. 1310–1314.
161. Самарский, А. А. Численные методы: Учебное пособие для вузов / А. А. Самарский, А. В. Гулин. – М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1989. – 432 с.
162. Калиткин, Н. Н. Интегрирование жестких систем дифференциальных уравнений / Н. Н. Калиткин, Л. В. Кузьмина // *Препринт ИПМ им. М.В. Келдыша*. – 1991. – Т. 1. – № 80. – С. 61–71.
163. Хайрер, Э. Решение обыкновенных дифференциальных уравнений. Жесткие и дифференциально-алгебраические задачи / Э. Хайрер, Г. Ваннер. – М.: Мир, 1999. – 685 с.
164. Филиппов, С. С. АБС-схемы для жестких систем обыкновенных дифференциальных уравнений / С. С. Филиппов // *Докл. РАН*. – 2004. – Т. 399. – № 2. – С. 170–172.
165. Петров, И. Б. Лекции по вычислительной математике / И. Б. Петров, А. И. Лобанов. – М.: Интернет-Университет, 2006. – 523 с.
166. Альшина, Е. А. Оптимальные схемы Рунге–Кутты с первого по шестой порядок точности / Е. А. Альшина, Е. М. Закс, Н. Н. Калиткин // *ЖВМиМФ*. – 2008. – Т. 48. – № 3. – С. 418–429.
167. Новиков, Е. А. Компьютерное моделирование жестких гибридных систем: монография / Е. А. Новиков, Ю. В. Шорников. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2012. – 450 с.
168. Калиткин, Н. Н. Решение задачи Коши для жестких систем с гарантированной точностью методом длины дуги / Н. Н. Калиткин, И. П. Пошивайло // *Математическое моделирование*. – 2014. – Т. 26. – № 7. – С. 3–18.
169. Скворцов, Л. М. Построение и анализ явных адаптивных одношаговых методов численного решения жестких задач / Л. М. Скворцов // *Ж. вычисл. матем. и матем. физ.* – 2020. – Т. 60. – № 7. – С. 1111–1125.
170. Гельфанд, И. М. О некоторых способах управления сложными системами / И. М. Гельфанд, М. Л. Цетлин // *Успехи математических наук*. – 1962. – Т. 17. – № 1 (103). – С. 3–25.
171. Гольдин, С. В. Одна обратная кинематическая задача сейсмоки отраженных волн / С. В. Гольдин // *Докл. АН СССР*. – 1977. – Т. 233. – № 1. – С. 64–67.

172. Иванов, В. К. Теория линейных некорректных задач и ее приложения / В. К. Иванов, В. В. Васин, В. П. Танана. – М.: Наука, 1978. – 206 с.
173. Тихонов, А. Н. Методы решения некорректных задач / А. Н. Тихонов, В. Я. Арсенин. – М.: Наука, 1979. – 288 с.
174. Алексеев, А. С. Обратные кинематические задачи взрывной сейсмологии / А. С. Алексеев, Э. Н. Бессонова, Н. Н. Матвеева и др.; отв. ред. С. М. Зверев. – М.: Наука, 1979. – 232 с.
175. Лаврентьев, М. М., Некорректные задачи математической физики и анализа / М. М. Лаврентьев, В. Г. Романов, С. П. Шишатский. – М.: Наука, 1980. – 286 с.
176. Тихонов, А. Н. Нелинейные некорректные задачи / А. Н. Тихонов, А. С. Леонов, А. Г. Ягола. М.: Наука, 1995. – 310 с.
177. Самарский, А. А. Численные методы решения обратных задач математической физики / А. А. Самарский, П. Н. Вабищевич. – М.: Издательство ЛКИ, 2009. – 480 с.
178. Кабанихин, С. И. Обратные и некорректные задачи / С. И. Кабанихин. – Новосибирск: Сибирское научное издательство, 2009. – 457 с.
179. Семенкин, Е. С. Методы оптимизации сложных систем / Е. С. Семенкин, О. Э. Семенкина, В. А. Терсков / Красноярск: Сибирский юридический институт МВД России, 2000. – 254 с.
180. Engl, H. W. Inverse problems in systems biology / H. W. Engl, C. Flamm, P. Kügler, J. Lu, S. Müller, P. Schuster // Inverse Problems. – 2009. – Vol. 25. – No. 12. – 51 p.
181. Muhlenbein, H. Predictive models for the Breeder genetic algorithm / H. Muhlenbein, D. Schlierkamp-Voosen // Evolutionary Computation. – 1993. – Vol. 1. – No. 1. – P. 25–49.
182. Sallaberger, M. The design of Francis turbine runners by 3D Euler simulations coupled to a breeder genetic algorithm / M. Sallaberger, M. Fisler, M. Michaud, K. Eisele, K. Casey // Proceedings of 20th IAHR Symposium on Hydraulic Machinery and Systems, Aug. 6–9, 2000. Charlotte, North Carolina, USA. – 2000. – 10 p.
183. Черный, С. Г. Численное моделирование течений в турбомашинах / С. Г. Черный, Д. В. Чирков, В. Н. Лапин, В. А. Скороспелов, С. В. Шаров. – Новосибирск: Наука, 2006. – 201 с.
184. Воропаева, О. Ф. Численная модель динамики факторов воспаления в ядре инфаркта миокарда / О. Ф. Воропаева, Ч. А. Цгоев // Сибирский журнал индустриальной математики. – 2019. – Т. 22. – № 2. – С. 13–26.
185. Kabanikhin, S. I. On parameter definition of the models describing by systems of nonlinear differential equations / S. I. Kabanikhin, A. I. Il'in, O. I. Krivirov'ko // Sibir. Elektr. Mat. Izv. – 2014. – Vol. 11. – P. 62–76.

186. Wilkinson, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome / K. D. Wilkinson // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 141–148.
187. Haupt, Y. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 / Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, M. Oren // *Nature.* – 1997. – Vol. 387. – P. 296–299.
188. Balagurumorthy, P. Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA / P. Balagurumorthy, H. Sakamoto, M. S. Lewis, N. Zambrano, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, E. Appella, R. E. Harrington // *PNAS.* – 1995. – Vol. 92. – Iss. 19. – P. 8591–8595.
189. Vousden, K. H. Live or let die: the cell's response to p53 / K. H. Vousden, X. Lu // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – Vol. 2. – P. 594–604.
190. Yang, R. Cell type-dependent bimodal p53 activation engenders a dynamic mechanism of chemoresistance / R. Yang, B. Huang, Y. Zhu, Y. Li, F. Liu, J. Shi // *Science Advances.* – 2018. – Vol. 4. – No. 12. – Article No. eaat5077.
191. Иглин, С. П. Теория вероятностей и математическая статистика на базе MATLAB / С. П. Иглин. – Харьков: НТУ “ХПИ”, 2006. – 612 с.
192. Raver-Shapira, N. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis / N. Raver-Shapira, E. Marciano, E. Meiri, Ya. Spector, N. Rosenfeld, N. Moskovits, Z. Bentwich, M. Oren // *Molecular Cell.* – 2007. – Vol. 26. – P. 731–743.
193. Eykhoff, P. System identification: parameter and state estimation / P. Eykhoff. – Wiley, London, 1974.
194. Tilden, J. W. Sensivity analysis of chemically reacting systems / J. W. Tilden, V. Costanza, G. J. McRae, J. H. Seinfeld // In: *Modelling of chemical reaction systems. Springer Series in Chemical Physics.* – 1981. – No. 18. – P. 69–91.
195. Романовский, Ю. М. Математическая биофизика / Ю. М. Романовский, Н. В. Степанова, Д. С. Чернавский. – М.: Наука, 1984 – 304 с.
196. Льюнг, Л. Идентификация систем. Теория для пользователя: Пер. с англ. / Л. Льюнг; под ред. Я. З. Цыпкина. – М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1991. – 432 с.
197. Rabitz, H. Sensitivity analysis in chemical kinetics / H. Rabitz, M. Kramer, D. Dacol // *Annual Review of Physical Chemistry.* – 1983. – Vol. 34. – P. 419–461.
198. Полак, Л. С. Вычислительные методы в химической кинетике / Л. С. Полак, М. Я. Гольденберг, А. А. Левицкий. – М.: Наука, 1984. – 280 с.
199. Оран, Э. Численное моделирование реагирующих потоков: Пер. с англ. / Э. Оран, Дж. Борис. – М.: Мир, 1990. – 660 с.

200. Hamby, D. M. A review of techniques for parameter sensitivity analysis of environmental models / D. M. Hamby // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 1994. – Vol. 32. – No. 2. – P. 135–154.
201. Baker, C. T. Computational approaches to parameter estimation and model selection in immunology / C. T. Baker, G. A. Bocharov, J. M. Ford, P. M. Lumb, S. J. Norton, C. A. H. Paul, T. Junt, P. Krebs, B. Ludewig // *Journal of Computational and Applied Mathematics*. – 2005. – Vol. 184. – No. 1. – P. 50–76.
202. Кабанихин, С. И. Оптимизационные методы решения обратных задач иммунологии и эпидемиологии / С. И. Кабанихин, О. И. Криворотько // *Журнал вычислительной математики и математической физики*. – 2020. – Т. 60. – № 4. – С. 590–600.
203. Burgos, 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 / K. Burgos, I. Malenica, R. Metpally, A. Courtright, B. Rakela, T. Beach, H. Shill, C. Adler, M. Sabbagh, W. Villa et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – No. 5. – Article No. e94839.
204. Chang, T.-C. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis / T.-C. Chang, E. A. Wentzel, O. A. Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K. H. Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito, C. J. Lowenstein et al. // *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 26. – P. 745–752.
205. Lukiw, W. J. Studying microRNA function and dysfunction in Alzheimer's disease / W. J. Lukiw, T. V. Andreeva, A. P. Grigorenko, E. I. Rogaev // *Frontiers in Genetics*. – 2013. – Vol. 3. – Article No. 327.
206. Sachdeva, M. P53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145 / M. Sachdeva, S. Zhu, F. Wu, H. Wu, V. Walia, S. Kumar, R. Elble, K. Watabe, Y.-Y. Mo // *PNAS*. – 2009. – Vol. 106. – No. 9. – P. 3207–3212.
207. Салуквадзе, М. Е. К задаче синтеза оптимального регулятора в линейных системах с запаздыванием, подверженных постоянно действующим возмущениям / М. Е. Салуквадзе // *Автоматика и телемеханика*. – 1962. – Т. 23. – № 12. – С. 1595–1601.
208. Красовский, Н. Н. Об аппроксимации одной задачи аналитического конструирования регуляторов в системе с запаздыванием / Н. Н. Красовский // *Прикл. матем. и механика*. – 1964. – Т. 28. – № 4. – С. 716–724.
209. Репин, Ю. М. О приближенной замене систем с запаздыванием обыкновенными динамическими системами / Ю. М. Репин // *Прикл. матем. и механика*. – 1965. – Т. 29. – № 2. – С. 226–235.
210. Gyori, I. Two approximation techniques for functional differential equations / I. Gyori // *Comput. Math. Appl.* – 1988. – Vol. 16. – No. 3. – P. 195–214.

211. Демиденко, Г. В. Математическое моделирование регулярных контуров генных сетей / Г. В. Демиденко, Н. А. Колчанов, В. А. Лихошвай, Ю. Г. Матушкин, С. И. Фадеев // Ж. вычисл. матем. и матем. физ. – 2004. – Т. 44. – № 12. – С. 2276–2295.
212. Демиденко, Г. В. О дифференциальных уравнениях с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко, В. А. Лихошвай // Сиб. мат. журн. – 2005. – Т. 46. – № 3. – С. 538–552.
213. Демиденко, Г. В. Об одном классе систем дифференциальных уравнений и об уравнениях с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко, В. А. Лихошвай, Т. В. Котова, Ю. Е. Хропова // Сиб. мат. журн. – 2006. – Т. 47. – № 1. – С. 58–68.
214. Мудров, А. В. О связи систем обыкновенных дифференциальных уравнений и уравнений с запаздывающим аргументом / А. В. Мудров // Вестник НГУ. Серия: Математика, механика, информатика. – 2007. – Т. 7. – Вып. 2. – С. 52–64.
215. Демиденко, Г. В. О связи между решениями дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом и бесконечномерных систем дифференциальных уравнений / Г. В. Демиденко, В. А. Лихошвай, А. В. Мудров // Дифф. уравн. – 2009. – Т. 45. – № 1. – С. 34–46.
216. Матвеева, И. И. О свойствах решений одной системы, возникающей при моделировании многостадийного синтеза вещества / И. И. Матвеева, А. М. Попов // Вестник НГУ. Серия: Математика, механика, информатика. – 2009. – Т. 9. – Вып. 3. – С. 86–94.
217. Демиденко, Г. В. Об одном способе аппроксимации решений дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко, И. А. Мельник // Сиб. мат. журн. – 2010. – Т. 51. – № 3. – С. 528–546.
218. Demidenko, G. V. Limit properties of solutions to one class of systems of differential equations with parameters / G. V. Demidenko, T. V. Kotova // J. Anal. Appl. – 2010. – Vol. 8. – No. 2. – P. 63–74
219. Лихошвай, В. А. Об исследовании нелинейных моделей многостадийного синтеза вещества: препр. № 246 / В. А. Лихошвай, С. И. Фадеев, Д. Н. Штокало. – Новосибирск: Ин-т матем. им. С. Л. Соболева, 2010. – 37 с.
220. Фадеев, С. И. Об исследовании математических моделей матричного синтеза нерегулярных полимеров ДНК, РНК и белков / С. И. Фадеев, В. А. Лихошвай, Д. Н. Штокало, В. К. Королев // Сиб. электронные матем. изв. – 2010. – Т. 7. – С. 467–475.
221. Мельник, И. А. Об одной нелинейной системе дифференциальных уравнений, моделирующей многостадийный синтез вещества / И. А. Мельник // Вестник ТГУ. – 2011. – Т. 16. – № 5. – С. 1254–1259.
222. Демиденко, Г. В. О классах систем дифференциальных уравнений высокой размерности и уравнениях с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко // Итоги науки. Юг России.

- Сер. Математический форум. Владикавказ: ЮМИ ВНЦ РАН и РСО-А, 2011. – Т. 5. – С. 45–56.
223. Демиденко, Г. В. Системы дифференциальных уравнений высокой размерности и уравнения с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко // Сиб. матем. журн. – 2012. – Т. 53. – № 6. – С. 1274–1282.
224. Штокало, Д. Н. О предельном переходе в модели многостадийного многоэтапного синтеза вещества / Д. Н. Штокало // Сиб. журн. индустр. математики. – 2012. – Т. 15. – № 4. – С. 135–146.
225. Матвеева, И. И. О свойствах решений одного класса нелинейных систем дифференциальных уравнений большой размерности / И. И. Матвеева, И. А. Мельник // Сиб. мат. журн. – 2012. – Т. 53. – № 2. – С. 312–324.
226. Штокало Д. Н. Исследование математических моделей многостадийного синтеза вещества: дисс. на соискание уч. степени канд. физ.-мат. наук: 05.13.18 / Штокало Дмитрий Николаевич. – Новосибирск, 2014. – 148 с.
227. Демиденко, Г. В. Класс систем обыкновенных дифференциальных уравнений высокой размерности / Г. В. Демиденко, И. А. Уварова // Сиб. журн. индустр. мат. – 2016. – Т. 19. – № 2. – С. 47–60.
228. Демиденко, Г. В. Предельные теоремы для одной системы обыкновенных дифференциальных уравнений высокой размерности и уравнения с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко, И. А. Уварова // Динамические системы. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 205–234.
229. Демиденко, Г. В. Об одной системе обыкновенных дифференциальных уравнений высокой размерности и уравнении с запаздывающим аргументом / Г. В. Демиденко, И. А. Уварова, Ю. А. Хазова // Сиб. журн. индустр. мат. – 2019. – Т. 22. – № 3. – С. 59–73.
230. Fadeev, S. I. The package STEP+ for numerical study of autonomous systems arising when modeling dynamics of genetic-molecular systems / S. I. Fadeev, V. K. Korolev, I. A. Gainova, A. E. Medvedev // Proc. of the V Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. – Novosibirsk, Russia, 2006. – Vol. 2. – P. 118–120.
231. Бабенко, К. И. Основы численного анализа / К. И. Бабенко. – М.: Наука, 1986. – 743 с.
232. Zhu, B. The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma / B. Zhu, S. Ju, H. Chu, X. Shen, Y. Zhang, X. Luo, H. Cong // Oncology Letters. – 2018. – Vol. 15. – P. 6094–6106.
233. Chen, C. Y. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway / C. Y. Chen, J. D. Oliner, Q. Zhan, A. J. Fornace, B. Vogelstein, M. B. Kastan // Proc.

- of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91. – No. 7. – P. 2684–2688.
234. Rokavec, M. The p53/microRNA connection in gastrointestinal cancer / M. Rokavec, H. Li, L. Jiang, H. Hermeking // *Clinical and experimental gastroenterology*. – 2014. – Vol. 7. – P. 395–413.
235. Okada, N. A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression / N. Okada, C.-P. Lin, M. C. Ribeiro, A. Biton, G. Lai, X. He, P. Bu, H. Vogel, D. M. Jablons, A. C. Keller et al. // *Genes and Development*. – 2014. – Vol. 28. – P. 438–450.
236. Navarro, F. miR-34 and p53: new insights into a complex functional relationship / F. Navarro, J. Lieberman // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – Article No. e0132767.
237. Pecháčková, S. WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy / S. Pecháčková, K. Burdová, L. Macurek // *Journal of Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 95. – P. 589–599.
238. Mansoori, B. miR-34a and miR-200c have an additive tumor-suppressive effect on breast cancer cells and patient prognosis / B. Mansoori, N. Silvestris, A. Mohammadi, V. Khaze, E. Baghbani, A. Mokhtarzadeh, D. Shanebandi, A. Derakhshani, P. H. G. Duijf, B. Baradaran // *Genes*. – 2021. – Vol. 12. – Iss. 2. – Article No. 267.
239. Chang, C.-J. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs / C.-J. Chang, C.-H. Chao, W. Xia, J.-Y. Yang, Y. Xiong, C.-W. Li, W.-H. Yu, S. K. Rehman, J. L. Hsu, H.-H. Lee et al. // *Nature cell biology*. – 2011. – Vol. 13. – P. 317–323.
240. Carlomosti, F. Oxidative stress-induced miR-200c disrupts the regulatory loop among SIRT1, FOXO1 and eNOS / F. Carlomosti, M. D'Agostino, S. Beji, A. Torcinaro, R. Rizzi, G. Zaccagnini, B. Maimone, V. Di Stefano, F. De Santa, S. Cordisco et al. // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2017. – Vol. 27. – No. 6. – P. 328–344.
241. Climent, M. MicroRNA and ROS crosstalk in cardiac and pulmonary diseases / M. Climent, G. Viggiani, Y.-W. Chen, G. Coulis, A. Castaldi // *International Journal Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – Article No. 4370.
242. Farghali, H. SIRT1 modulators in experimentally induced liver injury / H. Farghali, M. K. Kemelo, C. N. Kutinova // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – Article No. 8765954.
243. Татарникова, О. Г. Бета-амилоид и тау-белок: Структура, взаимодействие и прионоподобные свойства / О. Г. Татарникова, М. А. Орлов, Н. В. Бобкова // *Успехи биологической химии*. – 2015. – Т. 55. – № 1. – С. 351–390.
244. Buckley, F. Modelling Down syndrome / F. Buckley // *Down Syndrome Research and Practice*. – 2008. – Vol. 12. – P. 98–102.

245. Liu, N. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila* / N. Liu, M. Landreh, K. Cao, M. Abe, G.-J. Hendriks, J. R. Kennerdell, Y. Zhu, L.-S. Wang, N. M. Bonini // *Nature*. – 2012. – Vol. 482. – P. 519–523.
246. Iorio, M. V. MicroRNA signatures in human ovarian cancer / M. V. Iorio, R. Visone, G. Leva, V. Donati, F. Petrocca, P. Casalini, C. Taccioli, S. Volinia, C. G. Liu, H. Alder et al. // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – P. 8699–8707.
247. Шуленина, Л. В. Оценка эффективности p53-зависимой системы сохранения стабильности генома по содержанию микроРНК и мРНК в крови онкологических больных / Л. В. Шуленина, В. Ф. Михайлов, Е. В. Ледин, Н. Ф. Раева, Г. Д. Засухина // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. – 2015. – Т. 60. – № 1. – С. 5–14.
248. Titov, S. E. Selection and validation of miRNAs as normalizers for profiling expression of microRNAs isolated from thyroid fine needle aspiration smears / S. E. Titov, P. S. Demenkov, M. K. Ivanov, E. S. Malakhina, T. L. Poloz, E. V. Tsivlikova, M. S. Ganzha, S. P. Shevchenko, L. F. Gulyaeva, N. N. Kolesnikov // *Oncology Reports*. – 2016. – Vol. 36. – P. 2501–2510.
249. Tian, Q. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women / Q. Tian, Y. Li, F. Wang, Y. Li, J. Xu, Y. Shen, F. Ye, X. Wang, X. Cheng, Y. Chen et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2014. – Vol. 106. – Iss. 9. – Article No. dju241.
250. Ribeiro, J. miR-34a and miR-125b expression in HPV infection and cervical cancer development / J. Ribeiro, J. Marinho-Dias, P. Monteiro, J. Loureiro, I. Baldaque, R. Medeiros, H. Sousa // *Biomed Res. Int.* – 2015. – Vol. 2015. – Article No. 304584.

Приложение. Свидетельство о государственной регистрации программы

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2018612326

Программа для расчета динамики онкомаркеров p53 и Mdm2 и оценки реакции p53-зависимых микроРНК на стрессовые воздействия

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИВТ СО РАН) (RU)*

Авторы: *Сенотурсова Софья Дмитриевна (RU),
Воропаева Ольга Фалалеевна (RU)*

Заявка № **2017663643**

Дата поступления **26 декабря 2017 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ **15 февраля 2018 г.**



*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев