

Математическое моделирование функционирования сигнального пути p53 при повреждении ДНК.

II. Активация системы p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Вах под влиянием γ -облучения

О. Ф. Воропаева^{1,*}, К. С. Гаврилова^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, 630090, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, Россия

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

Поступила 30 августа 2021 г., принята в печать 21 октября 2021 г.

Разработана новая математическая модель динамики процесса активации ключевого сегмента проапоптозного сигнального пути p53 при повреждении ДНК, вызванном облучением клетки. В качестве основы используется хорошо изученная модель функционирования системы белков p53–Mdm2–Wip1. Главное внимание уделяется решению задачи структурной и параметрической идентификации уравнений динамики уровней белков p21, Araf1 и Вах — белков-мишеней p53, которые обеспечивают клеточный ответ на повреждение ДНК. Адекватность разработанной модели подтверждается сопоставлением с экспериментальными данными, а также результатами моделирования известных противораковых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: математическая модель, p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Вах, дифференциальные уравнения с запаздыванием, обратная коэффициентная задача, генетический алгоритм, валидация, сравнение с лабораторным экспериментом, противораковые терапевтические стратегии.

Цитирование: Воропаева О.Ф., Гаврилова К.С. Математическое моделирование функционирования сигнального пути p53 при повреждении ДНК. II. Активация системы p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Вах под влиянием γ -облучения. Вычислительные технологии. 2022; 27(1):4–20. DOI:10.25743/ICT.2022.27.1.002.

Введение

Клеточная реакция на повреждение ДНК, вызванное внутренними или внешними стрессовыми факторами, включает в себя выраженные биохимические и/или морфологические изменения, которые могут быть связаны как с восстановлением, так и с гибелью клетки. Эта реакция находится под управлением сложной системы сигнальных белков: клетки используют эффективно и точно контролируемый сигнальный путь (систему белковых молекул) для восприятия информационного сигнала о повреждении и, что важно, для реагирования на этот сигнал [1].

Среди множества участвующих в организации клеточного ответа факторов — белок p53, его отрицательные регуляторы (Mdm2, Wip1 и др.), а также некоторые белки-мишени p53. Они образуют ключевое звено сигнального пути p53 и признаются решающими для регуляции сразу нескольких программ клеточного ответа. Известно, что динамическое поведение опухолевого супрессора белка p53 изменяется под влиянием сигнала о стрессовом повреждении: система реагирует на повреждение и передает сигнал для активации p53 и снижения уровня Mdm2, а последнее способствует повышению уровня p53. В то же время активация p53 способствует и активации его ингибиторов, в том числе Mdm2 и Wip1. Сложные взаимодействия p53 и каждого из его ингибиторов характеризуются как петля отрицательной обратной связи [1–7]. Одним из главных следствий активации p53 является также изменение экспрессии регулируемых им генов и активация ряда белков-мишеней p53, таких как Bax, Bcl2, p21, которые, с одной стороны, влияют на остановку клеточного цикла, а с другой — участвуют в запуске каскада апоптозных реакций. В результате клетка, в которой уже произошли или только могут произойти генетические изменения, либо погибнет в результате индукции апоптоза, либо остановится в одной из фаз клеточного цикла, обеспечивая условия для восстановления нативной структуры ДНК.

Вопрос о решении судьбы поврежденной клетки и механизме функционирования сигнального пути p53 в условиях стрессовых воздействий представляет большой интерес, в частности, потому, что целенаправленное изменение динамики белка может рассматриваться как одна из возможных фармакологических стратегий изменения судьбы клеток при онкологических или нейродегенеративных заболеваниях [6]. Лучшему пониманию особенностей динамики передачи сигналов, регулирующих клеточный ответ на повреждение, могут способствовать не только детальные лабораторные исследования, но и математическое моделирование. Однако полных экспериментальных данных, на которых можно было бы проверить эту способность математических моделей, как минимум, недостаточно.

В лабораторных условиях искусственное повреждение ДНК наиболее часто инициируется ионизирующим излучением или воздействием химического вещества на клетку-мишень. Одним из важных примеров лабораторных исследований представляется работа [6], в которой клетки линии MCF7 подвергаются внешнему воздействию и детально анализируется процесс активации сигнального пути p53. С точки зрения математического моделирования ценность этой работы заключается в том, что в ней приведены подробные количественные данные о кинетике p53 и ряде наиболее изученных мишеней p53, представляющих различные функциональные пути и клеточные исходы. Одной из таких мишеней является белок p21 — при относительно слабом повреждении он останавливает клеточный цикл (рост и деление клеток) для репарации ДНК и считается важным, но пока слабо изученным фактором онкогенеза. Белок p21 также играет ключевую роль в запуске программы клеточного старения, которая, как и программа апоптоза, является способом необратимого подавления размножения дефектных клеток. Белки Bax и Araf1 (фактор активации апоптотической протеазы) участвуют в непосредственном запуске апоптотической гибели клеток при достаточно сильном неустраиваемом повреждении.

В настоящей работе, являющейся продолжением (ч. II) работы [8], решается задача создания математической модели для описания наблюдаемой в эксперименте [6] динамики системы p53–Wip1–Mdm2–p21–Araf1–Bax. В качестве основы используется хорошо изученная модель функционирования системы p53–Mdm2–Wip1, которая допол-

няется новыми дифференциальными уравнениями, описывающими изменение уровней белков-мишеней p53 при его активации в облученной клетке. Основным инструментом построения модели является численное решение серии прямых и обратных коэффициентных задач с применением генетического алгоритма ВГА и основанной на идее метода динамического программирования экономичной вычислительной технологии структурной и параметрической идентификации уравнений [9].

1. Базовая математическая модель

Диаграмма, отражающая общепринятые представления о связях в ключевом сегменте сигнального пути p53 при повреждении ДНК, приведена на рис. 1. При ее реализации в рамках математической модели используется предложенная в экспериментальной работе [6] модельная схема функционирования данного сегмента пути p53 под воздействием активного сигнала о повреждении. Согласно этой схеме, при отсутствии повреждения p53 находится под контролем Mdm2 (отрицательная обратная связь), а ролью Wip1 как непосредственного отрицательного регулятора p53 можно пренебречь. В этих условиях в системе поддерживаются весьма низкие уровни всех белков. Сигнал о повреждении активирует p53 и сдерживает Mdm2, тем самым инициируя активацию петли отрицательной обратной связи p53–Mdm2. Одновременно сигнал приводит и к активации петли отрицательной обратной связи p53–Wip1. Помимо этого, каскад биохимических сигналов захватывает p21, Bax, Araf1 и другие белки-мишени p53, обеспечивая тем самым запуск генетических программ, реализующих клеточный ответ на повреждение в виде решения судьбы клетки.

Роль базовой модели при описании лабораторного эксперимента [6] отводится математической модели, разработанной и детально исследованной в ч. I настоящей работы (см. модель 2 в [8]):

$$\frac{dP_i}{dt} = \beta_P - \alpha_{MP_i}MP_i - \beta_{SP} \frac{S^\sigma}{S^\sigma + T_S^\sigma} P_i - \alpha_{P_i} P_i - \alpha_{WP_i} WP_i, \quad (1)$$

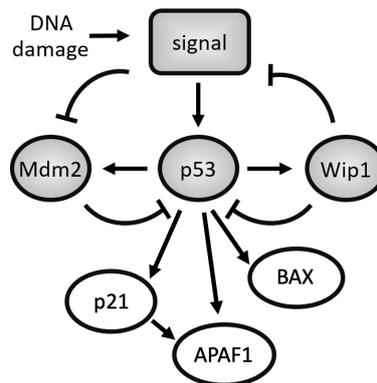


Рис. 1. Диаграмма, отражающая основные виды взаимосвязей в принятой модели ключевого сегмента сигнального пути p53 после повреждения ДНК. Заостренные стрелки указывают на наличие положительного воздействия, тупые — отрицательного

Fig. 1. A diagram capturing the main species and parameters in the accepted model of the key segment of the signal path p53 following DNA damage. Pointed arrows indicate the presence of a positive impact, blunt arrows indicate a negative one

$$\frac{dP_a}{dt} = \beta_{SP} \frac{S^\sigma}{S^\sigma + T_S^\sigma} P_i - \alpha_{MP_a} M P_a - \alpha_{WP_a} W P_a, \quad (2)$$

$$\frac{dM}{dt} = \beta_{M_i} + \beta_M P_a(t - \tau_M) - \alpha_{SM} S M - \alpha_M M, \quad (3)$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta_W P_a(t - \tau_W) - \alpha_W W, \quad (4)$$

$$\frac{dS}{dt} = \beta_S - \alpha_{WS} \frac{W^\nu}{W^\nu + T_W^\nu} S - \alpha_S S. \quad (5)$$

Здесь и ниже P_i , P_a — уровни неактивной и активной форм белка р53 соответственно; M , W — уровни белков Mdm2 и Wip1; S — уровень активного сигнала о повреждении ДНК; параметры τ_M , τ_W определяют время запаздывания реакции Mdm2 и Wip1 на изменение р53; β_P , β_{M_i} , β_S — константы скорости генерации белков р53, Mdm2 и сигнала; β_M и β_W — константы скорости р53-зависимой генерации Mdm2 и Wip1; β_{SP} — константа скорости генерации р53, обусловленной сигналом; α_{MP_i} , α_{MP_a} — константы скорости деградации неактивного и активного р53 под влиянием Mdm2; α_{P_i} , α_M , α_W , α_S — константы скорости деградации р53, Mdm2, Wip1 и сигнала соответственно; α_{SM} — константа скорости деградации Mdm2 под влиянием сигнала; α_{WS} — константа скорости деградации сигнала под влиянием Wip1; T_W , T_S — кинетические параметры; σ , ν — параметры Хилла.

Особенностью модели является то, что ингибирующее воздействие Wip1 на р53 реализуется как напрямую, так и через сигнал. Адекватность принятой математической формализации биологического процесса подтверждена в [8] сопоставлением результатов моделирования с экспериментальными данными.

Отметим, что на всех этапах моделирования каждое уравнение рассматриваемой модели обезразмеривалось с использованием следующих представлений переменных задачи: $t = t^*T$, $\tau = \tau^*T$, $y_i = y_i^*D_i$, где $*$ — знак обезразмеривания, D_i — характерные масштабы основных переменных задачи, T — масштаб времени. Далее всюду, если не оговорено иное, используются обезразмеренные величины, при этом знак обезразмеривания опускается.

2. Численный алгоритм решения прямой и обратной коэффициентной задач

Математическое моделирование динамики системы р53–Wip1–Mdm2–р21–Araf1–Вах, непосредственно участвующей в решении судьбы клетки с повреждением ДНК, сводится, в первую очередь, к структурной и параметрической идентификации дифференциальных уравнений модели. При этом возникает необходимость в решении достаточно больших серий обратных коэффициентных задач, где в качестве основного инструмента привлекается генетический алгоритм ВГА, показавший свою достаточно высокую эффективность, надежность и удобство использования (см. [9–11], там же можно найти подробное описание алгоритма).

Для запуска ВГА необходимо сформировать нулевое поколение из p_0 индивидуумов, где индивидуум — это набор значений параметров модели k_1, \dots, k_q , подлежащих определению. На этом этапе формирование поколения производится случайным образом с

учетом заранее установленных интервалов изменения каждого параметра. В настоящей работе рассматривалось нулевое поколение из $p_0 \in [100, 3000]$ индивидуумов (априорная неопределенность в значениях параметров модели требует увеличения размеров интервалов и размера выборки p_0).

Далее идея метода BGA сводится к итерационному процессу формирования, оценки и улучшения поколений индивидуумов, где каждая итерация предполагает их селекцию, рекомбинацию, мутации и клонирование — стандартную для данного класса алгоритмов последовательность шагов. Особенность BGA состоит в том, что из предыдущего поколения в новом поколении остаются неизменными P_{best} лучших индивидуумов, а для восполнения нового поколения до P индивидуумов производится необходимое число новых индивидуумов $w_i = u_i + \alpha_i(v_i - u_i)$, которые дополнительно подвергаются мутации: $w_i = w_i \pm \mu(w_{L,i} - w_{R,i})\delta$. Здесь $\alpha_i \in [-d, 1 + d]$ — случайное число, $d \in [0, 1]$ — параметр рекомбинации; μ — мутационный параметр; u_i и v_i — случайно выбранные из числа лучших два индивидуума-родителя; $\delta = 2^{-16\xi}$, где $\xi \in [0, 1]$ — случайное число. Для настоящей задачи в качестве оптимальных приняты значения $\mu = 0.1$, $P_{best} = 0.3P$.

Для оценки каждого индивидуума в поколении должна быть решена прямая задача и выполнена оценка близости ее решения к экспериментальным данным (функционал задавался в смысле наименьших квадратов). Итерационный процесс улучшения поколений продолжается, пока не будет рассчитано необходимое количество поколений N_{Gen} , которое обеспечивает сходимость в себе последовательностей значений минимума функционала и соответствующих наборов индивидуумов (в наших вычислениях N_{Gen} варьировалось от 10 до 100). В рамках решения задачи идентификации модели систематическое отсутствие сходимости служит поводом для перенастройки BGA или пересмотра принятых гипотез о структуре уравнения или модели.

Отметим, что на всех этапах реализации BGA выдвигаются строгие требования, обусловленные биологией моделируемого процесса: значения параметров должны быть строго положительными, а все значения компонент решения прямой задачи — неотрицательными; дополнительные требования могут быть связаны с качественными свойствами решения прямой задачи или с имеющимися лабораторными оценками параметров. При их нарушении запуск признавался неудачным, а многократное повторение неудачных запусков являлось дополнительным поводом к пересмотру структуры уравнения посредством привлечения альтернативных аппроксимаций или дополнительных биологических гипотез.

Поскольку алгоритм BGA является стохастическим, для получения статистически достоверного результата решения обратной коэффициентной задачи необходимо реализовать некоторое количество равнозначных запусков BGA. Окончательный выбор оптимального набора параметров осуществляется на основе результатов статистического анализа достаточно представительной выборки, при этом принимаются во внимание также качественные свойства полученного решения прямой задачи, их соответствие биомедицинским представлениям.

Решение прямой задачи сводится к численному решению основной начальной задачи для нелинейной системы функционально-дифференциальных уравнений следующего общего вида:

$$\frac{dy}{dt} = \mathbf{F}(t, \mathbf{y}(t), \mathbf{y}(t - \tau_1), \mathbf{y}(t - \tau_2), \dots, \Theta), \quad (6)$$

$$\mathbf{y}(\theta) = \mathbf{y}^0, \quad t_0 - \tau \leq \theta \leq t_0. \quad (7)$$

Здесь и далее $\mathbf{y} = (y_1, \dots, y_n)$ — вектор решения задачи; $\mathbf{F} = (f_1, \dots, f_n)$; $\tau = \max(\tau_1, \tau_2, \dots)$; $\Theta = k_1, \dots, k_p$ — набор параметров модели. В основе алгоритма решения задачи (6), (7) лежит метод шагов. Это позволяет рассматривать основную начальную задачу как последовательность задач Коши для ОДУ [12, 13] и привлекать широкий круг численных методов решения этого класса задач.

На основе численных экспериментов в качестве основного инструмента использовались явный метод Эйлера первого порядка (благодаря исключительной простоте этот метод удобно использовать как вспомогательный, в том числе на начальных этапах моделирования) и метод предиктор-корректор Адамса – Бэшфорда – Моултона четвертого порядка, причем каждый из них реализовывался с привлечением идеи метода Зейделя. Шаг сетки h выбирался таким образом, чтобы величины запаздывания τ_M и τ_W были кратными h . Более детальное описание численного алгоритма и результаты методических расчетов представлены в [8].

3. Разработка математической модели активации сигнального пути р53 под влиянием γ -облучения

Вновь отметим, что главным достоинством лабораторных исследований [6] является достаточная полнота представленных кинетических данных, полученных в одной серии измерений. Это позволяет построить существенно более полную и сбалансированную математическую модель активации сигнального пути р53, согласованную с этими данными. С учетом общепринятых представлений и имеющегося объема экспериментальной информации при построении математической модели рассматривается идеализированная общая схема биологических связей в системе р53–Wip1–Mdm2–p21–Araf1–Вах, на которой ясно выделены два сегмента — сегмент, охватывающий сразу две петли отрицательной обратной связи р53–Wip1–Mdm2, и находящийся под их влиянием сегмент белков-мишеней (прямая положительная зависимость от р53) (рис. 1). Тогда при организации исследований задачу построения математической модели представляется разумным разделить на несколько этапов. Сначала с привлечением базовой модели (1)–(5) планируется описать кинетику системы р53–Wip1–Mdm2, согласованную с данными [6]. Затем эта модель будет дополнена новыми дифференциальными уравнениями, оптимальная структура правых частей и значения параметров которых определяются с привлечением тех же данных и численного решения модели (1)–(5) в рамках оптимизационного подхода. Интересно отметить, что вопрос о наличии связей между белками-мишенями р53 может быть рассмотрен как в рамках идеализированного подхода, когда единственной доминантой считается их зависимость от р53, так и с учетом более сложной системы взаимодействий. Окончательный выбор подхода определяется результатами решения задачи структурной и параметрической идентификации уравнений.

3.1. Активация системы р53–Mdm2–Wip1

Численное решение обратной коэффициентной задачи. В рамках принятой базовой математической модели задача описания лабораторного эксперимента [6] сводится к решению обратной коэффициентной задачи для модели (1)–(5) с согласованными с экспериментальными данными начальными условиями вида (7), где

$\mathbf{y}^0 = (P_i, P_a, M, W, S)^0 = (0.069228, 0., 1.0, 1.08333, 0.)$. Значения параметров запаздывания $\tau_M = 0.7$, $\tau_W = 0.5$ определялись на основе анализа экспериментальных данных [6], масштаб времени $T = 1$ ч. В таблице представлены полученные оптимальные значения параметров, а также результаты статистического анализа 170 запусков ВГА по 500 индивидуумов и 50 поколений в каждом.

Анализ чувствительности модели. Для численного анализа чувствительности модели к относительно малым (от 5 до 15% в сторону роста и убывания) изменениям значений параметров, как и в [8], привлекался “прямой” локальный метод [14]. При его реализации начальная задача типа (6), (7) дополняется следующей системой дифференциальных уравнений для коэффициентов чувствительности первого порядка β_{ij} :

$$\frac{d\beta_{ij}}{dt} = \frac{\partial f_i}{\partial k_j} + \sum_{l=1}^n \left(\beta_{lj} \frac{\partial f_i}{\partial y_l} \right), \quad i = 1, \dots, n, \quad j = 1, \dots, q. \quad (8)$$

При этом в (8) начальные условия полагаются нулевыми, индексы i и j определяют порядковые номера компонент вектора решения задачи и параметров модели k_j , производные в правой части вычисляются аналитически. Для окончательной оценки чувствительности удобно использовать величину

$$B_{ij} = \frac{1}{M} \left(\sum_{l=1}^M \left(\beta_{ij}(t_l) \frac{k_j^c}{y_i^c} \right)^2 \right)^{1/2}.$$

Применительно к настоящей работе речь идет о решении системы уравнений (1)–(5), (8) с соответствующими начальными условиями; $q = 18$ (нумерация параметров производится в порядке их следования в модели); в качестве нормирующих множителей k_j^c и y_i^c принимаются характерные значения параметров и компонент решения соответственно.

Результаты статистического анализа и оптимальные значения параметров

The results of statistical analysis and optimal parameter values

Параметр	Оптимальное значение параметра	Медианное значение	[Q1, Q3]
β_W	5.5	5.5922	[5.3939, 5.8440]
α_W	1.28	1.3016	[1.128, 1.3355]
β_P	1.97	1.9655	[1.8940, 2.0525]
α_{MP_i}	5.5	5.4807	[4.9577, 5.8477]
β_{SP}	7.6	7.6677	[7.2909, 7.9703]
α_{P_i}	5	5.2513	[4.7635, 5.8149]
α_{WP_i}	3.9	3.9182	[3.4724, 4.4828]
α_{MP_a}	0.08	0.0845	[0.08, 0.0889]
α_{WP_a}	0.035	0.034	[0.0283, 0.0386]
T_S	2.2	2.2228	[2.1037, 2.3466]
β_M	3.95	3.9054	[3.7227, 4.06132]
β_{M_i}	0.83	0.8322	[0.7521, 0.9021]
α_{SM}	0.77	0.7717	[0.7097, 0.8127]
α_M	0.25	0.2236	[0.188, 0.2574]
β_S	71	70.7946	[66.7589, 74.6648]
α_{WS}	128	127.7388	[122.2343, 131.3098]
α_S	20	19.6034	[18.0806, 21.3216]
T_W	1.7	1.7025	[1.6765, 1.73]

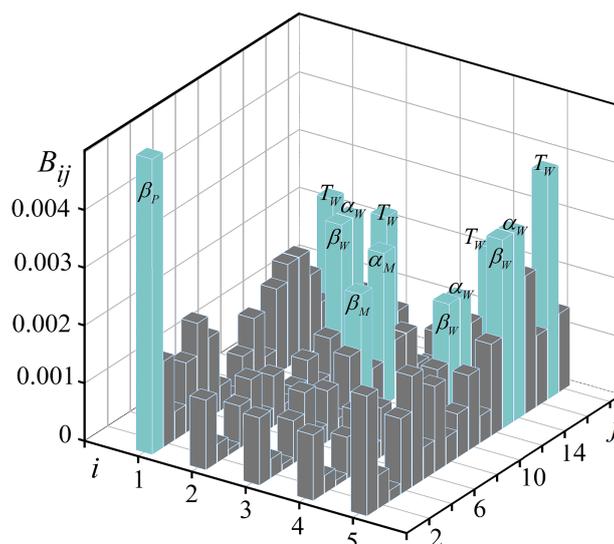


Рис. 2. Коэффициенты относительной чувствительности модели к малому изменению значений параметров

Fig. 2. Coefficients of relative sensitivity of the model to small changes in parameter values

Результаты анализа показаны в виде гистограммы на рис. 2. Можно видеть, что модель наиболее чувствительна к параметрам, ответственным за описание прироста и деградации уровней белков p53, Mdm2, Wip1 за счет конститутивных и явно не учтенных процессов, в особенности к параметру β_P (константе скорости генерации p53). Следует отметить также чувствительность к параметру T_W , который участвует в регуляции ответа системы на сигнал S . Вместе с тем в заданном диапазоне значений параметров в модели отсутствуют параметры, чувствительность к которым можно считать избыточной (отметим, что сверхчувствительность является еще одним поводом для пересмотра результатов идентификации модели).

3.2. Математическое моделирование активации системы p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax

На схеме белок-белковых взаимодействий (см. рис. 1) показано, что p53 активирует ряд белков-мишеней, которые пассивны по отношению к системе p53–Mdm2–Wip1, но, с одной стороны, влияют на остановку клеточного цикла (p21), а с другой — участвуют в запуске каскада апоптозных реакций (Araf1 и Bax). Исходя из этого, а также по аналогии с [15] предполагаем, что базовая модель (1)–(5) должна быть дополнена уравнениями динамики уровней белков-мишеней p21, Araf1 и Bax.

Для каждого нового уравнения рассматривался ряд вариантов уравнений в соответствии с биологическими представлениями о связях внутри системы и функционировании системы в целом. Структура уравнения выстраивалась по общепринятому в химической и биокинетике принципу: влияние конститутивных процессов генерации и деградации белков и множества не учтенных в биологической модели механизмов описывается на основе закона действующих масс, а взаимодействия белков с p53 или между собой предполагаются более сложными и могут описываться с привлечением известных моделей кинетики ферментативных реакций (например, функций Хилла) или композицией этих двух моделей. Задача структурной и параметрической идентифика-

ции каждого нового биокинетического уравнения решалась с привлечением алгоритма ВГА в рамках оптимизационного подхода.

Численный анализ решений прямых и обратных задач показал, что в рамках принятой модели наиболее удачным с точки зрения описания лабораторного эксперимента оказалось уравнение динамики уровня белка p21 следующего вида:

$$\frac{dP_{21}}{dt} = \beta_{P_{21}} + \beta_{PP_{21}}P_a(t - \tau_{P_{21}}) - \alpha_{P_{21}}P_{21}. \quad (9)$$

Здесь P_{21} — уровень белка p21; $\beta_{P_{21}}$, $\beta_{PP_{21}}$, $\tau_{P_{21}}$, $\alpha_{P_{21}}$ — параметры, подлежащие определению в ходе решения обратной задачи; P_a рассматривается как динамический параметр, его значения привлекаются из численного решения задачи (1)–(5), согласованного с экспериментальными данными [6] (см. подразд. 3.1). Следует отметить, что уравнение (9) представляет собой достаточно распространенный вариант биокинетического уравнения (см., например, [16]).

На следующем этапе идентификации модели при моделировании полученной в [6] динамики уровней белков Araf1 и Вах рассматривалось несколько вариантов дифференциальных уравнений, которые строились по тому же принципу, что и уравнение (9). В ходе решения задачи структурной и параметрической идентификации каждого из них наилучшего согласия с экспериментом удалось добиться при использовании следующих уравнений ($P = P_i + P_a$):

$$\frac{dA}{dt} = \beta_A + \beta_{PA} \frac{P_a^{\varrho}}{J_A^{\varrho} + P_a^{\varrho}} P_{21}(t - \tau_A) - \alpha_A A, \quad (10)$$

$$\frac{dB}{dt} = \beta_B + \beta_{PB} \frac{P^{\kappa}}{J_B^{\kappa} + P^{\kappa}} B - \alpha_B B. \quad (11)$$

Здесь A , B — уровни белков Araf1 и Вах соответственно; $P_a(t)$, $P_i(t)$, $P_{21}(t)$ — динамические параметры, в качестве этих функций удобно и целесообразно использовать ранее полученные численные решения задачи (1)–(5), (9), согласованные с экспериментальными данными [6]; β_A , β_{PA} , J_A , ϱ , τ_A , α_A , β_B , β_{PB} , J_B , κ , α_B — определяемые параметры. Интересно отметить, что связь p21–Araf1 первоначально не считалась приоритетной, но была отмечена как важная именно при решении задачи идентификации уравнения (10). Уместность этой гипотезы подтверждается, в частности, результатами лабораторных исследований [17], в которых дефицит p21 привел к снижению экспрессии Araf1 во время лечения рака химиопрепаратом, и было сделано заключение о значимости p21 для зависимой от Araf1 активации апоптоза.

Начальные условия вида (7) для системы уравнений (9)–(11) принимались согласованными с экспериментальными данными [6]: $P_{21}^0 = 0.95$, $A^0 = 1.03$, $B^0 = 1.01$. Оптимальный набор параметров, полученный по описанному выше алгоритму, представлен следующими значениями:

$$\begin{aligned} \beta_{P_{21}} &= 8, & \beta_{PP_{21}} &= 88.18, & \tau_{P_{21}} &= 0.9, & \alpha_{P_{21}} &= 4.8, & \beta_A &= 4.4, \\ \beta_{PA} &= 2.5, & J_A &= 1.486, & \tau_A &= 1, & \alpha_A &= 5, & \beta_B &= 0.95, \\ \beta_{PB} &= 5.03, & J_B &= 0.214, & \alpha_B &= 5.29, & \varrho &= 2, & \kappa &= 5.75. \end{aligned} \quad (12)$$

Таким образом, математическая модель активации сегмента p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Вах сигнального пути p53 под влиянием γ -облучения представляет собой систему нелинейных дифференциальных уравнений с запаздыванием (1)–(5), (9)–(11).

На рис. 3–5 приведено численное решение разработанной модели, полученное при значениях параметров, представленных в таблице и (12), и начальных условиях, согласованных с экспериментальными данными [6]. Здесь же для сравнения представлена динамика системы при нулевом уровне активного сигнала (пунктирные линии — $\beta_S = 0$). Можно видеть, что в рамках разработанной модели при $S = 0$ уровни всех белков системы p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax держатся на достаточно низком стационарном уровне. Можно предположить, что полученное состояние системы соответствует относительно низкому уровню других, не учтенных явно источников стресса. Сигнал о повреждении, инициируемый в рамках модели с помощью параметра β_S , кардинально изменяет состояние системы. Резкий рост уровня активного p53 вызывает реакцию всего рассматриваемого сегмента сигнального пути p53 — уровни p53 и его ингибиторов Mdm2 и Wip1 колеблются в противофазе (с учетом зафиксированного в лабораторном эксперименте запаздывания реакции ингибиторов на изменение состояния p53). Также изменяется динамика белков-мишеней p21, Araf1 и Bax, причем p21 демонстрирует наиболее яркую реакцию.

Следует заметить, что в рамках принятой модели довольно ярко проявляется функция Wip1 как отрицательного регулятора сигнала: на рис. 4 S и W изменяются строго в противофазе. Со временем, когда реакция системы приводит к значимому снижению уровня сигнала, система вновь стабилизируется, но уровни белков остаются повышенными, за исключением уровня Mdm2.

Таким образом, данные, представленные на рис. 3–5, соответствуют данным эксперимента по динамике уровней всех белков системы p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax, достигнутым в результате решения задачи идентификации модели. Описанный результат активации системы не только хорошо количественно согласуется с экспериментом [6], но и соответствует известным представлениям о реакции сигнального пути

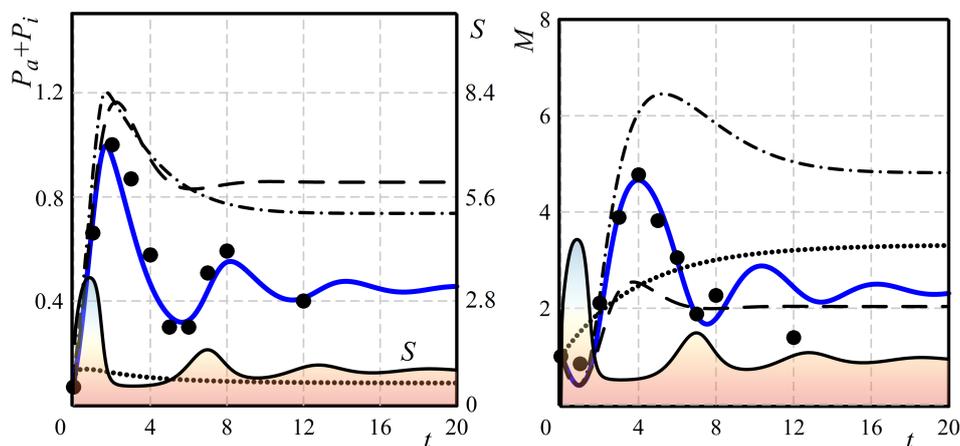


Рис. 3. Динамика уровней p53 ($P_a + P_i$) и Mdm2 (M). Сплошные линии — численное решение при оптимальных значениях параметров, S — уровень сигнала (отмечен закрашенной областью), маркеры — экспериментальные данные [6]. Дополнительные сценарии: пунктирные линии — отсутствие сигнала о повреждении; штриховые — ингибирование регуляции сигнала системой; штрихпунктирные — ингибирование регуляторной функции Mdm2

Fig. 3. Dynamics of p53 ($P_a + P_i$) and Mdm2 (M) levels. Solid lines — numerical solution for the optimal parameter values, S — signal level, markers — experimental data [6]. Additional scenarios: dotted lines — no damage signal; dashed lines — inhibition of signal regulation by the system; dashed dotted lines — inhibition of the Mdm2 regulatory function

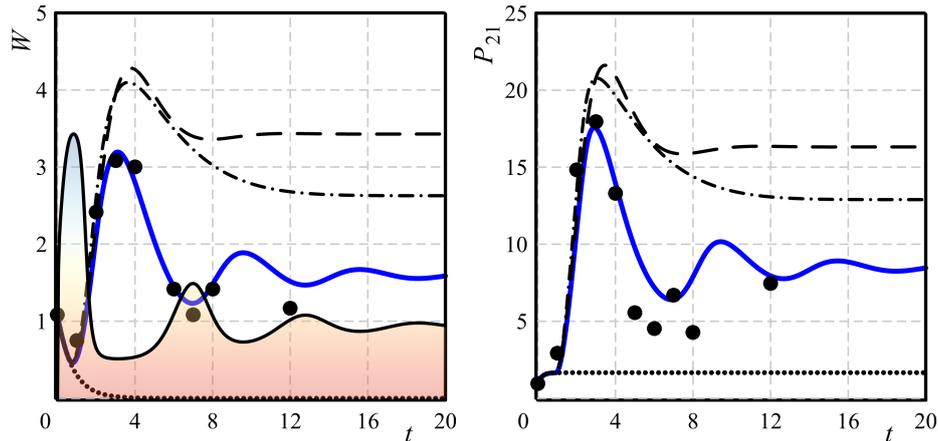


Рис. 4. Динамика уровней Wip1 (W) и p21 (P_{21}). Обозначения те же, что и на рис. 3
 Fig. 4. Dynamics of Wip1 (W) and p21 (P_{21}) levels. Notations are the same as in Fig. 3

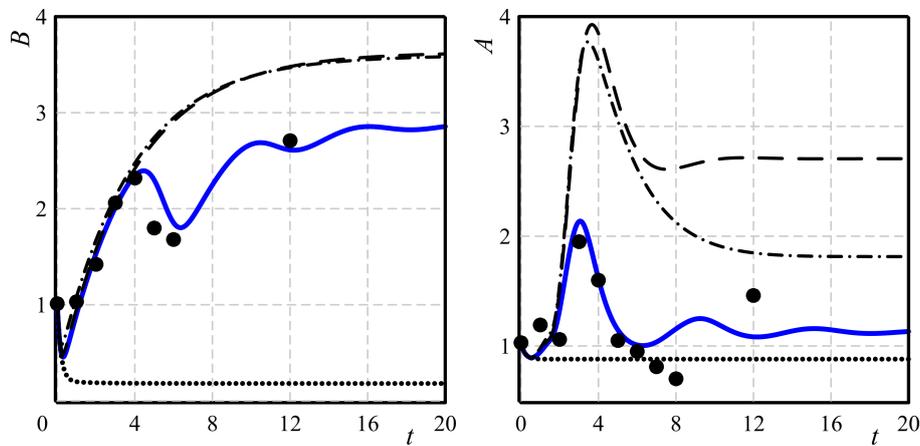


Рис. 5. Динамика уровней Bax (B) и Araf1 (A). Обозначения те же, что и на рис. 3
 Fig. 5. Dynamics of Bax (B) and Araf1 (A) levels. Notations are the same as in Fig. 3

p53 на достаточно умеренное повреждение ДНК — эта реакция в основном связана не с гибелью клетки, а с остановкой клеточного цикла и активизацией репаративных механизмов.

3.3. Результаты численных экспериментов

С привлечением разработанной математической модели выполнена серия численных экспериментов, направленных на анализ функционирования системы p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax в условиях, приближенных к условиям лабораторного эксперимента [6]. Получены важные с методической точки зрения данные, подтверждающие умеренную чувствительность модели к 5–15 %-ному поочередному изменению параметров уравнений (9)–(11) (в дополнение к данным, представленным в подразд. 3.1). В относительно малой (до нескольких десятков процентов) окрестности оптимальных значений параметров при их поочередном варьировании получены стационарные решения модели, которые согласуются с известными представлениями о характере связей в данной биологической системе. Ниже будет показано, что при более существенном изменении па-

раметров качественные свойства решений могут быть столь же разнообразны, как и продемонстрированные в [8].

Наибольший интерес представляет анализ функционирования системы при некоторых изменениях в сценарии стрессового воздействия, имеющих терапевтическую значимость. Их актуальность обсуждается во многих работах (см., например, обзоры [1–4]), а в [6] — в связи с идеей управления динамикой p53 через управление сигналом или блокировку функции белков-ингибиторов p53.

Так, в численном эксперименте рассматривался сценарий, когда ослаблено или полностью заблокировано регуляторное воздействие Wip1 на сигнал (на рис. 3–5 штриховые линии соответствуют $\alpha_{WS} = 12.8$, т.е. десятикратному уменьшению значения по сравнению с принятым в таблице). Вследствие этого уровень сигнала остается практически постоянным при $t > 4$, стационарное значение в этом случае составляет $S = 2.22$, что более чем в 2 раза выше полученного при описании эксперимента [6]. Результатом развития такого сценария является стабилизация уровней p53 и его прямых мишеней p21, Araf1, Вах на достаточно высоком уровне, в то время как белки-ингибиторы p53 ведут себя по-разному: уровень Mdm2 остается постоянным, но довольно низким, а уровень Wip1 оказался повышенным. Все это указывает на нарушения в функционировании петель отрицательной обратной связи p53–Mdm2 и p53–Wip1, которые, помимо прочего, проявились в доминировании прямого положительного воздействия p53 на Wip1.

Анализировался также вариант искусственного ингибирования регуляторной функции Mdm2 (на рис. 3–5 штрихпунктирные линии соответствуют расчету при $\alpha_{MP_i} = 0.55$, $\alpha_{MP_a} = 0.008$). Численный анализ показывает, что хотя динамика системы сходна с предыдущим сценарием, но есть и особенности: в данном случае на фоне повышенного p53 наблюдается, вопреки ожиданиям, повышенный уровень не одного, а сразу двух ингибиторов — Wip1 и Mdm2. Ослабление ингибирующего влияния Mdm2 на p53 привело к доминированию положительного влияния p53 не в одной, в сразу в двух петлях отрицательной обратной связи p53–Mdm2 и p53–Wip1. Стоит отметить также, что при этом уровень сигнала стабилизировался на достаточно низком уровне, близком к $S = 0.5$. Можно предположить, что именно это привело к небольшому снижению уровней всех p53-зависимых белков, особенно белков-мишеней, в сравнении со сценарием управления сигналом (исключение составляет Вах, уровень которого в рамках данной математической модели оказался слабо чувствительным к изменениям в сценарии, что отмечается также в экспериментальных наблюдениях [6]). Таким образом, численные эксперименты показали, что в рамках принятой математической модели возможно управление динамикой p53 путем управления сигналом или посредством ингибирования регуляторной функции Mdm2 (второй сценарий является одним из наиболее изученных способов влияния на p53 в терапевтических целях, а в рамках принятой модели — более эффективным).

Дополнительно проводился анализ возможного влияния активирующих p53 стрессовых факторов, которые не связаны напрямую с сигналом (при сохранении прочих условий, соответствующих эксперименту [6]). В этом случае варьировался параметр β_P — константа скорости генерации p53 за счет конститутивных и иных, не учтенных явно в модели процессов. Численный анализ показал, что в рамках принятой модели постепенное (до 8–10 раз) увеличение β_P приводит к еще более сильной активации системы, которая выражена, в первую очередь, в увеличении амплитуды и периода колебаний. Так, при $\beta_P = 15.6$ получено решение, характеризующееся наличием за-

тухающих колебаний, причем с увеличением τ_M , как и ожидалось, период колебаний растет пропорционально изменению τ_M .

Решение, соответствующее ярко выраженной и длительной реакции системы на повреждение (по сравнению с условиями эксперимента [6]), получено при $\beta_M = 7.9$, $\beta_W = 3.88$. Эти изменения параметров имитируют разнонаправленное воздействие — влияние р53 одновременно усиливается в отношении Mdm2 и снижается в отношении Wip1. Численный анализ показал, что эта дерегуляция вызывает достаточно сложную реакцию системы на начальном этапе ее формирования, но, в конечном счете, приводит к стабилизации системы в окрестности стационарного состояния, соответствующего [6].

Следует отметить, что практически каждое из перечисленных воздействий оказывается весьма значимыми с точки зрения баланса в системе р53–Mdm2–Wip1, однако при этом состояние системы остается стабильным. Численный анализ решений показал, что только одновременное введение этих изменений может вывести (в рамках принятой модели) систему из состояния равновесия. На рис. 6 показаны соответствующие перечисленным изменениям параметров фазовые портреты системы р53–Mdm2–Wip1–р21–Araf1–Bax. Несмотря на разницу в воздействиях, при которых получены эти фазовые траектории, следует отметить относительно слабый разброс значений уровней белков. Можно предположить, таким образом, что в рамках описания эксперимента [6], а также других рассмотренных сценариев речь не идет о критических состояниях системы, инициирующих, например, массовую гибель клеток. Это согласуется с данными лабораторных наблюдений [6].

Вместе с тем представляют интерес состояния системы, наблюдаемые при наиболее сложном сценарии, объединяющем рассмотренные выше воздействия, а именно — в случае $\alpha_{MP_a} = 2.4$, $\alpha_{WP_a} = 0.53$, $\beta_M = 7.9$, $\beta_W = 3.88$, $\beta_P = 15.6$ (см. линии 4 на рис. 6).

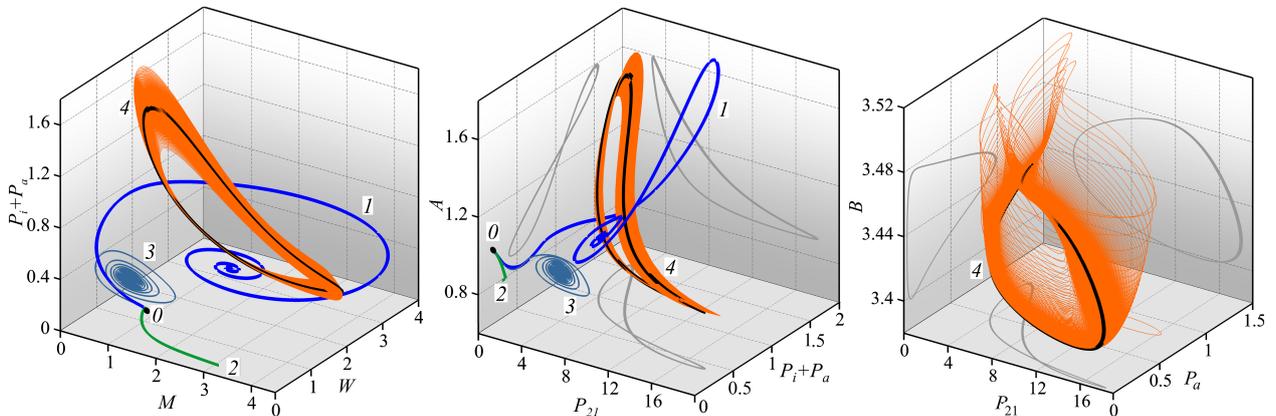


Рис. 6. Фазовые состояния системы р53–Mdm2–Wip1–р21–Araf1–Bax: 1 — решение, согласованное с экспериментом [6]; 2 — решение при $\beta_S = 0$; 3 — решение при $\alpha_{MP_a} = 2.4$ и $\alpha_{WP_a} = 0.53$; 4 — решение при $\alpha_{MP_a} = 2.4$, $\alpha_{WP_a} = 0.53$, $\beta_M = 7.9$, $\beta_W = 3.88$, $\beta_P = 15.6$, $\tau_M = 2.8$ (черная линия — предельная траектория). Точка 0 соответствует начальному состоянию; серые линии — проекции траектории 4

Fig. 6. Phase states of the system p53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax: 1 — the solution is consistent with the experiment [6]; 2 — the solution without the signal on the DNA damage ($\beta_S = 0$); 3 — solution for $\alpha_{MP_a} = 2.4$ and $\alpha_{WP_a} = 0.53$; 4 — the solution for $\alpha_{MP_a} = 2.4$, $\alpha_{WP_a} = 0.53$, $\beta_M = 7.9$, $\beta_W = 3.88$, $\beta_P = 15.6$, $\tau_M = 2.8$ (the black line is the limit trajectory). The point 0 corresponds to the initial state; gray lines are projections of the trajectory 4

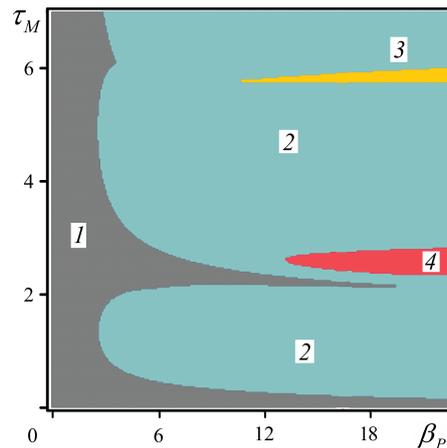


Рис. 7. Карта динамических режимов и линии нейтральности в плоскости (β_P, τ_M) : 1–3 — стационарные, периодические и квазипериодические решения, 4 — удвоение периода
 Fig. 7. Map of dynamic modes and lines of neutrality in the plane (β_P, τ_M) : 1–3 — stationary, periodic, and quasi-periodic solutions, 4 — period doubling

Полученные данные свидетельствуют о разнообразии динамических режимов, которое ранее было обнаружено для базовой модели в окрестности другого набора значений параметров [8]. Достаточно полное представление об этом сценарии дают карта динамических режимов и линии нейтральности, разделяющие плоскость (β_P, τ_M) на области со стационарным, периодическим и квазипериодическим решениями, а также с решениями, характеризующимися удвоением периода (рис. 7). Как и ранее [8], в окрестности оптимального набора параметров, полученного при описании лабораторного эксперимента [6], обнаружено существование двух решений — с неподвижной предельной точкой и предельным циклом — при одинаковых значениях параметров модели. Можно предположить, что двойственность решения, обусловленная сверхчувствительностью системы уравнений к малым возмущениям начальных данных, будет наблюдаться и при других значениях β_P и τ_M , однако этот вопрос требует более тщательного изучения. Биологический смысл полученного свойства базовой модели состоит, по-видимому, в том, что оно может быть отражением вариативности в реакции сигнального пути белка р53 на сигнал при повреждении.

Заключение

С использованием разработанной в [8] базовой математической модели и экспериментальных данных [6] получена новая математическая модель, описывающая активацию сегмента р53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax сигнального пути р53 под влиянием γ -облучения. Как и лабораторный эксперимент, она нацелена на оценку отклика белков, находящихся под контролем р53 и представляющих различные функциональные пути, на изменение динамики р53 под влиянием внешних стрессовых воздействий. Модель показала тот же ответ системы р53–Mdm2–Wip1–p21–Araf1–Bax, который наблюдался в эксперименте, — изменение уровня белка р53 и регуляторов Mdm2 и Wip1, а также ярко выраженный отклик белка p21 (на начальном этапе активации системы его амплитуда изменялась не менее чем в 15 раз), участвующего в остановке клеточного цикла и репарации ДНК, а также гораздо менее выраженные изменения проапоптозных белков

Araf1 и Вах. Таким образом, результаты математического моделирования в определенной мере поддерживают выводы об избирательной способности p53 активировать разные сегменты сигнального пути, которые участвуют в реакциях на повреждение ДНК и инициируют окончательное решение судьбы клетки с повреждением ДНК.

С привлечением разработанной модели проведен численный анализ эффективности некоторых терапевтических воздействий, включая стратегию поддержания уровня сигнала о повреждении ДНК, угнетение регуляторной функции белков-ингибиторов и др. Модель демонстрирует достаточно сложную череду динамических режимов, которые могут рассматриваться как вариант функционирования сигнального пути p53 в условиях стрессовых воздействий на фоне относительно слабой дерегуляции белок-белковых связей.

Список литературы

- [1] **Чумаков П.М.** Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. 2007; (47):3–52.
- [2] **Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М.** p53 — инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека. Молекулярная биология. 2007; 41(6):947–963.
- [3] **Желтухин А.О., Чумаков П.М.** Повседневные и индуцируемые функции гена p53. Успехи биологической химии. 2010; (50):447–516.
- [4] **Lane D., Levine A.** p53 research: The past thirty years and the next thirty years. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2010; 2(12):10. Article No. a000893.
- [5] **Wu M., Ye H., Tang Z., Shao C., Lu G., Chen B., Yang Y., Wang G., Hao H.** p53 dynamics orchestrates with binding affinity to target genes for cell fate decision. Cell Death and Disease. 2017; (8):e3130.
- [6] **Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** p53 dynamics control cell fate. Science. 2012; (336):1440–1444.
- [7] **Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008; 9(5):402–412.
- [8] **Воропаева О.Ф., Гаврилова К.С.** Математическое моделирование функционирования сигнального пути p53 при повреждении ДНК. I. Модель активации системы p53–Mdm2–Wip1. Вычислительные технологии. 2021; 26(6):33–53. DOI:10.25743/ICT.2021.26.6.004.
- [9] **Воропаева О.Ф., Цгоев Ч.А.** Численная модель динамики факторов воспаления в ядре инфаркта миокарда. Сибирский журнал индустриальной математики. 2019; 22(2):13–26.
- [10] **Воропаева О.Ф., Баядилов Т.В.** Математическая модель динамики асептического воспаления. Сибирский журнал индустриальной математики. 2020; 23(4):30–47.
- [11] **Сенотрусова С.Д., Воропаева О.Ф., Шокин Ю.И.** Применение минимальных математических моделей динамики сигнального пути p53–микроРНК к анализу лабораторных данных. Вычислительные технологии. 2020; 25(6):4–49. DOI:10.25743/ICT.2020.25.6.002.
- [12] **Мышкис А.Д.** Общая теория дифференциальных уравнений с запаздывающим аргументом. Успехи математических наук. 1949; (4):99–141.
- [13] **Эльсгольц Л.Э., Норкин С.Б.** Введение в теорию дифференциальных уравнений с отклоняющимся аргументом. М.: Наука; 1971: 296.
- [14] **Оран Э., Борис Дж.** Численное моделирование реагирующих потоков. М.: Мир; 1990: 660.

- [15] **Zhang T., Brazhnik P., Tyson J.J.** Exploring mechanisms of the DNA-Damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. *Cell Cycle*. 2007; 6(1):85–94. DOI:10.4161/cc.6.1.3705.
- [16] **Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh., Milo R., Sigal A., Dekel E., Yarnitzky T., Liron Yu., Polak P., Lahav G., Alon U.** Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular Systems Biology*. 2006; 2(1). Article No. 2006.0033. DOI:10.1038/msb4100068.
- [17] **Gogada R., Amadori M., Zhang H., Jones A., Verone A., Pitarresi J., Jandhyam S., Prabhu V., Black J.D., Chandra D.** Curcumin induces Apaf-1-dependent, p21-mediated caspase activation and apoptosis. *Cell Cycle*. 2011; 10(23):4128–4137.

Вычислительные технологии, 2022, том 27, № 1, с. 4–20. © ФИЦ ИВТ, 2022
 Computational Technologies, 2022, vol. 27, no. 1, pp. 4–20. © FRC ICT, 2022

ISSN 1560-7534
 eISSN 2313-691X

MATHEMATICAL MODELLING

DOI:10.25743/ICT.2022.27.1.002

Mathematical modelling of the functioning of the p53 signaling pathway following DNA damage. II Activation of the p53–Mdm2–Wip1–p21–Apaf1–Bax system under the influence of γ -irradiation

VOROPAeva OLGA F.^{1,*}, GAVRILOVA KSENIA S.^{1,2}

¹Federal Research Center for Information and Computing Technologies, 630090, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Russia

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

Received August 30, 2021, accepted October 21, 2021.

Abstract

Using the basic mathematical model developed in the Part 1 of this work [8] and the experimental data [6], a new mathematical model describing the activation of the p53–Mdm2–Wip1–p21–Apaf1–Bax segment of the p53 signalling pathway under the influence of gamma radiation was obtained. The model, like the laboratory experiment, is aimed at evaluating the response of proteins controlled by p53 that represent various functional pathways to changes in the dynamics of p53 under the influence of the external stress. The model showed the same response of the p53–Mdm2–Wip1–p21–Apaf1–Bax system, which was observed in the experiment. It includes a change in the level of the p53 protein and the Mdm2 and Wip1 regulators as well as a pronounced response of the p21 protein involved in stopping the cell cycle and DNA repair. At the initial stage of activation of the system its amplitude was increased at least in 15 times, along with the minor changes in the pro-apoptotic proteins Apaf1 and Bax. Thus, the results of mathematical modelling, to a certain extent, support the conclusions on the selective ability of p53 to activate different segments of the signaling pathway that participate in reactions to DNA damage and initiate the final decision of the fate of a cell with DNA damage.

Using the developed model, a numerical analysis of the effectiveness of some therapeutic effects was carried out, including a strategy for maintaining the level of a signal about DNA damage, inhibition of the regulatory function of inhibitor proteins, and others. The model demonstrates a rather complex sequence of dynamic modes that can be considered as a variant of the functioning of the p53 signaling pathway under stress conditions against the background of relatively weak deregulation of protein-protein bonds.

Keywords: mathematical model, p53–Mdm2–Wip1–p21–Apaf1–Bax system, differential equations with delay, inverse coefficient problem, genetic algorithm, validation, comparison with laboratory experiment, anti-cancer therapeutic strategies.

Citation: Voropaeva O.F., Gavrilova K.S. Mathematical modelling of the functioning of the p53 signaling pathway following DNA damage. II Activation of the p53–Mdm2–Wip1–p21–Apaf1–Bax system under the influence of γ -irradiation. Computational Technologies. 2022; 27(1):4–20. DOI:10.25743/ICT.2022.27.1.002. (In Russ.)

References

1. **Chumakov P.M.** Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry*. 2007; 72(13):1399–421.
2. **Almazov V.P., Kochetkov D.V., Chumakov P.M.** Use of p53 for therapy of human cancer. *Molecular Biology*. 2007; 41(6):863–877.
3. **Zheltukhin A.O., Chumakov P.M.** Constitutive and induced functions of the p53 gene. *Biochemistry*. 2010; 75(13):1692–1721. DOI:10.134/S0006297910130110.
4. **Lane D., Levine A.** p53 research: The past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2(12):10. Article No. a000893.
5. **Wu M., Ye H., Tang Z., Shao C., Lu G., Chen B., Yang Y., Wang G., Hao H.** p53 dynamics orchestrates with binding affinity to target genes for cell fate decision. *Cell Death and Disease*. 2017; (8):e3130.
6. **Purvis J.E., Karhohs K.W., Mock C., Batchelor E., Loewer A., Lahav G.** p53 dynamics control cell fate. *Science*. 2012; (336):1440–1444.
7. **Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008; 9(5):402–412.
8. **Voropaeva O.F., Gavrilova K.S.** Mathematical modelling for the functioning of the p53 signaling pathway following DNA damage. I. The model of activation of the p53–Mdm2–Wip1 system. *Computational Technologies*. 2021; 26(6):33–53. DOI:10.25743/ICT.2021.26.6.004. (In Russ.)
9. **Voropaeva O.F., Tsgoev Ch.A.** A numerical model of inflammation dynamics in the core of myocardial infarction. *Journal of Applied and Industrial Mathematics*. 2019; 13(2):372–383.
10. **Voropaeva O.F., Bayadilov T.V.** A mathematical model of aseptic inflammation dynamics. *Journal of Applied and Industrial Mathematics*. 2020; 14(4):779–791.
11. **Senotrusova S.D., Voropaeva O.F., Shokin Yu.I.** Application of minimal mathematical models for the dynamics of the signaling pathway of the p53–miRNA to the analysis of laboratory data. *Computational Technologies*. 2020; 25(6):4–49. DOI:10.25743/ICT.2020.25.6.002. (In Russ.)
12. **Myshkis A.D.** General theory of differential equations with a delayed argument. *Achievements of Mathematical Sciences*. 1949; (4):99–141. (In Russ.)
13. **El'sgol'ts L.E., Norkin S.B.** Vvedenie v teoriyu differentsial'nykh uravneniy s otklonyayushchimsya argumentom [Introduction to the theory of differential equations with a deviating argument]. Moscow: Nauka; 1971: 296. (In Russ.)
14. **Oran E.S., Boris J.P.** Numerical simulation of reactive flow. N.Y.: Elsevier Science Publishing Co.; 1987: 529.
15. **Zhang T., Brazhnik P., Tyson J.J.** Exploring mechanisms of the DNA-Damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. *Cell Cycle*. 2007; 6(1):85–94. DOI:10.4161/cc.6.1.3705.
16. **Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz Sh., Milo R., Sigal A., Dekel E., Yarnitzky T., Liron Yu., Polak P., Lahav G., Alon U.** Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular Systems Biology*. 2006; 2(1). Article No. 2006.0033. DOI:10.1038/msb4100068.
17. **Gogada R., Amadori M., Zhang H., Jones A., Verone A., Pitarresi J., Jandhyam S., Prabhu V., Black J.D., Chandra D.** Curcumin induces Apaf-1-dependent, p21-mediated caspase activation and apoptosis. *Cell Cycle*. 2011; 10(23):4128–4137.