

УДК 519.6, 51.76

## Математическое моделирование функционирования положительной связи в системе онкомаркеров p53–микроРНК

С.Д. Сенотрусова, О.Ф. Воропаева

Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, просп. Акад. М.А. Лаврентьева, 6, Новосибирск, 630090

E-mails: senotrusova.s@mail.ru (Сенотрусова С.Д.), vorop@ict.nsc.ru (Воропаева О.Ф.)

**Сенотрусова С.Д., Воропаева О.Ф.** Математическое моделирование функционирования положительной связи в системе онкомаркеров p53–микроРНК // Сиб. журн. вычисл. математики / РАН. Сиб. отд.-ние. — Новосибирск, 2019. — Т. 22, № 3. — С. 325–344.

Разработана иерархия минимальных математических моделей динамики системы p53–Mdm2–microRNA, основанных на использовании дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами, скрывающими сложные взаимодействия в сигнальной системе белка p53. Рассматриваются два вида взаимодействия p53 с микроРНК: прямая и обратная положительные связи. Обратная связь microRNA–p53 осуществляется за счет отрицательного воздействия микроРНК на белок Mdm2, который сам является отрицательным регулятором p53. Для аппроксимации прямого положительного воздействия p53 на микроРНК используется линейная функция или представление типа Гольдбетера–Кошланда.

Выполнено сопоставление численных решений с данными медико-биологических исследований, которое подтверждает адекватность предложенных моделей и результатов численного анализа. Особое внимание уделено анализу положительной обратной связи p53 и микроРНК. Показано, что можно пренебрегать связью Mdm2–microRNA, по крайней мере, для ряда наиболее изученных семейств микроРНК, связанных прямой положительной связью с p53. Вместе с тем, те из микроРНК, которые являются одновременно и важным отрицательным регулятором Mdm2, способны оказать самое существенное влияние на функционирование всей системы p53–Mdm2–microRNA. Это свидетельствует о регуляторной функции микроРНК по отношению к p53, что согласуется с известными представлениями о роли микроРНК в биологических процессах. Результаты численных экспериментов указывают на то, что такие микроРНК могут рассматриваться как действенный фактор противораковой терапии, позволяющий инициировать апоптоз раковых клеток с дефектами p53.

DOI: 10.15372/SJNM20190306

**Ключевые слова:** математическое моделирование, уравнение с запаздыванием, онкомаркер, p53, Mdm2, микроРНК, положительная обратная связь, miR-34, miR-145, рак.

**Senotrusova S.D., Voropaeva O.F.** Mathematical modeling of positive connection functioning in the tumor markers p53–microRNA system // Siberian J. Num. Math. / Sib. Branch of Russ. Acad. of Sci. — Novosibirsk, 2019. — Vol. 22, № 3. — P. 325–344.

The hierarchy of minimal mathematical models of the dynamics of p53–Mdm2–microRNA system has been developed. The models are based on the differential equations with time delay, hiding complex mechanisms of interaction in the signal system of the p53 protein. We consider the two types of interaction of p53 with microRNAs: the positive direct connection and the positive feedback. The feedback of microRNA–p53 is due to the negative effect of microRNA on the protein Mdm2, which itself is a negative regulator of p53. To approximate the direct positive effect of p53 on the microRNA, a linear function or the Goldbeter–Koshland type representation is used.

The comparison of numerical solutions with medical and biological data of a number of specific p53-dependent microRNAs is made, which proves the adequacy of the models proposed and the results of numerical analysis. Special attention was given to the analysis of the positive feedback of p53 and microRNAs. The minimal models adopted have allowed us to consider the most general regularities of the p53-dependent microRNAs functioning. In the framework of these mathematical models it is shown that it is possible to neglect the connection Mdm2–miRNA for, at least, some of the most studied microRNAs associated with a

direct positive connection with p53. However, those of the microRNAs, which are important negative regulator Mdm2, can have the most significant impact on the functioning of the entire system p53–Mdm2–microRNA. Conditions were obtained under which the regulatory function of microRNAs with respect to p53 is manifested. The results of numerical experiments indicate that such microRNAs can be considered to be a factor of the anticancer therapy.

**Keywords:** *mathematical modeling, delay equation, tumor marker, p53, Mdm2, microRNA, positive feedback, miR-34, miR-145, cancer.*

---

## Введение

Успехи современной медицины в борьбе с самыми тяжелыми заболеваниями человека связываются не только с поиском новых терапевтических стратегий, но и с ранней диагностикой на основе лабораторного анализа биомаркеров. Особое место занимают исследования, направленные на получение более точных пациент-ориентированных и одновременно доступных для широкого применения в массовой клинической практике индикаторов таких смертельных заболеваний как рак, болезни Альцгеймера и Паркинсона. Причины этих заболеваний связываются со сбоями в клеточных и молекулярных механизмах, функционирование которых обеспечивается распространением информационных сигналов по сложнейшим сетям сигнальных белков, кодирующих их генов, микроРНК и других регуляторов. Поэтому существенные изменения в состоянии ключевых участников сигнальных путей расцениваются как признак сбоя, который с большой долей вероятности приводит к патологии, а восстановление и тонкая настройка отдельных элементов этих путей — как один из наиболее перспективных вариантов лечения.

Белок p53 хорошо известен в биомедицинском сообществе, прежде всего, как важный подавитель опухолевого процесса и онкомаркер [1–7]. Инактивация сигнального пути p53 часто происходит при раке вследствие экспрессии мутантного белка p53 с частично или полностью утраченной функцией регулятора апоптоза — программы естественного самоуничтожения поврежденных или старых клеток. А в опухолях, сохраняющих дикий тип p53, этот путь может быть изменен, в частности, белками-регуляторами p53 или p53-зависимыми микроРНК (miRNA или miR). К ним относятся белок-ингибитор Mdm2, а также семейство miR-34 и целый ряд других, потому что их дерегуляция выявляется в клетках разных форм рака. Известно, что эти же факторы могут стать инструментом гиперактивации пути p53, способной вызывать массовую гибель раковых клеток. Вместе с тем при проведении химиотерапии, при инфарктах, сердечной недостаточности и нейродегенеративных патологиях наблюдается гиперактивация p53-зависимого апоптоза, которая усиливает остроту заболевания и уровень повреждения органа-мишени. Поэтому одним из актуальных направлений биологии и фундаментальной медицины является поиск вариантов терапевтического воздействия на p53 и микроРНК с целью управления функцией p53-зависимого апоптоза. Бурно развиваются также исследования, связанные с привлечением p53-зависимых микроРНК в качестве биомаркеров для диагностики и прогноза исхода онкологических и других дегенеративных заболеваний. При этом отмечается, что микроРНК занимают особое место среди потенциальных онкомаркеров в первую очередь из-за относительной доступности их использования в широкой клинической практике. Более детально медико-биологические аспекты функционирования системы p53–Mdm2–miR обсуждаются в [1–18] и цитируемой там литературе.

Сигнальный путь p53 включает в себя сложнейшую сеть белков, кодирующих их генов, микроРНК и других регуляторов, характер связей, мишени и функции которых

постоянно уточняются. Вместе с тем в лабораторных и клинических исследованиях общепринятым является подход, нацеленный на изучение функционирования ключевых элементов этих сетей как в достаточной мере идеализированных объектов. В этом случае размерность  $n$  фазового пространства состояний биологической системы принимается весьма малой величиной. Так, при  $n = 2$  рассматривается система белок–ингибитор, при  $n = 3$  — системы мРНК–белок–ингибитор или сигнал–белок–ингибитор. Подобная идеализация позволяет исследовать наиболее общие закономерности функционирования биологических систем. В качестве примера упомянем большой цикл комплексных исследований p53, результаты которых можно найти, в частности, в [3–7]. Согласно одной из таких идеализаций [4] p53 удерживается в нормальных условиях на низких уровнях, прежде всего, через петлю отрицательной обратной связи с Mdm2. Белок p53 положительно регулирует Mdm2, активируя транскрипцию Mdm2, а Mdm2 отрицательно регулирует p53, ингибируя его транскрипционную активность и, тем самым, поощряя деградацию p53 через механизм убиквитинирования. В [1] отмечается, что процесс взаимодействия p53 с белком Mdm2 тонко регулируется за счет множества механизмов. Одни механизмы направлены на регуляцию активности Mdm2, в то время как другие нацелены на модификацию его мишени, т. е. самого белка p53. В ответ на стрессовое воздействие система демонстрирует весьма сложное динамическое поведение, изучение которого пока далеко от завершения. Известно (см., например, [4]), что в условиях стресса p53 активируется при посредничестве медиаторов, большинство из которых индуцируют посттрансляционную модификацию p53, нарушающую взаимодействие p53–Mdm2. Тем не менее в некоторых источниках сообщается о значительном укреплении связи p53–Mdm2 в условиях стресса. При повреждении ДНК в культивируемых раковых клетках и у трансгенных мышей часто наблюдают режимы функционирования системы p53–Mdm2 с характерными повторяющимися импульсами.

Соответствующие описанному подходу минимальные (малоразмерные) математические модели, включая модели, предложенные в упомянутых экспериментальных работах для объяснения наблюдаемых фактов, также нашли широкое распространение (обзор работ, в которых представлены математические модели системы p53, можно найти, в частности, в [17, 18] и цитируемой там литературе). Среди них особое место занимают математические модели, основанные на дифференциальных уравнениях с запаздывающим аргументом. Следует отметить, что использование функций с запаздыванием в случае системы p53–Mdm2 в первую очередь обосновывается непосредственными лабораторными наблюдениями, в которых фиксируется запаздывание реакции Mdm2 на изменение состояния p53 (от нескольких минут до нескольких часов) [2, 3].

Более детальные исследования показали, что феномен запаздывания может быть обусловлен, в частности, наличием промежуточных стадий в передаче сигналов в системе p53–Mdm2. Так, роль посредников, регуляторов и/или мишеней в этой сети играют уже упоминавшиеся семейства микроРНК [16]. Вклад промежуточных стадий в общую динамику системы p53–Mdm2 с той или иной степенью достоверности может быть описан системой обыкновенных дифференциальных уравнений (см., например, [5]) или аппроксимирован уравнением с запаздыванием. В связи с этим при численном моделировании приобретают актуальность теоретические результаты о существовании предельного перехода от уравнений с запаздыванием к системе ОДУ высокой размерности и обратно (см., в частности, [19] и последующие работы этих авторов).

Для настоящего исследования важное значение имеет одна из моделей динамики p53–Mdm2 ( $n = 2$ ), включающая в себя уравнение с запаздыванием, которая предложена в [20]. Эта минимальная модель представляет собой балансные соотношения, отражаю-

щие вклад в совместную динамику уровней белков p53 и Mdm2 трех механизмов: спонтанной генерации (с постоянной скоростью) и деградации (под деградацией понимается как спонтанная деградация белков, так и их связывание с какой-либо другой молекулой, не описанной явно моделью), а также белок–белковых и ДНК–белковых взаимодействий. Авторы [20] предлагают следующую биологическую интерпретацию принятых аппроксимаций механизма взаимодействия: комплексы, составленные из связанных с Mdm2 молекул p53, вызывают деградацию p53 (по пути убиквитинирования) с постоянной скоростью, и, ввиду того что p53 активирует экспрессию гена Mdm2, скорость образования Mdm2 пропорциональна вероятности создания комплекса p53–Mdm2-ген, в котором могут участвовать только свободные молекулы p53. В [17, 21] можно найти результаты детального численного анализа решений системы из [20] в широком диапазоне параметров. В [21] численно показана связь решений этой модели с решениями системы ОДУ, построенной с применением предельной теоремы [19], детально проанализированы основные источники погрешностей, а также выполнен асимптотический анализ предельного перехода.

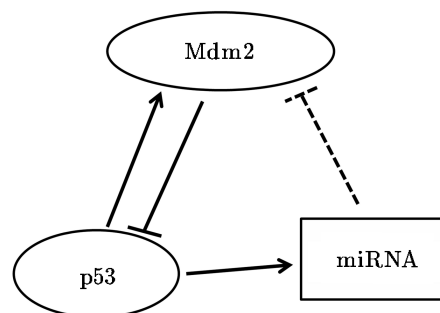
Главное достоинство модели из [20] состоит в том, что ее решения в широком диапазоне значений параметров имеют достаточно ясный медико–биологический смысл, качественно и количественно воспроизводят ряд весьма тонких экспериментальных фактов [20–22]. Поэтому она была принята за основу при создании простейшей модели динамики системы p53–Mdm2–miR [21], в которой микроРНК, находящиеся в прямой положительной зависимости от p53, пассивны по отношению к p53 и Mdm2 (рассматривается целый класс, а не конкретные микроРНК, потому что число конкретных видов p53-зависимых микроРНК весьма велико, а сами молекулы микроРНК, задействованные в сети p53–Mdm2, имеют различные функциональные связи с p53 и Mdm2 [16]). В [21] рассмотрены два подхода к моделированию. В рамках первого из них задача сводится к последовательному решению двух взаимосвязанных систем ОДУ большой размерности, включающих уравнения для промежуточных стадий передачи сигнала в системе p53–Mdm2 и в системе p53–miR соответственно. Второй подход, которому отдано предпочтение при проведении больших серий численных экспериментов, основан на использовании вместо указанных систем ОДУ дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом. Показано, что решение, полученное в рамках первого подхода, сходится к решению, полученному в рамках второго подхода (как для стационарных, так и для периодических решений) с ростом числа учитываемых промежуточных стадий. Там же представлена коллекция экспериментальных данных, сопоставление с которыми позволяет оценить адекватность аппроксимаций функций взаимодействия в рассматриваемой идеализированной системе и очертить границы применимости математической модели в целом. С применением модели динамики p53–Mdm2–miR выполнен детальный численный анализ решений в широком диапазоне параметров модели, продемонстрировавший некоторые наблюдаемые в экспериментах общие закономерности функционирования биологической системы в норме и при дерегуляции. На настоящем этапе исследований представляется целесообразным привлечение для такого анализа усовершенствованных вариантов модели [21].

Ниже представлена иерархия минимальных математических моделей функционирования системы p53–Mdm2–miR, приведены результаты анализа адекватности моделей, основанного на сопоставлении с экспериментальными данными, выполнен сравнительный анализ свойств численных решений моделей, а также предпринята попытка использования моделей для исследования общих закономерностей функционирования системы p53–miR. Последнее, как представляется, может оказаться полезным не только при определении стратегии проведения новых лабораторных исследований, но и с точки зрения

формирования более внимательного отношения к оценке р53-зависимых микроРНК как диагностических маркеров целого ряда серьезных заболеваний. Дополнительно будут представлены основанные на результатах численного анализа приближенные оценки (в рамках принятого подхода к моделированию) терапевтического потенциала микроРНК рассмотренного класса. Главное внимание уделяется анализу взаимосвязей в системе р53–miR.

## 1. Математические модели

При построении математических моделей используется тот же подход, что и в [21]. Речь идет в первую очередь о рассмотрении не конкретных микроРНК, а микроРНК, наделенных общим типом связи с участниками сети, находящихся под прямым положительным воздействием со стороны р53. Последним свойством объединены, в частности, одно из наиболее изученных семейств miR-34, а также miR-143/145, miR-221 и другие [8–16]. В связи с тем, что в целом ряде лабораторных экспериментов для тех же самых микроРНК ставится вопрос о степени их обратного влияния на р53 (см., например, исследование miR-34 в [12]), представленная ниже иерархия моделей будет включать также модели с более сложным типом биологической связи между р53 и микроРНК — положительной обратной связью, которая реализуется через негативное воздействие микроРНК на белок-ингибитор Mdm2. Схема взаимодействия представлена на рисунке 1. В качестве основных представлений функций взаимодействия использовались аппроксимации типа Гольдбетера–Кошланда с запаздывающими аргументами, которые в литературе сравниваются по чувствительности с функциями Хилла высокой степени.



**Рис. 1.** Схема рассматриваемых в математических моделях 1–4 (которые будут описаны ниже) биологических взаимосвязей. Стрелками с острыми концами показано положительное воздействие, стрелками с тупыми концами — отрицательное (ингибирующее) воздействие. Штриховой линией отмечена связь, значимость которой является предметом исследования

**Модель 1.** Для описания динамики р53–Mdm2–miR привлекается следующая нелинейная система уравнений с запаздывающими аргументами:

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

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

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

где взаимодействие белков определяется функциями

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

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

Здесь и ниже  $y_1, y_2, y_3$  — уровни р53, Mdm2 и микроРНК соответственно;  $a_1$  и  $c_1$  — константы скорости самопроизвольной генерации белка р53 и микроРНК;  $a_2$  — константа скорости деградации р53 посредством убиквитинирования;  $a_3, b_2, c_3$  — константы скорости распада р53, Mdm2 и микроРНК;  $b_1$  и  $c_2$  — константы скорости генерации Mdm2 и микроРНК в результате взаимодействия с р53;  $b_3$  — константа скорости деградации Mdm2, обусловленной воздействием микроРНК;  $k_f$  — константа диссоциации комплекса р53–Mdm2;  $k_g$  — константа диссоциации белка р53 и гена Mdm2;  $k_m$  — константа диссоциации Mdm2 и микроРНК; параметры  $\tau_1, \tau_2$  и  $\tau_3$  определяют время запаздывания реакции на сигналы в сети белков и микроРНК. Начальные данные задаются в следующем виде:

$$y_k(\theta) = \varphi_k(\theta), \quad k = 1, 2, 3, \quad \theta \in [-\tau, 0], \quad \tau = \max(\tau_1, \tau_2, \tau_3). \quad (6)$$

Согласно модели 1 микроРНК находятся в прямой положительной зависимости от р53 и одновременно оказывают отрицательное воздействие на Mdm2 (рис. 1). Для описания отрицательной обратной связи между белком р53 и его ингибитором Mdm2 использовался подход [20], основанный на аппроксимациях типа Гольдбетера–Кошланда (4) и Михаэлиса–Ментен (5). Как и в [20], уравнения моделей настоящей работы представляют собой балансные соотношения, отражающие динамику общих уровней белков и микроРНК или их активных форм (в зависимости от сути лабораторного эксперимента, для описания которого применяется модель).

**Модель 2.** Более простой вариант модели 1 характеризуется отсутствием связи микроРНК с Mdm2:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (7)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1)) - b_2 y_2(t), \quad (8)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 y_1(t - \tau_2) - c_3 y_3(t). \quad (9)$$

Вновь отметим, что данная модель детально обсуждалась в работах [18, 21, 22]. Наиболее полные исследования численных решений системы (7), (8), описывающей взаимодействие р53–Mdm2 без учета микроРНК, можно найти в [17, 21].

**Модель 3.** Она представляет собой вариант модели 2, в котором описание взаимодействия между р53 и микроРНК основано на аппроксимации типа Гольдбетера–Кошланда (4). Таким образом, модель 3 включает в себя уравнения (7) и (8), а уравнение динамики микроРНК имеет следующий вид:

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (10)$$

Здесь вводится дополнительный параметр  $k_p$  — константа диссоциации комплекса р53–miR. Использование модели 3 связано с необходимостью оценки адекватности аппроксимации, описывающей взаимодействие р53 и микроРНК, и тем самым полученных с применением моделей 1 и 2 результатов численного анализа.

**Модель 4.** Эта модель отличается от модели 1 только видом уравнения динамики микроРНК, которое совпадает с принятым для модели 3:

$$\frac{dy_1}{dt} = a_1 - a_2 f(y_1(t), y_2(t), k_f) - a_3 y_1(t), \quad (11)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = b_1 g(y_1(t - \tau_1), y_2(t - \tau_1)) - b_2 y_2(t) - b_3 f(y_2(t - \tau_3), y_3(t - \tau_3), k_m), \quad (12)$$

$$\frac{dy_3}{dt} = c_1 + c_2 f(y_1(t - \tau_2), y_3(t - \tau_2), k_p) - c_3 y_3(t). \quad (13)$$

Таким образом, модели 1 и 4 совпадают с моделями 2 и 3 соответственно, если положить  $b_3 = 0$ . При этом модель 4 представляет собой наиболее полный вариант модели из предложенной иерархии. Как и прежде, начальные условия задаются в виде (6), все параметры модели 4 входят также в модели 1–3, их смысл определен выше.

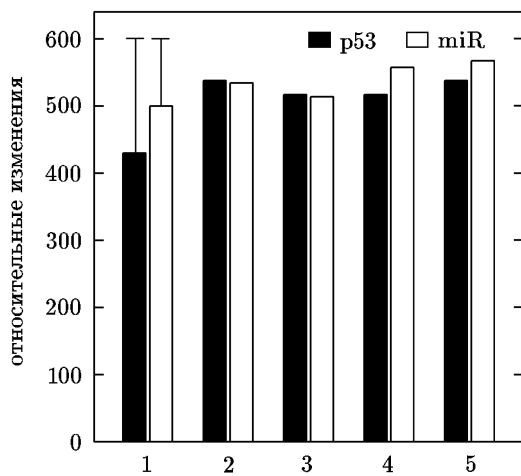
## 2. Численный алгоритм и методические расчеты

**Численный алгоритм.** Уравнения моделей 1–4 содержат функции с запаздывающими аргументами. Поэтому численное решение представленных систем уравнений основано на применении идеи метода шагов, который позволяет рассматривать функции с запаздывающими аргументами как известные, а возникающие задачи с начальными условиями — как задачи Коши для нелинейных систем ОДУ первого порядка, решаемые последовательно на интервалах времени, равных величине запаздывания  $\tau$ . На каждом из этих интервалов функции с запаздывающими аргументами заданы в узлах расчетной сетки (для этого шаг по времени  $h$  выбирался таким образом, чтобы величины запаздывания  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  и  $\tau_3$  были кратными  $h$ ), они определяются из начальных условий или из численного решения, полученного на предыдущем этапе реализации метода шагов. Такой подход позволяет привлечь к решению задач широко распространенные численные методы решения задачи Коши для системы ОДУ. На основании проведенных методических расчетов [17] для решения задач применялся метод предиктор–корректор 2-го порядка на сетке с разрешением 100 точек на 1 секунду. При проведении расчетов величины запаздывания  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  и  $\tau_3$  варьировались в диапазоне от 60 до 10000 секунд. Основные серии численных экспериментов, если это особо не оговорено, проводились при  $\tau_1 = 120$  с,  $\tau_2 = 70$  с,  $\tau_3 = 180$  с. Более подробно вопросы построения оптимального численного алгоритма обсуждаются в [17].

Численные эксперименты показали, что влияние начальных данных на численное решение моделей 1–4 проявляется на относительно небольших интервалах времени, поэтому определим начальные условия (6) функциями, тождественно равными нулю.

**Определение базального состояния биологической системы.** Вопрос об описании состояния нормы (или базального состояния, которому соответствуют параметры, отмеченные всюду ниже верхним индексом  $b$ ) имеет ключевое значение для дальнейшего анализа. Представляется целесообразным применить биологические соображения, ранее применявшиеся для модели 2 в работе [18]. Выбор значений параметров для уравнений динамики p53 и Mdm2 основан на известных экспериментальных данных [4] о характерных уровнях p53 и его ингибитора в норме и в условиях стресса, а также на рекомендациях из [20]. При определении параметров уравнений динамики микроРНК исходим в первую очередь из качественных оценок совместной динамики микроРНК и p53. В качестве “эталона” рассматриваются данные для наиболее изученного семейства

miR-34: из анализа функциональных проб дрожжевых культур [13] можно сделать предположение, что в норме молекулы miR-34a активируются в той же степени, что и p53 дикого типа; соответствующие иллюстрации можно видеть на рис. 2 (расчеты показали, что основные результаты данной работы справедливы и для тех микроРНК, которые демонстрируют более слабый отклик на активацию p53). Наконец, представляется естественным полагать, что базальное состояние динамической системы p53–Mdm2–miR не зависит от принятой математической модели, и поэтому соответствующие этому состоянию решения моделей 1–4 должны быть близкими независимо от числа учитываемых в моделях дополнительных связей (допускается отличие 15–20% в равномерной норме, что существенно превосходит вносимые всеми прочими источниками вычислительные погрешности, включая погрешности численного метода).



**Рис. 2.** Относительное изменение уровня микроРНК при активации p53: 1 – лабораторные данные [13]; 2 – модель 1; 3 – модель 2; 4 – модель 3; 5 – модель 4;  $a_1 = 11a_1^b$

Таким образом, будем полагать, что наблюдаемое *in vitro* базальное состояние p53 и микроРНК в рамках модели 1 достигается при следующих значениях параметров, которые будут определены как базальные:

$$\begin{aligned}
 a_1 &= a_1^b = 1 \frac{y.e.}{c}, & b_1 &= b_1^b = 1.005 \frac{y.e.}{c}, & c_1 &= c_1^b = 1 \frac{y.e.}{c}, \\
 a_2 &= a_2^b = 3 \cdot 10^{-2} c^{-1}, & b_2 &= b_2^b = 0.89 \cdot 10^{-2} c^{-1}, & c_2 &= c_2^b = 1 c^{-1}, \\
 a_3 &= a_3^b = 10^{-4} c^{-1}, & c_3 &= c_3^b = 1 c^{-1}, & b_3 &= b_3^b = 6 \cdot 10^{-4} c^{-1}, \\
 k_f &= k_f^b = 180 y.e., & k_g &= k_g^b = 28 y.e., & k_m &= k_m^b = 10 y.e.
 \end{aligned} \tag{14}$$

В моделях 2 и 3 в качестве базальных значений параметров уравнений (7), (8), описывающих взаимодействие белков p53–Mdm2, рассматриваются значения, представленные в [20]:

$$\begin{aligned}
 a_1 &= a_1^b = 1 \frac{y.e.}{c}, & b_1 &= b_1^b = 1 \frac{y.e.}{c}, \\
 a_2 &= a_2^b = 3 \cdot 10^{-2} c^{-1}, & b_2 &= b_2^b = 10^{-2} c^{-1}, \\
 a_3 &= a_3^b = 10^{-4} c^{-1}, & k_f &= k_f^b = 180 y.e., & k_g &= k_g^b = 28 y.e.
 \end{aligned} \tag{15}$$

Полагаем, что состояние нормального функционирования микроРНК достигается в модели 2 при следующих значениях:

$$c_1 = c_1^b = 1 \frac{y.e.}{c}, \quad c_2 = c_2^b = 1 c^{-1}, \quad c_3 = c_3^b = 1 c^{-1}. \tag{16}$$



В модели 3 в дополнение к (15) следует полагать

$$\begin{aligned} c_1 = c_1^b = 65 \frac{y.e.}{c}, \quad c_2 = c_2^b = 1.2 c^{-1}, \quad c_3 = c_3^b = 1.1 c^{-1}, \\ k_p = k_p^b = 50.4 y.e. \end{aligned} \quad (17)$$

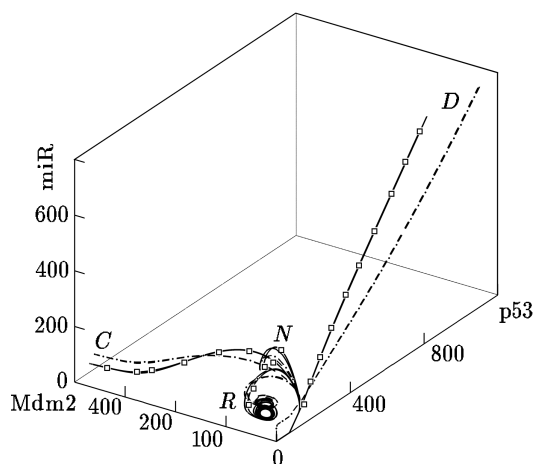
Базальные значения параметров, входящих в уравнения (11), (12) модели 4, совпадают с базальными значениями (14) модели 1, базальные значения параметров уравнения (13) — со значениями (17). В дальнейшем для краткости обозначения размерности параметров и переменных, кроме времени  $t$ , будут опускаться.

Для проведения дальнейшего анализа важно вновь обратить внимание на то, что в моделях 2 и 3 микроРНК пассивны по отношению к системе p53–Mdm2. В этом случае уравнения динамики p53 и Mdm2 (8), (9) представляют собой независимую математическую модель, обладающую интересными с точки зрения клинической практики решениями. Так, в [17, 21] показано, что эта система уравнений адекватно воспроизводит ситуацию резкого снижения уровня или активности p53 (далее будем упоминать ее как ситуацию  $C$  от *cancer*) и ситуацию с избыточным уровнем p53 (ситуацию  $D$  от *degeneration*). Важное значение имеют решения в виде периодических колебаний уровней p53 и Mdm2, описывающих наблюдаемый *in vitro* адекватный ответ данной динамической системы на относительно слабое повреждение ДНК или стресс (ситуация  $R$  от *response*). Ключевую роль играет базирующееся на результатах лабораторных измерений (см., например, [4, 20]) приближенное определение базального состояния системы p53–Mdm2 (ситуация  $N$  от *norm*), которое описывалось в начале данного пункта. Одна из задач настоящей работы — изучение поведения микроРНК в указанных характерных ситуациях. Наибольший интерес связан с выяснением условий, когда микроРНК заменяют p53 как маркер, по уровню которого ситуации  $C$ ,  $D$ ,  $R$  и  $N$  могут быть идентифицированы.

### 3. Оценка адекватности моделей

Выполнен численный анализ решений в широком диапазоне значений параметров математических моделей 1–4. На первом этапе проводилось поочередное варьирование параметров. Получено, что основная часть решений обладает аттракторами в виде неподвижных предельных точек, а при некоторых комбинациях параметров — в виде предельных циклов. Определены интервалы изменения параметров  $k_f$ ,  $k_g$  и  $\tau_1$ , когда решение теряет устойчивость (бифуркации Андронова–Хопфа). Так, при  $\tau_1 = 120$  с периодические решения получены для всех  $0 \leq k_f \leq 4.5$ , а при  $\tau_1 = 2400$  с — для всех  $0 \leq k_f \leq 26.28$  или  $439.6 \leq k_g \leq 658$  практически независимо от используемой модели. Кроме того, для моделей 1 и 4 переход на режим периодических колебаний наблюдается также при достаточно больших  $q = b_3/b_3^b$ , причем бифуркационные значения  $q$  зависят от значений  $\tau_3$  и  $k_m$ . В частности, для модели 1 бифуркация Андронова–Хопфа наблюдается при  $\tau_3 = 180$  с,  $b_3 = 25b_3^b$ ,  $k_m = 0.0835k_m^b$  или при  $\tau_3 = 2500$  с,  $b_3 = 15.403b_3^b$ ,  $k_m = 0.0104k_m^b$ ; для модели 4 — при  $\tau_3 = 180$  с,  $b_3 = 25b_3^b$ ,  $k_m = 0.0625k_m^b$ . Из численного анализа решений следует, что в этих ситуациях, по крайней мере, для параметров  $b_3$  и  $k_f$  бифуркации могут быть связаны с приближением к границам области применимости моделей, которые определяются стремлением к нулевым отметкам уровня Mdm2 или одновременно уровней Mdm2 и p53 соответственно. Расчеты с привлечением модели 4 показали схожие закономерности изменения решений при варьировании параметров  $b_3$ ,  $k_m$ ,  $\tau_3$ .

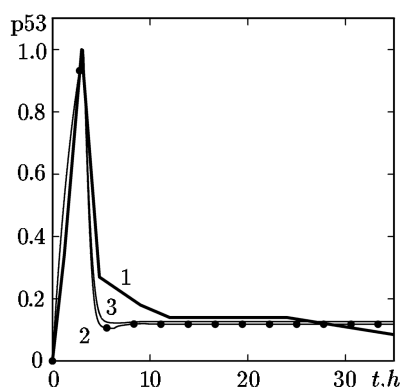
Отметим, что в ходе данной серии численных экспериментов главное внимание уделялось оценке способности каждой модели описать состояние нормального функционирования системы p53–Mdm2–miR (определенные выше ситуации  $N$  и  $R$ ), а также критические состояния  $C$  и  $D$ , характерные для большинства форм онкологических и нейродегенеративных заболеваний соответственно. В ходе численных экспериментов получено, что каждая из моделей 1–4 обладает множеством таких решений. На рис. 3 представлены примеры фазовых траекторий при  $b_2 = 0.1b_2^b$  (линии, соответствующие ситуации  $C$ ) или  $b_1 = 0.1b_1^b$  (линии, соответствующие ситуации  $D$ ). Видно также, что независимо от модели при базальных значениях параметров  $c_i$  поведение микроРНК аналогично p53: уровень микроРНК снижается относительно базального состояния вслед за p53 в ситуации  $C$  и, наоборот, резко возрастает в ситуации  $D$  чрезмерного роста p53. Запуск периодических колебаний микроРНК происходит при уменьшении параметра  $k_f$  (ситуация  $R$ ), который в рамках принятых математических моделей играет роль константы диссоциации в системе p53–Mdm2. Если рассматривать эти результаты с точки зрения оценки диагностического потенциала таких микроРНК, то, очевидно, можно говорить о достаточной близости полученных в расчете свойств микроРНК к свойствам p53 как биомаркера дегенеративных заболеваний (при условии нормального функционирования микроРНК, определяемого здесь базальными значениями параметров уравнений динамики микроРНК).



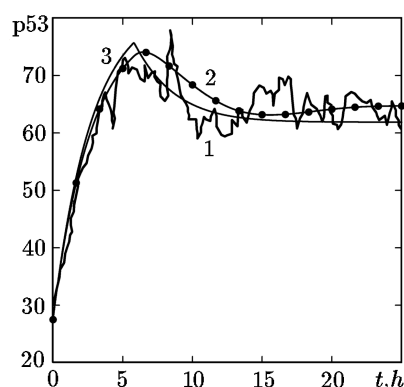
**Рис. 3.** Фазовый портрет решений в базальном состоянии  $N$  и ситуациях  $C$ ,  $D$ ,  $R$ : сплошные линии — модель 1, маркированные сплошные линии — модель 2, пунктирные линии — модель 3, штриховые линии — модель 4

На рис. 4 и рис. 5 показаны в сопоставлении измеренные *in vitro* и рассчитанные изменения уровня p53 в ситуациях  $C$  и  $D$ ; значения нормированы на максимум (рис. 4) или на величину, обеспечивающую согласование с экспериментом по начальным данным (рис. 5). Ситуация  $C$  на рис. 4 получена в экспериментах [23], где проводилось денситометрическое исследование уровней белков в культивируемых раковых клетках острого миелобластного лейкоза (клетки линии ML-1 с p53 дикого типа) в разные моменты времени после воздействия на клетку инфракрасным излучением. На этом же графике представлены в динамике численные решения, полученные с применением моделей 1–4 при  $\tau_1 = \tau_3 = 11300$  с и  $k_f = 10k_f^b$  (это соответствует достаточно часто наблюдаемым в лабораторных экспериментах условиям ослабления связи p53 и Mdm2 при стрессовом воздействии, а также объяснению механизма реакции на повреждение ДНК, данному в [23]). Можно видеть, что уровень p53 быстро возрастает и достигает пика примерно через 3 часа после облучения. Как и в [23], к 5 часам после повреждения уровень p53 снижается. Рисунок 5, напротив, иллюстрирует ситуацию  $D$  чрезмерно высокого уровня

p53 (более чем 6-кратное увеличение в сравнении с нормой), наблюдаемую в результате ингибирования белков-регуляторов p53 при дополнительной обработке клеток малыми молекулами (этопозид+нутлин), которая вызывает гибель раковых клеток линии MCF7 [24]. В этом случае расчеты демонстрируют существенно повышенный уровень p53 на фоне критически низкого уровня белка Mdm2 (снижение в 80 раз по сравнению с нормальным состоянием). В [24] отмечается, что резкий “обрыв” кривой p53 после 25 часов лабораторных наблюдений соответствует времени смерти клетки. В расчетах подобное динамическое поведение p53 получено при  $\tau_1 = 20800$  с,  $a_1 = 0.108 a_1^b$ ,  $b_1 = 0.03 b_1^b$ ,  $k_f = 0.08 k_f^b$ ,  $k_g = 37 k_g^b$  для моделей 1 и 4, а при  $\tau_1 = 20800$  с,  $a_1 = 0.09 a_1^b$ ,  $b_1 = 0.03 b_1^b$ ,  $k_f = 0.008 k_f^b$  для моделей 2 и 3. Эти вариации параметров соответствуют (в самом общем виде) условиям, созданным *in vitro*.

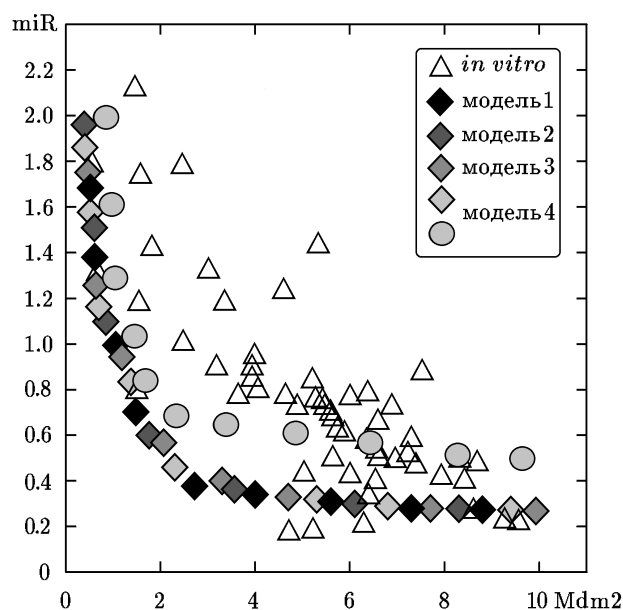


**Рис. 4.** Динамика уровня p53 в ситуации C: 1 — экспериментальные данные [23], 2 — модель 1, 3 — модели 2 и 3, маркеры — модель 4



**Рис. 5.** Динамика уровня p53 в ситуации D: 1 — экспериментальные данные [24], 2 — модель 1, 3 — модели 2 и 3, маркеры — модель 4

Для анализа адекватности моделей привлекались данные лабораторных экспериментов [14], в которых изучалось изменение уровня активации p53-зависимых микроРНК при стрессовом воздействии на p53. Рассматривались такие микроРНК, которые в [11, 14, 15] определяются и как отрицательные регуляторы Mdm2. С точки зрения математического моделирования ценность этих данных состоит в том, что они дают представление о наблюдаемом соотношении уровней Mdm2 и p53-зависимых микроРНК в норме и в условиях стресса. При этом в рамках рассматриваемой иерархии моделей можно судить о зависимости их состояний от степени негативного воздействия микроРНК на Mdm2. На рис. 6 относительные (по отношению к норме) изменения характерных значений решений моделей 1–4 удовлетворительно согласуются с экспериментальными данными. Видно, что в лабораторных экспериментах не менее чем 50% состояний системы miR–Mdm2 характеризуются повышенным в 4–10 раз уровнем Mdm2 при одновременном снижении уровня miR-143 (на 30% и более), а в численных экспериментах наблюдается несколько более выраженное уменьшение уровня микроРНК. Модели 1–4 дали весьма близкие результаты. Это может служить доводом в пользу допустимости игнорирования регуляторной функции микроРНК по отношению к Mdm2 и p53, по крайней мере для ряда конкретных наиболее изученных микроРНК (ниже этот вопрос будет рассмотрен более подробно). Вместе с тем видно, что при усилении связи miR–Mdm2 за счет изменения параметров  $b_3$  и  $k_m$  (на рис. 6 можно видеть данные, полученные по модели 4 при  $b_3 = 22 b_3^b$ ,  $k_m = 30 k_m^b$ ) удается получить несколько иное соотношение микроРНК и Mdm2 и, как представляется, чуть лучшее согласование с экспериментальными данными.



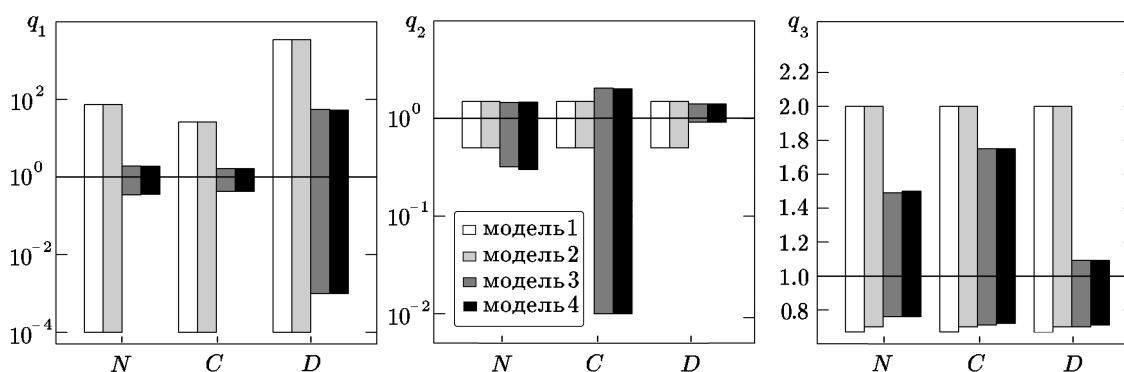
**Рис. 6.** Относительное изменение стационарных уровней Mdm2 и микроРНК в моделях 1–4: ромбы — решения при варьировании параметров  $b_1$  и  $b_2$ ; круги — решения при одновременном варьировании параметров  $b_3$ ,  $k_m$  и  $b_1$  или  $b_2$ ; треугольники — экспериментальные данные [14] для miR-143 в культивируемых клетках карциномы

Дополнительно отметим, что в [18, 22] выполнен анализ адекватности модели 2 с привлечением более широкого набора лабораторных экспериментов (в том числе в [12, 13]), в которых исследовалась способность различных p53-зависимых микроРНК активироваться в ответ на активацию p53. Подобные сопоставления были проведены также для моделей 1, 3 и 4 (некоторые результаты можно видеть на рис. 2). Полученные в настоящих расчетах данные свидетельствуют о том, что в рамках принятых математических моделей может быть численно воспроизведена трансактивация p53-зависимых микроРНК, причем в достаточно широком (до 500 раз) диапазоне изменения уровней p53 и микроРНК. Усложнение модели 2 не приводит к существенному изменению наблюдаемой в расчетах динамики комплекса p53–Mdm2–miR: при использовании более сложной аппроксимации слагаемого, описывающего связь p53 с микроРНК (модель 3), а также при учете связи микроРНК с Mdm2 (модели 1 и 4) в достаточно широком диапазоне параметров  $b_3$  и  $k_m$  получены весьма близкие результаты, согласующиеся с экспериментальными данными об относительных изменениях микроРНК в ответ на изменение p53 (зависимость последнего результата от параметров  $b_3$  и  $k_m$  в дальнейшем будет уточняться).

#### 4. Результаты численных экспериментов

**Дерегуляция микроРНК как фактор диагностики и терапии.** Результаты самого широкого круга лабораторных и клинических наблюдений свидетельствуют о возможной дерегуляции, т. е. сбоях микроРНК и влиянии этих процессов на развитие различных, в том числе онкологических, заболеваний [25, 26]. При постановке численных экспериментов предполагалось, что в рамках принятых моделей дерегуляция микроРНК может быть обусловлена исключительно изменениями p53 или Mdm2 (ситуации *C* и *D* рассматривались в предыдущем пункте), нарушениями функционирования самих микроРНК и их прямой связи с p53 или суммарным воздействием этих сбоях. В настоящем пункте основное внимание будет сосредоточено на двух последних вариантах.

В данной серии численных экспериментов дерегуляция микроРНК моделировалась как отклонение параметров  $c_k = q_k c_k^b$  ( $k = 1, 2, 3$ ) и  $k_p$  от базальных значений. На рис. 7 представлены полученные в расчетах интервалы значений  $q_k$  ( $k = 1, 2, 3$ ), при которых динамическое поведение и характерный уровень микроРНК с 50-процентной точностью соответствует (в том же смысле, что на рис. 3) состоянию р53 в ситуациях  $N$ ,  $C$ ,  $D$ . Эта достаточно усредненная оценка границы “нормы” основана на анализе данных клинических и лабораторных измерений (см., например, [13]), в которых уровень микроРНК в клетках разных форм рака может составлять от 20% до 80% от уровня в нормальной ткани (в то же время для многих других микроРНК изменение уровней в раковых клетках может быть существенно более значительным). Видно, что все разработанные модели демонстрируют весьма высокую чувствительность к варьированию параметров  $c_k$  (несколько более широкий диапазон изменения  $q_1$  обусловлен, в значительной мере, особенностями принятой аппроксимации соответствующих слагаемых в уравнениях динамики р53 и микроРНК). Отметим также, что для моделей 3 и 4 во всех ситуациях, кроме  $D$ , для параметра  $k_p$  выявлен наиболее широкий диапазон допустимых изменений значений, при которых сохраняются согласующиеся с р53 показатели уровня микроРНК.



**Рис. 7.** Интервалы изменений параметров  $c_1 = q_1 c_1^b$ ,  $c_2 = q_2 c_2^b$ ,  $c_3 = q_3 c_3^b$ , при которых состояние микроРНК согласуется с состоянием р53 в ситуациях  $N$ ,  $C$ ,  $D$ ;  $b_3 = b_3^b$

Таким образом, на основании анализа численных решений моделей 1–4 могут быть даны следующие оценки диагностического потенциала р53-зависимых микроРНК: в норме микроРНК “дублируют” поведение р53 и поэтому могут претендовать на роль маркеров критических ситуаций и соответствующих им дегенеративных заболеваний, по-существу, заменяя р53. Однако за счет сбоя в функционировании микроРНК или на участке сети miR–р53 возможна существенная дерегуляция микроРНК даже при нормальном функционировании комплекса р53–Mdm2. При этом достигаются “экстремальные” значения микроРНК, чаще не соответствующие уровню р53, что существенным образом влияет на точность диагностики заболевания на основе микроРНК, а с другой стороны, позволяет рассматривать микроРНК как потенциальную самостоятельную мишень для терапевтического воздействия.

Дополнительно может быть поставлен вопрос о терапевтической значимости дерегуляции микроРНК, которая, в частности, могла бы стать инструментом для восстановления нарушенной функции р53-зависимого апоптоза за счет перехода микроРНК из состояний  $C$  или  $D$  к состоянию нормы. Расчеты показали, что в рамках принятых моделей при резком повышении уровня р53 (ситуация  $D$ ) уменьшение скорости генерации микроРНК (параметр  $c_1$ ) не позволяет восстановить нормальный уровень микроРНК. Напротив, как отмечалось выше, “допустимые” изменения параметров  $c_2$ ,  $c_3$  определя-

ются достаточно узким диапазоном значений  $q_k$ , а при выходе из этого диапазона наблюдается рассогласованность в динамике p53 и p53-зависимых микроРНК (рис. 7 и рис. 8). Например, для модели 1 в ситуации  $C$ , характеризующей состояние p53 и Mdm2, при  $c_1 = 95 c_1^b$ ,  $c_2 = 2.8 c_2^b$  или  $c_3 = 0.36 c_3^b$  уровень микроРНК близок к значению, наблюдаемому в ситуации нормы  $N$ . Следует отметить, что этот результат показывает возможность следующего благоприятного с биомедицинской точки зрения сценария: если микроРНК стремятся к базальному уровню, то при наличии собственной проапоптозной функции, независимой от p53, микроРНК могут способствовать нормализации процесса гибели клеток. Аналогичные результаты “терапевтического” воздействия получены для всех рассмотренных моделей 1–4. Отметим также, что в обсуждаемых случаях даже наиболее существенные изменения уровней микроРНК при их дерегуляции (на фоне нормального взаимодействия miR–Mdm2) не привели к сколько-нибудь заметным изменениям в динамике p53.

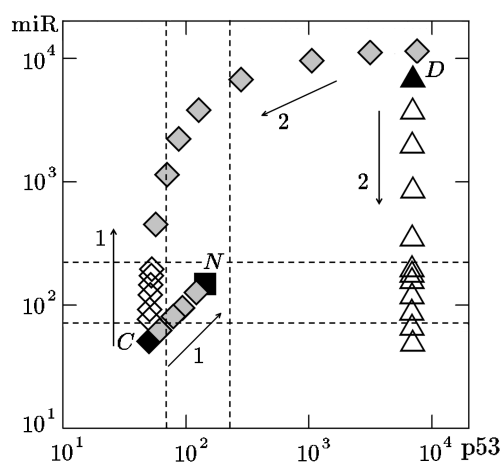
**Оценка роли отрицательной связи микроРНК с Mdm2.** Согласно постановке задачи главным отличием моделей 1 и 4 от моделей 2 и 3 является учет отрицательного воздействия микроРНК на Mdm2, которое обеспечивает положительную обратную связь микроРНК с p53. Ключевыми параметрами, регулирующими эту связь, являются  $b_3$ ,  $k_m$  и  $\tau_3$ . В описанных выше численных экспериментах влияние отрицательного воздействия микроРНК на Mdm2 практически не проявилось. Однако актуальность этой проблемы подтверждается целым рядом биомедицинских исследований. Так, в последнее десятилетие оценки степени обратного влияния miR-34 (miR-34a/b/c) на p53 претерпевали изменения — от полного отрицания до установления связи через сети белков, являющихся мишенью miR-34 [12]. Поэтому представляется интересным проанализировать наиболее общие закономерности функционирования этой связи в рамках моделей 1–4. Более конкретно задача данного пункта формулируется так: требуется уточнить ответ на вопрос о том, могут ли (в рамках принятых моделей) микроРНК изменить “показатели” белка p53 за счет подавления Mdm2.

Уже по итогам ранее представленных численных экспериментов по дерегуляции микроРНК (рис. 7) можно видеть, что в рамках принятых моделей при наличии нормальной связи miR–Mdm2 ( $b_3 = b_3^b$ ,  $k_m = k_m^b$ ) наиболее значимые отличия результатов расчетов обусловлены не введением дополнительной связи микроРНК с Mdm2, как того можно было ожидать, а усовершенствованием аппроксимации функции взаимодействия для комплекса p53–miR. Детальная оценка функционирования системы p53–Mdm2 с применением моделей 1 и 4 показала, что если изменения  $c_k$  приводят к менее чем 50% изменению микроРНК (рис. 7), то соответствующие изменения уровней p53 и Mdm2 составляют не более 2% в равномерной норме от уровней белков, полученных при базальных  $c_k = c_k^b$ . Даже при более существенном нарушении функционирования микроРНК (вплоть до достижения критически высоких или низких уровней микроРНК) уровни p53 и Mdm2 изменялись не более чем на 15%. Таким образом, результаты анализа численных решений моделей 1 и 4 подтверждают справедливость принятого в моделях 2 и 3 предположения о слабом влиянии связи микроРНК с Mdm2 на функционирование комплекса p53–Mdm2–miR в целом, если только эта связь не становится доминирующей. Расчеты показали также, что варьирование параметра  $k_m = qk_m^b$  в широком диапазоне значений ( $10^{-6} \leq q \leq 10^6$ ) не приводит к существенному усилению влияния микроРНК на p53.

Наибольший интерес представляют решения, полученные при увеличении параметра  $b_3$  относительно базального (14), которые демонстрируют ярко выраженную доминирующую роль связи miR–Mdm2 (рис. 8). Так, в ситуации нормы ( $N$ ) при  $b_3 > 8.5 b_3^b$  и в ситуации низкого уровня p53 ( $C$ ) при  $b_3 > 10 b_3^b$  уровень белков p53 и Mdm2 может

изменяться в пределах от 50 до 400 процентов. При этом, в частности, возможно полное восстановление нормального функционирования системы p53–Mdm2–miR. Так, в рамках модели 1 через увеличение  $b_3$  в ситуации  $C$  можно нормализовать не только уровень микроРНК, но и уровень p53. А при одновременном изменении параметров  $b_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) и  $c_2$  возможен переход из  $C$  в ситуацию  $D$  сверхвысокого уровня микроРНК и p53.

**Рис. 8.** Фазовый портрет стационарных состояний, иллюстрирующий “терапевтическое” воздействие в критических ситуациях  $C$  (ромбы) и  $D$  (треугольники): полые маркеры — воздействие на микроРНК (варьирование  $c_k$ ); серые — усиление связи miR–Mdm2 (варьирование  $b_3$ ); черные — без воздействия; штриховыми линиями выделены области нормы для p53 и микроРНК. Стрелками показаны направления эффективной терапии при раке (1) и нейродегенерации (2). Модель 1



Таким образом, в рамках принятых моделей 1 и 4 при достаточно слабой связи в широком диапазоне значений  $b_3$  (при увеличении  $b_3$  не более чем на порядок по отношению к  $b_3^0$ ) обратным воздействием микроРНК на сеть p53–Mdm2 можно пренебречь (этот вариант реализуется в рамках моделей 2 и 3). При усилении обратной связи микроРНК с Mdm2 в системе доминирующую роль начинает играть положительная обратная связь p53–miR. Это может приводить, в определенном смысле, к синергическому эффекту, результатом которого является существенный одновременный рост уровней или активности p53 и микроРНК. Данная ситуация может быть связана с возможностью запуска программы массовой апоптотической клеточной смерти для терапевтического воздействия на раковые клетки (дефектные по p53), если только микроРНК, как и p53, обладают собственной функцией регулятора апоптоза.

Важно отметить, что обсуждаемые в настоящем пункте эффекты наблюдались в лабораторных экспериментах *in vitro* и *in vivo* для целого ряда систем. Так, механизм гиперактивации сигнального пути p53 обнаружен в [27] для взаимодействующих по принципу положительной обратной связи белков p73, p53 и Egr1\*. В [28, 29] проводилась оценка проапоптотического пути miR-34a–SIRT1–p53 (SIRT1 подобен по характеру связи белку Mdm2, он известен как негативный регулятор активности p53) в клетках печени крысы, а также при неалкогольной жировой болезни этого органа и в легочной ткани у курильщиков и пациентов с ХОБЛ. В [30] у пациентов с ХОБЛ обнаружена инициация механизмов старения в эпителиальных клетках по следующему сценарию: окислительный стресс вызывает активацию молекул miR-34a, которые через посредника PI3K $\alpha$  уменьшают экспрессию SIRT1, что приводит к гиперактивации p53. В [31] на основе анализа литературных источников и собственных лабораторных исследований (с клетками рака молочной железы линии MCF7) для p53 и микроРНК идентифицированы сразу три класса контуров положительной обратной связи. Здесь же представлена математическая модель, по уровню детализации биологических взаимосвязей существенно превосходящая модели 1–4 (модель в [31] имеет размерность пространства состояний  $n = 22$ ).

\* Авторы благодарят д.б.н. П.Д. Лисачева, обратившего наше внимание на данный эффект.

В численных экспериментах [31] показано затухание периодических колебаний уровня p53 под влиянием негативного влияния микроРНК на белок-ингибитор, что хорошо согласуется с предсказаниями минимальных моделей настоящей работы. Таким образом, расчеты демонстрируют наличие регуляторной функции микроРНК по отношению к p53, что согласуется с известными представлениями о роли микроРНК в биологических процессах.

## Заключение

В работе предложена иерархия минимальных математических моделей, предназначенных для анализа общих закономерностей взаимодействия супрессора опухолей белка p53 и молекул микроРНК, находящихся в положительной зависимости от p53. Адекватность принятых математических моделей и результатов численного анализа подтверждается согласием с известными данными клинических и лабораторных исследований. По результатам численных экспериментов очерчены границы применимости моделей.

Выполнены численные исследования, позволяющие уже на уровне минимальных математических моделей продемонстрировать некоторые особенности функционирования рассмотренной динамической системы. В частности, даны оценки надежности микроРНК как факторов диагностики онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Согласно расчетам при дерегуляции микроРНК с прямой или обратной положительной связью с p53 с большой вероятностью может наблюдаться серьезное рассогласование в диагностике апоптоз-зависимых дегенеративных заболеваний, если эта диагностика основана на анализе уровней p53 и зависимых от него микроРНК.

При проведении численных экспериментов в центре внимания находился вопрос о значимости для всей биологической системы отрицательного воздействия микроРНК на белок, являющийся ингибитором p53. В рамках принятых моделей показано, что негативное воздействие микроРНК на белок-ингибитор может быть достаточно слабым, не вызывая обратной реакции p53. Вместе с тем найдены условия, при которых в полной мере проявляется регуляторная функция микроРНК по отношению к p53, что согласуется с известными представлениями о роли микроРНК в биологических процессах.

Рассмотрен вопрос о терапевтической значимости дерегуляции микроРНК, которая за счет перехода микроРНК и p53 из критического состояния, связанного с риском рака, к более благоприятным состояниям могла бы стать инструментом для восстановления или даже гиперактивации функции апоптоза. В рамках принятых моделей этот процесс является обратимым. Это означает, что равновозможен и процесс искусственного ингибирования p53-зависимого апоптоза как вариант терапии при болезнях Паркинсона, Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях.

## Литература

1. Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. p53 — инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41, № 6. — С. 947–963.
2. Lane D., Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. — 2010. — Vol. 2, № 12. — (a000893). — DOI: 10.1101/cshperspect.a000893.
3. Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh. et al. Oscillations and variability in the p53 system // Molecular Systems Biology. — 2006. — Vol. 2, № 1. — (2006.0033). — DOI: 10.1038/msb4100068.



4. **Batchelor E., Mock C.S., Bhan I., Loewer A., Lahav G.** Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage // *Molecular Cell*.— 2008.— Vol. 30, № 3.— P. 277–289.
5. **Toettcher J.E., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** A synthetic–natural hybrid oscillator in human cells // *PNAS*.— 2010.— Vol. 107, № 39.— P. 17047–17052.
6. **Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C. et al.** p53 dynamics control cell fate // *Science*.— 2012.— Vol. 336, iss. 6087.— P. 1440–1444.
7. **Paek A.L., Liu J.C., Loewer A., Forrester W.C., Lahav G.** Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing // *Cell*.— 2016.— Vol. 165, № 3.— P. 631–642.
8. **Goeman F., Strano S., Blandino G.** MicroRNAs as key effectors in the p53 network // *Int. Review of Cell and Molecular Biology*. / L. Galluzzi and I. Vitale.— Academic Press, 2017.— Vol. 333: MiRNAs in Differentiation and Development.— P. 51–91.
9. **Hermeking H.** MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumor suppression // *Nature reviews cancer*.— 2012.— Vol. 12, № 9.— P. 613–626.
10. **Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А. и др.** МикроРНК, эволюция и рак // *Цитология*.— 2013.— Т. 55, № 3.— С. 159–164.
11. **Rokavec M., Li H., Jiang L., Hermeking H.** The p53/microRNA connection in gastrointestinal cancer // *Clinical and experimental gastroenterology*.— 2014.— Vol. 7.— P. 395–413.
12. **Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E. et al.** Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis // *Molecular Cell*.— 2007.— Vol. 26.— P. 731–743.
13. **Bisio A., Sanctis V., Vescovo V. et al.** Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis // *BMC Cancer*.— 2013.— Vol. 13, № 552.— DOI: 10.1186/1471-2407-13-552.
14. **Zhang J., Sun Q., Zhang Z. et al.** Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the Mdm2–p53 feedback loop // *Oncogene*.— 2013.— Vol. 32, № 1.— P. 61–69.
15. **Fornari F., Milazzo M., Galassi M. et al.** p53/Mdm2 feedback loop sustains miR-221 expression and dictates the response to anticancer treatments in hepatocellular carcinoma // *Molecular Cancer Research*.— 2014.— Vol. 12, № 2.— P. 203–216.
16. **Luo Z., Cui R., Tili E., Croce C.** Friend or Foe: MicroRNAs in the p53 network // *Cancer Letters*.— 2018.— Vol. 419.— P. 96–102.
17. **Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И., Непомнящих Л.М., Сенчукова С.Р.** Математическое моделирование функционирования и регуляции биологической системы p53–Mdm2.— М.: РАМН, 2014.
18. **Воропаева О.Ф., Сенотрусова С.Д., Шокин Ю.И.** Дерегуляция p53-зависимых микроРНК: результаты математического моделирования // *Математическая биология и биоинформатика*.— 2017.— Т. 12, № 1.— С. 151–175.
19. **Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Демиденко Г.В., Матушкин Ю.Г.** Моделирование уравнением с запаздывающим аргументом многостадийного синтеза без ветвления // *Сиб. журн. индустр. матем.*— 2004.— Т. 7, № 1.— С. 73–94.
20. **Tiana G., Jensen M.H., Sneppen K.** Time delay as a key to apoptosis induction in the p53 network // *Eur. Phys. J. B*.— 2002.— № 29.— P. 135–140.
21. **Воропаева О.Ф., Сенотрусова С.Д.** Переход от уравнения с запаздыванием к системе обыкновенных дифференциальных уравнений в модели сети онкомаркеров // *Математическое моделирование*.— 2017.— Т. 29, № 9.— С. 135–154.
22. **Voropaeva O.F., Senotrusova S.D., Shokin Y.I.** Numerical investigation of diagnostic properties of p53-dependent microRNAs // *RJNAMM*.— 2017.— Vol. 32, № 3.— P. 203–213.

23. **Chen C.Y., Oliner J.D., Zhan Q. et al.** Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway // Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1994. — Vol. 91, № 7. — P. 2684–2688.
24. **Yang R., Huang B., Zhu Y. et al.** Variable sensitivity to DNA damaging chemotherapeutic modulated by cell type-dependent bimodal p53 dynamics // bioRxiv. — URL: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/06/12/149013>.
25. **Iorio M.V., Visone R., Leva G. et al.** MicroRNA signatures in human ovarian cancer // Cancer Res. — 2007. — Vol. 67. — P. 8699–8707.
26. **Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Ледин Е.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д.** Оценка эффективности p53-зависимой системы сохранения стабильности генома по содержанию микроРНК и мРНК в крови онкологических больных // Медицинская радиология и радиационная безопасность. — 2015. — Т. 60, № 1. — С. 5–14.
27. **Yu J., Baron V., Mercola D., Mustelin T., Adamson E.D.** A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells // Cell Death and Differentiation. — 2007. — Vol. 14. — P. 436–446.
28. **Castro R.E., Ferreira D.M.S., Afonso M.B. et al.** 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 // J. Hepatology. — 2013. — Vol. 58, iss. 1. — P. 119–125.
29. **Kato R., Mizuno Sh., Kadowaki M. et al.** Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease // Respiratory Research. — 2016. — Vol. 17, № 139. — (PMC5081972).
30. **Baker J.R., Vuppusetty C., Colley T. et al.** Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K $\alpha$  reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells // Scientific Reports. — 2016. — Vol. 6. — (35871; PMC5073335).
31. **Moore R., Ooi H.K., Kang T., Bleris L., Ma L.** MiR-192-mediated positive feedback loop controls the robustness of stress-induced p53 oscillations in breast cancer cells // PLoS Comput. Biol. — 2015. — Vol. 11, № 12. — (e1004653; PMC4671655).

*Поступила в редакцию 3 июля 2018 г.*

*После исправления 2 октября 2018 г.*

*Принята к печати 7 мая 2019 г.*

### Литература в транслитерации

1. **Almazov V.P., Kochetkov D.V., Chumakov P.M.** p53 — instrument dlya terapii zlokachestvennyh zabolevanij cheloveka // Molekulyarnaya biologiya. — 2007. — Т. 41, № 6. — С. 947–963.
2. **Lane D., Levine A.** p53 Research: the past thirty years and the next thirty years // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. — 2010. — Vol. 2, № 12. — (a000893). — DOI: 10.1101/cshperspect.a000893.
3. **Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh. et al.** Oscillations and variability in the p53 system // Molecular Systems Biology. — 2006. — Vol. 2, № 1. — (2006.0033). — DOI: 10.1038/msb4100068.
4. **Batchelor E., Mock C.S., Bhan I., Loewer A., Lahav G.** Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage // Molecular Cell. — 2008. — Vol. 30, № 3. — P. 277–289.
5. **Toettcher J.E., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** A synthetic–natural hybrid oscillator in human cells // PNAS. — 2010. — Vol. 107, № 39. — P. 17047–17052.
6. **Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C. et al.** p53 dynamics control cell fate // Science. — 2012. — Vol. 336, iss. 6087. — P. 1440–1444.

7. **Paek A.L., Liu J.C., Loewer A., Forrester W.C., Lahav G.** Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing // *Cell*.— 2016.— Vol. 165, № 3.— P. 631–642.
8. **Goeman F., Strano S., Blandino G.** MicroRNAs as key effectors in the p53 network // *Int. Review of Cell and Molecular Biology*. / L. Galluzzi and I. Vitale.— Academic Press, 2017.— Vol. 333: MiRNAs in Differentiation and Development.— P. 51–91.
9. **Hermeking H.** MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumor suppression // *Nature reviews cancer*.— 2012.— Vol. 12, № 9.— P. 613–626.
10. **Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veryaskina Yu.A. i dr.** MikroRNK, evolyuciya i rak // *Citologiya*.— 2013.— T. 55, № 3.— S. 159–164.
11. **Rokavec M., Li H., Jiang L., Hermeking H.** The p53/microRNA connection in gastrointestinal cancer // *Clinical and experimental gastroenterology*.— 2014.— Vol. 7.— P. 395–413.
12. **Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E. et al.** Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis // *Molecular Cell*.— 2007.— Vol. 26.— P. 731–743.
13. **Bisio A., Sanctis V., Vescovo V. et al.** Identification of new p53 target microRNAs by bioinformatics and functional analysis // *BMC Cancer*.— 2013.— Vol. 13, № 552.— DOI: 10.1186/1471-2407-13-552.
14. **Zhang J., Sun Q., Zhang Z. et al.** Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the Mdm2–p53 feedback loop // *Oncogene*.— 2013.— Vol. 32, № 1.— P. 61–69.
15. **Fornari F., Milazzo M., Galassi M. et al.** p53/Mdm2 feedback loop sustains miR-221 expression and dictates the response to anticancer treatments in hepatocellular carcinoma // *Molecular Cancer Research*.— 2014.— Vol. 12, № 2.— P. 203–216.
16. **Luo Z., Cui R., Tili E., Croce C.** Friend or Foe: MicroRNAs in the p53 network // *Cancer Letters*.— 2018.— Vol. 419.— P. 96–102.
17. **Voropaeva O.F., Shokin Yu.I., Nepomnyaschih L.M., Senchukova S.R.** Matematicheskoe modelirovanie funkcionirovaniya i regulyacii biologicheskoy sistemy p53–Mdm2.— M.: RAMN, 2014.
18. **Voropaeva O.F., Senotrusova S.D., Shokin Yu.I.** Derogulyaciya p53-zavisimyh mikroRNK: rezul'taty matematicheskogo modelirovaniya // *Matematicheskaya biologiya i bioinformatika*.— 2017.— T. 12, № 1.— S. 151–175.
19. **Lihoshvai V.A., Fadeev S.I., Demidenko G.V., Matushkin Yu.G.** Modelirovanie uravneniem s zapazdyvayuschim argumentom mnogostadijnogo sinteza bez vetvleniya // *Sib. zhurn. industr. matem.*— 2004.— T. 7, № 1.— S. 73–94.
20. **Tiana G., Jensen M.H., Sneppen K.** Time delay as a key to apoptosis induction in the p53 network // *Eur. Phys. J. B*.— 2002.— № 29.— P. 135–140.
21. **Voropaeva O.F., Senotrusova S.D.** Perekhod ot uravneniya s zapazdyvaniem k sisteme obyknovennykh differencial'nykh uravnenii v modeli seti onkomarkerov // *Matematicheskoe modelirovanie*.— 2017.— T. 29, № 9.— S. 135–154.
22. **Voropaeva O.F., Senotrusova S.D., Shokin Y.I.** Numerical investigation of diagnostic properties of p53-dependent microRNAs // *RJNMM*.— 2017.— Vol. 32, № 3.— P. 203–213.
23. **Chen C.Y., Oliner J.D., Zhan Q. et al.** Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway // *Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America*.— 1994.— Vol. 91, № 7.— P. 2684–2688.
24. **Yang R., Huang B., Zhu Y. et al.** Variable sensitivity to DNA damaging chemotherapeutic modulated by cell type-dependent bimodal p53 dynamics // *bioRxiv*.— URL: <https://www.biorxiv.org/content/early/2017/06/12/149013>.

25. **Iorio M.V., Visone R., Leva G. et al.** MicroRNA signatures in human ovarian cancer // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 8699–8707.
26. **Shulenina L.V., Mihailov V.F., Ledin E.V., Raeva N.F., Zasukhina G.D.** Ocenka effektivnosti r53-zavisimoi sistemy sohraneniya stabil'nosti genoma po sodержaniyu mikroRNK i mRNK v krovi onkologicheskikh bol'nyh // *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost'*. — 2015. — Т. 60, № 1. — S. 5–14.
27. **Yu J., Baron V., Mercola D., Mustelin T., Adamson E.D.** A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells // *Cell Death and Differentiation.* — 2007. — Vol. 14. — P. 436–446.
28. **Castro R.E., Ferreira D.M.S., Afonso M.B. et al.** 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 // *J. Hepatology.* — 2013. — Vol. 58, iss. 1. — P. 119–125.
29. **Kato R., Mizuno Sh., Kadowaki M. et al.** Sirt1 expression is associated with CD31 expression in blood cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Respiratory Research.* — 2016. — Vol. 17, № 139. — (PMC5081972).
30. **Baker J.R., Vuppusetty C., Colley T. et al.** Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K $\alpha$  reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells // *Scientific Reports.* — 2016. — Vol. 6. — (35871; PMC5073335).
31. **Moore R., Ooi H.K., Kang T., Bleris L., Ma L.** MiR-192-mediated positive feedback loop controls the robustness of stress-induced p53 oscillations in breast cancer cells // *PLoS Comput. Biol.* — 2015. — Vol. 11, № 12. — (e1004653; PMC4671655).