



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za naravoslovje  
in matematiko

# **Simulacija vpliva različnih inhibitorjev encima fosfodiesteraze 5 na produkcijo cikličnega gvanozin monofosfata**

Diplomski seminar na študijskem programu 1. stopnje Fizika

Katarina Meštrović

Mentor: doc. dr. Aleš Fajmut

Maribor, 2022

MEŠTROVIĆ, K.: Simulacija vpliva različnih inhibitorjev encima fosfodiesteraze 5 na produkcijo cikličnega gvanozin monofosfata

Diplomski seminar, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za fiziko, 2022.

## POVZETEK

V diplomskem seminarju preučujemo vpliv inhibitorjev encima fosfodiesteraze 5 (PDE5) na produkcijo cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP). S fizikalno-matematičnim modelom za sintezo in razgradnjo cGMP simuliramo vpliv štirih inhibitorjev PDE5 (sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil), tako da že obstoječ model nadgradimo s farmakokinetičnim modelom oralne aplikacije inhibitorjev PDE5. S tem modelom napovemo, kako inhibitorji PDE5 vplivajo na molarno koncentracijo cGMP v gladki mišični celici v odvisnosti od časa. Rezultati modela kažejo, da ima avanafil zaradi svojih farmakokinetičnih lastnosti in močnega inhibitornega učinka na encim PDE5 tudi največji vpliv na koncentracijo cGMP v gladki mišični celici. Iz simulacij ugotovimo, da ima kombinacija inhibitorjev PDE5 s konstantnim dotokom dušikovega oksida (NO) najmočnejši vpliv na povišano produkcijo cGMP, kar vodi do relaksacije žilnih sten.

Ključne besede: gladka mišična celica, dušikov oksid, ciklični gvanozin monofosfat, fosfodiesteraza 5, inhibitorji fosfodiesteraze 5.

## ABSTRACT

In this seminar we study the effects of phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production. We simulate the effect of four PDE5 inhibitors (sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil) on the production and degradation of cGMP. For that reason we upgraded the existing mathematical model with a pharmacokinetic model for oral application of PDE5 inhibitors. We study the effects of PDE5 inhibitors on the molar concentration of cGMP in the smooth muscle cell as a function of time. The results of the model show that avanafil has the greatest effect on cGMP production in the smooth muscle cell because of its pharmacokinetic properties and the strongest inhibition of PDE5. The simulation also shows that the combination of PDE5 inhibitors with a constant NO influx has the strongest effect on the increased cGMP production and thus the relaxation of vessel walls.

Key words: smooth muscle cell, nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, phosphodiesterase 5, phosphodiesterase 5 inhibitors.

## Kazalo vsebine

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1   | Uvod.....   | 1  |
| 2   | Vpliv inhibitorjev PDE5 na signalno pot NO/cGMP ..... | 2  |
| 2.1 | Signalna pot NO/cGMP.....                             | 2  |
| 2.2 | Inhibitorji encima PDE5 .....                         | 3  |
| 2.3 | Farmakokinetične lastnosti inhibitorjev PDE5.....     | 5  |
| 3   | Model sinteze in razgradnje cGMP.....                 | 9  |
| 4   | Rezultati in analiza.....                             | 15 |
| 5   | Zaključek.....  | 21 |
|     | LITERATURA IN VIRI.....                               | 22 |

# 1 Uvod

Ob koncu 19. stoletja je astmatik Henry Hyde Salter opazil, da je močna skodelica kave zmanjšala njegove simptome astme in mu olajšala dihanje [1]. Takrat še ni bilo znano, da je kofein šibki neselektivni inhibitor encima fosfodiesteraze (PDE) in s tem preprečuje krčenje žil, kar povečuje pretok zraka v pljučih [1]. Odkritje majhne signalne molekule cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) leta 1958 je spodbudilo znanstvenike, da podrobneje raziščejo obstoj drugih cikličnih nukleotidov in njihov vpliv na celično fiziologijo [2]. Pet let kasneje so v urinu podgane prvič identificirali molekulo ciklični 3'5' gvanozin monofosfat (cGMP) in opredelili vlogo družine encimov fosfodiesteraze (PDE), ki so sposobni razgraditi molekule cAMP in cGMP [1]. Izkazalo se je, da član te družine PDE5 specifično razgrajuje cGMP, ki je ključna molekula v mehanizmu sprostitve gladkih mišičnih celic. V raziskovalnem centru Pfizer so ustanovili skupino znanstvenikov, ki so začeli podrobneje raziskovati lastnosti in prisotnost encima PDE5 [3]. Ugotovili so, da je encim PDE5 prisoten tudi v gladkih mišičnih celicah pljuč in trombocitih. Sprva je bil cilj raziskav razviti zdravilo za angino pectoris. Med kliničnimi študijami so spremenili smer raziskovanja, saj so na moških prostovoljcih opazili erektilni učinek in odkrili, da je encim PDE5 prisoten v gladkih mišicah tkiva moškega spolnega organa (lat. *corpus cavernosum*) [3]. Takrat so razvili močni selektivni inhibitor encima PDE5, danes znan kot sildenafil [3] in s tem naredili učinkovito zdravilo proti erektilni disfunkciji, ki je bilo odobreno za uporabo pod imenom Viagra. V klinični praksi se danes po svetu poleg Sildenafilila, ki je učinkovina Viagra, uporabljajo številni drugi inhibitorji PDE5, kot so vardenafil, tadalafil in avanafil. Razlikujejo se po jakosti inhibicije encima PDE5, farmakokinetiki in specifičnosti inhibicije PDE5 v primerjavi z drugimi PDE .

Cilj diplomskega seminarja je sklopiti fizikalno-matematični model sinteze in razgradnje cGMP in ga nadgraditi z učinkovanjem štirih različnih inhibitorjev encima PDE5: sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil na ta proces, ter z modelom nato med seboj primerjamo učinke naštetih inhibitorjev na ravni količine cGMP v gladkih mišičnih celicah žil po oralnem doziranju. Preučujemo vpliv inhibitorjev na koncentracijo cGMP v odvisnosti od časa glede na jakost inhibicije in farmakokinetični profil posameznih inhibitorjev.

V drugem poglavju diplomskega seminarja opišemo vlogo dušikovega oksida (NO) v mehanizmu sinteze cGMP. Opišemo tudi farmakokinetične lastnosti in vpliv inhibitorjev encima PDE5 sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil na raven cGMP v signalni poti NO/cGMP. V tretjem poglavju predstavimo model sinteze in razgradnje cGMP ter farmakodinamične lastnosti inhibitorjev encima PDE5, kot so moč inhibicije in selektivnost. V četrtem poglavju predstavimo rezultate modela in jih analiziramo.

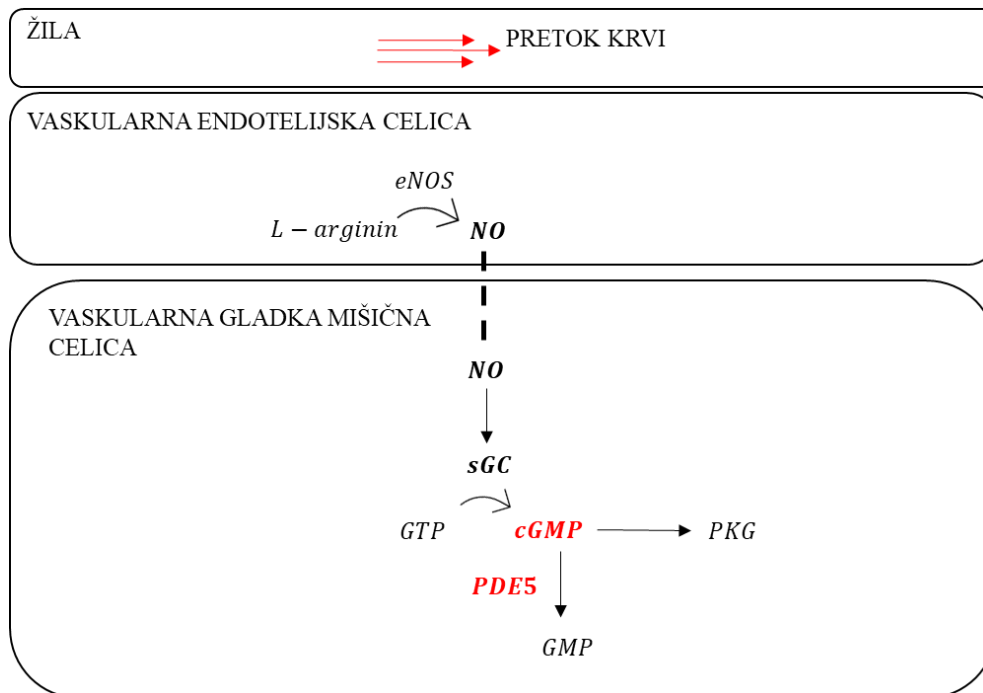
## 2 Vpliv inhibitorjev PDE5 na signalno pot NO/cGMP

V tem poglavju najprej opišemo biološko ozadje signalnega mehanizma NO/cGMP, ki vključuje aktivacijo encima topna gvanilat ciklaza (sGC), ki sintetizira cGMP. Nato nadaljujemo z opisom procesov razgradnje cGMP in preučujemo farmakokinetični profil štirih različnih inhibitorjev encima PDE5.

### 2.1 Signalna pot NO/cGMP

Za večino tkiv v telesu je ključnega pomena oskrba s snovmi preko krvnega obtoka. Pri reguliranju pretoka snovi iz krvi v tkivo in iz njega imajo pomembno vlogo endotelijske celice [4]. Endotelijske celice se oblikujejo v plast z debelino ene celice imenovano endotelij. Ta obloga notranjost vseh žil v človeškem telesu in tako tvori pregrado med žilami in tkivom [4]. Endotelij, ki je v neposrednem stiku s krvjo v žilah, imenujemo vaskularni endotelij [5]. Ta je v žilni steni povezan s sosednjo plastjo vaskularnih gladkih mišičnih celic, ki uravnava krvni pretok tako, da oži in širi premer žil [5]. Slika 1 prikazuje shemo signalne poti NO/cGMP, ki poteka deloma v vaskularni endotelijski celici in deloma v vaskularni gladki mišični celici. V endotelijski celici se iz aminokisliline L-arginin s pomočjo encima endotelijska sintaza NO (eNOS) producira NO. eNOS se aktivira ob nevronskih dražljajih ali s povišano strižno napetostjo krvi na stene žil [6]. Plin NO je zelo reaktiven in v velikih količinah toksičen, v biologiji pa deluje tudi kot pomemben regulator krvnega tlaka ter je ključen za sprostitvev gladkih mišic. NO zelo hitro (v nekaj milisekundah) difundira iz endotelijske v sosednjo vaskularno gladko mišično celico, kjer aktivira encim sGC s tem, da se veže na hem encima. Encim sGC je heterodimer, sestavljen iz ene  $\alpha$  in ene  $\beta$  podenote [7]. Njegova vloga je kataliza pretvorbe gvanozin trifosfata (GTP) v cGMP [6]. Z NO aktiviran encim se po procesu katalize deaktivira, s tem da preide nazaj v osnovno bazalno stanje. Aktivacija in deaktivacija sGC traja le približno 500 ms [8], saj je hem sGC zelo selektiven za vezavo NO. To je pomembno, saj ima NO zelo kratek razpolovni čas [9]. Vezava NO na sGC omogoča hitro sintezo signalne molekule cGMP, ki nadalje regulira procese, ki vodijo do sproščanja gladke mišične celice. Eden od načinov je, da cGMP aktivira encim protein kinaza G (PKG). Ta vpliva na mehanizme, ki vodijo do zmanjševanja znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov [ $Ca^{2+}$ ] [9]. Regulira membranske proteine, tako da poveča prepustnost kanalov, ki prepuščajo kalijeve ione ( $K^+$ ) [7]. Posledica tega je znižanje mirovnega membranskega potenciala oz. hiperpolarizacija, zato se drugi napetostno regulirani kanali zaprejo, med drugim tudi tisti za [ $Ca^{2+}$ ]. Znižanje [ $Ca^{2+}$ ] vodi do sproščanja vaskularne gladke mišične celice, s tem do razširitve krvne žile (vazodilatacija) in posledično do zmanjšane upornosti žil, lahko pa tudi do povečanega krvnega pretoka. Življenjska doba cGMP je odvisna predvsem od aktivnosti encima PDE5, ki cGMP razgrajuje v neciklično obliko, torej GMP. Encim PDE5 je eden izmed enajstih izoencimov iz družine cikličnih nukleotidnih fosfodiesteraz (PDE) [10]. Vloga encimov PDE je razgradnja fosfatnih vezi v signalnih molekulah cikličnega adenozin monofosfata (cAMP) in cGMP. Večina celic v našem telesu vsebuje enega ali več izoencimov iz družine PDE, ki so strukturno podobni, a se razlikujejo po aktivnosti in selektivnosti za cAMP in cGMP [10]. Prav ta različna

izraženost in razlike v funkciji izoencimov jih dela zanimive za tarčne farmakološke učinkovine, ki pa morajo prav tako učinkovati selektivno. Naloga vseh farmakoloških učinkovin pa je inhibicija PDE, s čimer se v celicah ohranja povišana koncentracija cAMP in/ali cGMP [10]. Izoencim PDE5 je specifičen, saj pretežno razgrajuje le cGMP in se nahaja v izbranih tkivih, med drugim tudi v corpus cavernosum. Inhibitorji PDE5 se vežejo na aktivno mesto encima in s tem preprečijo razpad cGMP, kar vodi do relaksacije žilnih sten.

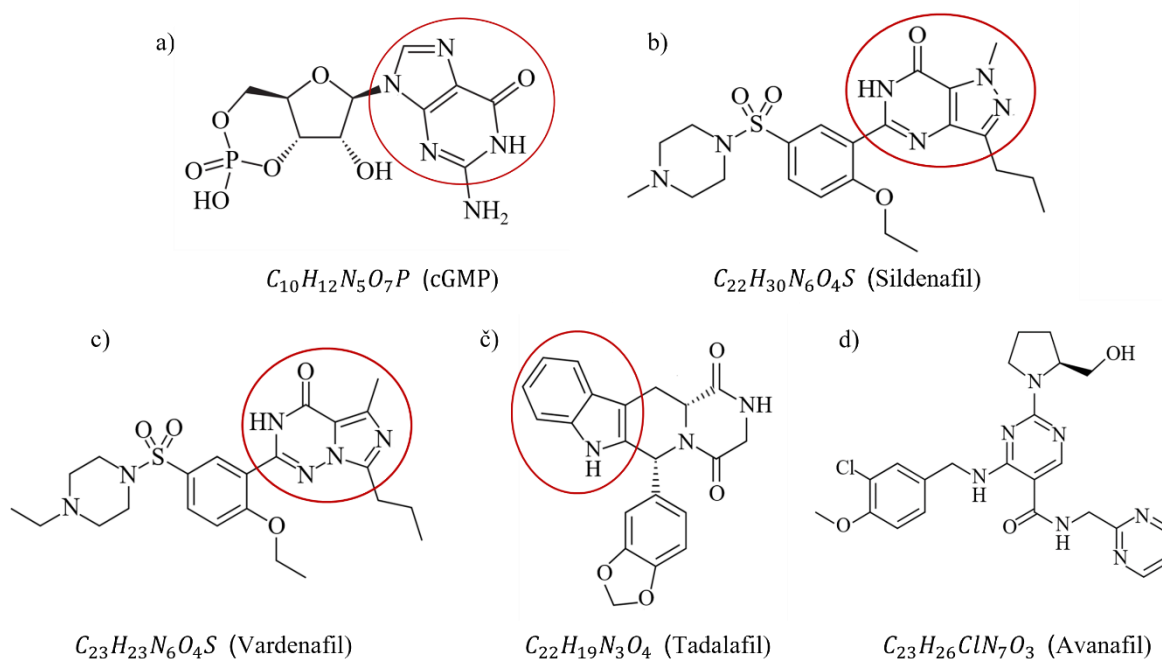


Slika 1: Poenostavljena shema signalne poti NO/cGMP. Strižna sila krvi aktivira encim endotelijska NO sintaza (eNOS), ki proizvaja dušikov oksid (NO). Ta difundira v gladko mišično celico, kjer aktivira encim topna gvanilat ciklaza (sGC) in s tem proizvodnjo cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP) iz gvanozin trifosfata (GTP). Po drugi strani encim fosfodiesteraza 5 (PDE5) razgrajuje cGMP v GMP. cGMP je aktivator encima protein kinaza G (PKG), ki v celici regulira procese, ki vodijo do relaksacije gladke mišične celice. Povzeto po [6].

## 2.2 Inhibitorji encima PDE5

Encimi PDE5 so pri sesalcih prisotni v gladkih mišičnih celicah številnih različnih tkiv, kot so *corpus cavernosum*, ožilje pljuč, ledvic, mehurja in trebušne slinavke [11]. Inhibitorji PDE5 imajo največji učinek na relaksacijo žil v *corpus cavernosum*, kjer je ta encim tudi v največji meri izražen, hkrati pa ima signalna pot NO/cGMP tudi največjo vlogo pri relaksaciji žil, ki je potrebna za normalno erektilno funkcijo. Vzroki za erektilno disfunkcijo so najpogosteje kardiovaskularne bolezni, stres, tesnoba, sladkorna bolezen, starost in bolezni ledvic [12]. V veliki meri te bolezni vplivajo tudi na delovanje signalne poti NO/cGMP v njenih različnih delih in s tem preprečujejo sprostitvev gladkih mišičnih celic v *corpus cavernosum*. Obstaja več različnih farmakoloških učinkovin, ki so inhibitorji PDE5. Mednje spadajo sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil.

Ti inhibitorji pa se ne uporabljajo le za odpravljanje erektilne disfunkcije, temveč jih v kliničnih študijah na ljudeh že testirajo tudi za zdravljenje pljučne hipertenzije, ki je življenjsko ogrožajoča bolezen, saj povzroča povišan krvni tlak zaradi povečanega vaskularnega upora v arterijah pljuč [9]. Za zdravljenje pljučne hipertenzije se v klinični praksi uporablja terapija vdihavanja NO, ki pa ima kratko razpolovno življenjsko dobo, zato je za učinkovito zdravljenje potrebno večkratno doziranje [11]. Namesto vdihavanja NO se zato za zdravljenje pljučne hipertenzije vedno bolj uporablja doziranje inhibitorjev PDE5. Kot najbolj učinkovita inhibitorja PDE5 za zdravljenje pljučne hipertenzije sta se izkazala sildenafil in tadalafil, ki povzročita vazodilatacijo pljučnih arterij in posledično zmanjšata arterijski tlak in upor pljučnih žil [13]. Obširna prisotnost encima PDE5 v vseh gladkih mišičnih celicah omogoča potencialno klinično uporabo inhibitorjev PDE5 tudi za zdravljenje drugih bolezni, kjer igra pomembno vlogo signalni mehanizem NO/cGMP. Vloga cGMP je tudi zelo pomembna v palčkah na mrežnici očesa.



Slika 2. Kemijske formule in strukture za a) molekulo cGMP, b) sildenafil, c) vardenafil, č) tadalafil, in d) avanafil. Molekularne strukture inhibitorjev PDE5, ki so podobne strukturi molekule cGMP, so rdeče obkrožene. Povzeto po [12].

Slika 2 prikazuje kemijske formule ter strukture molekule cGMP in inhibitorjev PDE5. Kemijske strukturne razlike med inhibitorji PDE5 so razmeroma majhne. Deli molekul imajo podobno strukturo kot cGMP, saj se vežejo na isto mesto na encim in tekmujejo s cGMP za vezavo na PDE5. cGMP je ciklični nukleotid, ki vsebuje dušikovo bazo gvanin in dve ciklično povezani funkcionalni skupini: sladkorno in fosfatno skupino. PDE5 razgrajuje cGMP v linearni neaktivni 5'-GMP tako, da hidrolizira in pretrga fosfatne vezi v molekuli cGMP. Encimi PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 in PDE11 lahko hidrolizirajo tako cAMP kot tudi cGMP. Encimi PDE5, PDE6 in PDE9 pa so specifični samo za razgradnjo cGMP. Kompetitivni selektivni inhibitorji encima PDE5 vsebujejo tri strukturne lastnosti, ki omogočajo učinkovito vezavo na encim: vsebujejo vez, podobno fosfatni vezi, imajo osnovno zgradbo podobno dušikovi bazi

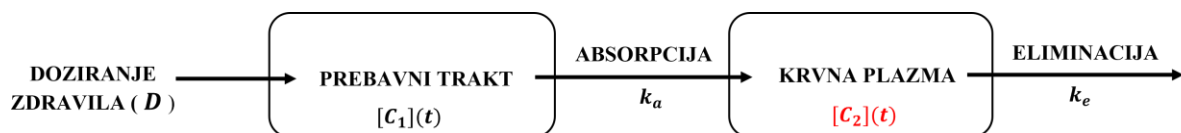
gvaninu in vsebujejo sladkorno skupino, podobno ribozi ali deoksiribozi. Sildenafil, vardenafil in tadalafil imajo skupni obročni sistem, ki vsebuje dušik in ima podobnosti s purinskim obročem cGMP (na sliki 2 obkroženo z rdečo). Avanafil se od ostalih inhibitorjev PDE5 v kemijski strukturi nekoliko razlikuje, saj namesto sladkorne in fosfatne skupine, vsebuje atom klora (Cl) ter metoksi skupino. Kljub temu, da so kemijske strukture inhibitorjev PDE5 podobne, se zelo razlikujejo po svojih farmakokinetičnih lastnostih.

### 2.3 Farmakokinetične lastnosti inhibitorjev PDE5

Farmakokinetika je znanstvena veda, ki proučuje časovne odvisnosti zdravilnih učinkovin v krvi in tkivih, ki so posledica procesov absorpcije, porazdelitve, metabolizma in eliminacije učinkovine. Zdravila za erektilno disfunkcijo se medsebojno razlikujejo po farmakokinetičnih lastnostih, kot so maksimalna koncentracija učinkovine v krvni plazmi ( $C_{max}$ ), čas, potreben za doseg maksimalne koncentracije učinkovine v krvi ( $t_{max}$ ), razpolovni čas, potreben za eliminacijo ene polovice maksimalne koncentracije učinkovine ( $t_{1/2}$ ) iz sistema in površina pod krivuljo ( $AUC$ ) časovne odvisnosti koncentracije učinkovine v krvni plazmi. Slednja je merilo za biološko razpoložljivost zdravila. Inhibitorje PDE5 v telo apliciramo oralno v obliki tablet, zato njihovo delovanje analiziramo z dvoshrambnim modelom oralnega doziranja zdravila (slika 3). Rešitev tega modela je časovna odvisnost koncentracije učinkovine v krvni plazmi ( $[C_2](t)$ ):

$$[C_2](t) = \frac{k_a F D}{M V (k_a - k_e)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}), \quad (1)$$

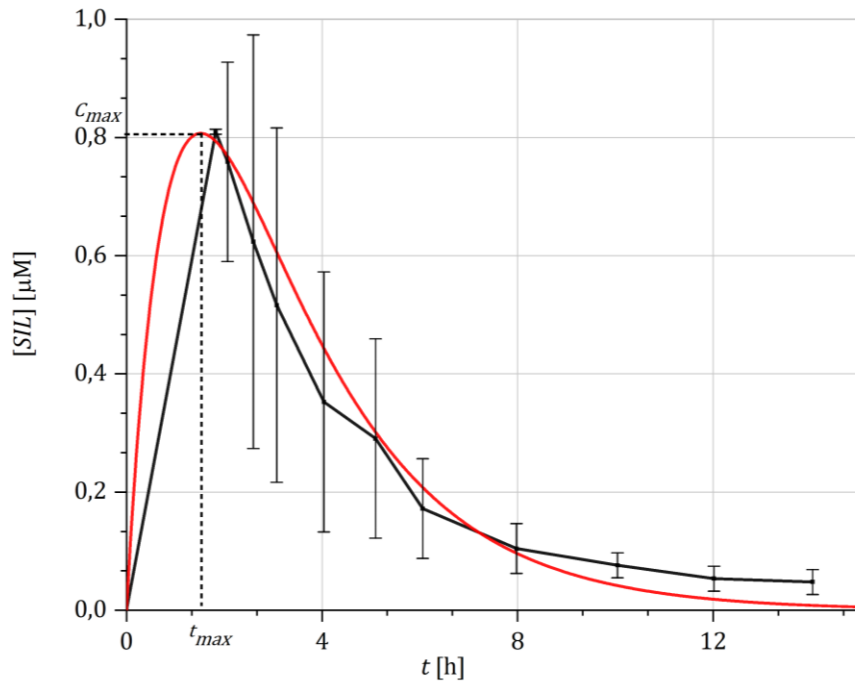
kjer je  $k_a$  koeficient absorpcije,  $F$  delež v kri absorbiranega zdravila iz prebavil,  $D$  doza zdravila,  $M$  molekulska masa inhibitorja,  $V$  navidezni volumen porazdelitve učinkovine in  $k_e$  koeficient eliminacije.



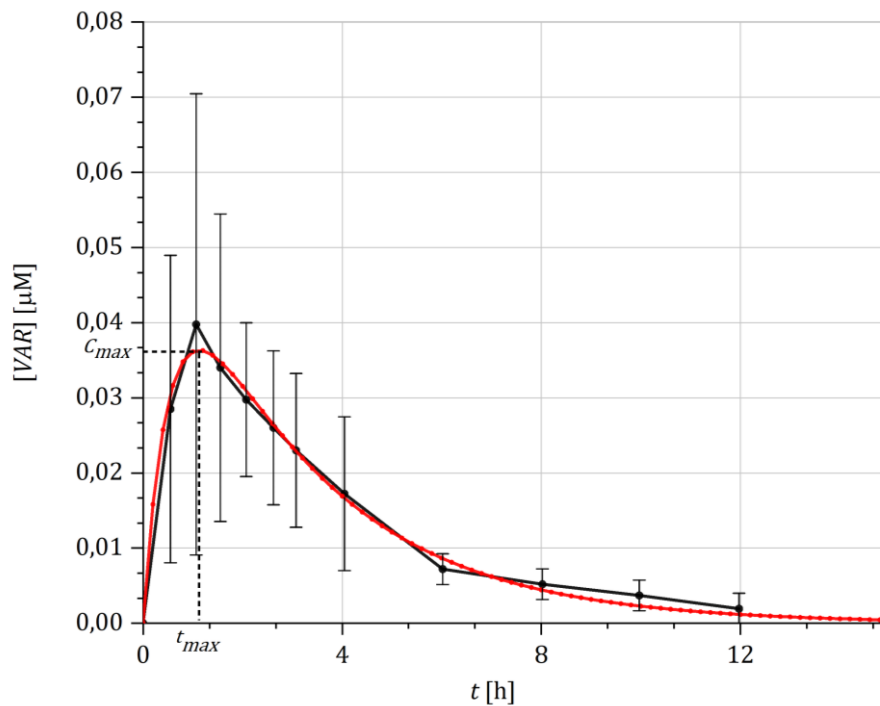
Slika 3. Shema dvoshrambnega modela oralne aplikacije zdravila. Zdravilna učinkovina z dozo  $D$  se iz prebavnega trakta absorbira v krvno plazmo in nato eliminira.  $C_1(t)$  predstavlja koncentracijo zdravila v odvisnosti od časa v prebavnem traktu,  $k_a$  hitrostni koeficient absorpcije zdravila iz prebavnega trakta v krvno plazmo,  $C_2(t)$  koncentracijo zdravilne učinkovine v krvni plazmi v odvisnosti od časa ter  $k_e$  hitrostni koeficient eliminacije zdravila iz krvne plazme.

Z enačbo (1) analiziramo izmerjene časovne poteke koncentracij posameznih inhibitorjev encima PDE5 v krvni plazmi. To so sildenafil (slika 4), vardenafil (slika 5), tadalafil (slika 6) in avanafil (slika 7). Farmakokinetične parametre ( $k_a$ ,  $k_e$  in  $V/F$ ) inhibitorjev PDE5 (tabela 1) določimo z metodo najmanjših kvadratov tako, da enačbo (1) za posamezne inhibitorje prilagodimo izmerjenim vrednostim iz raziskav, izvedenih na zdravih moških osebah, starih med 19 in 45 let [14-17].

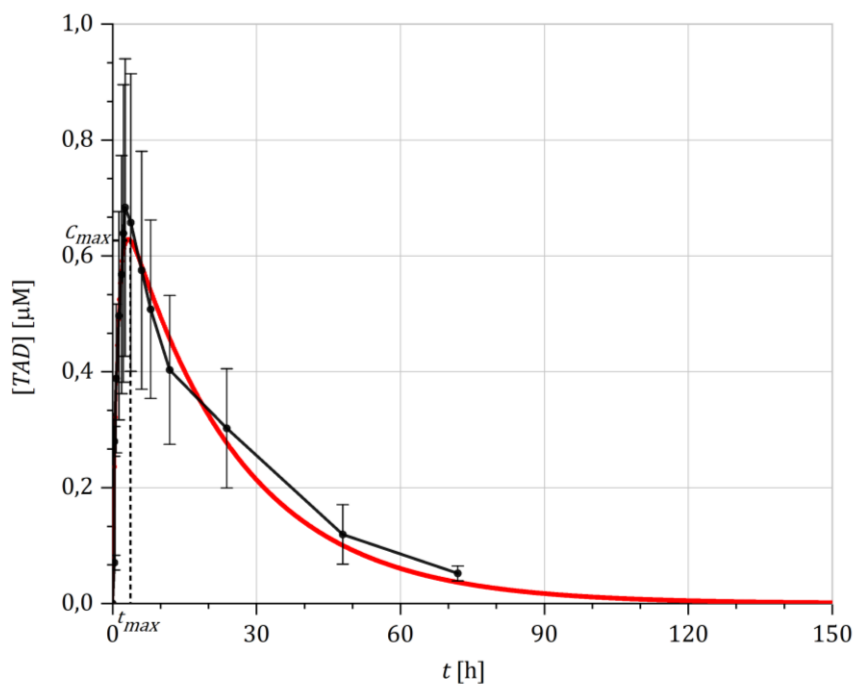




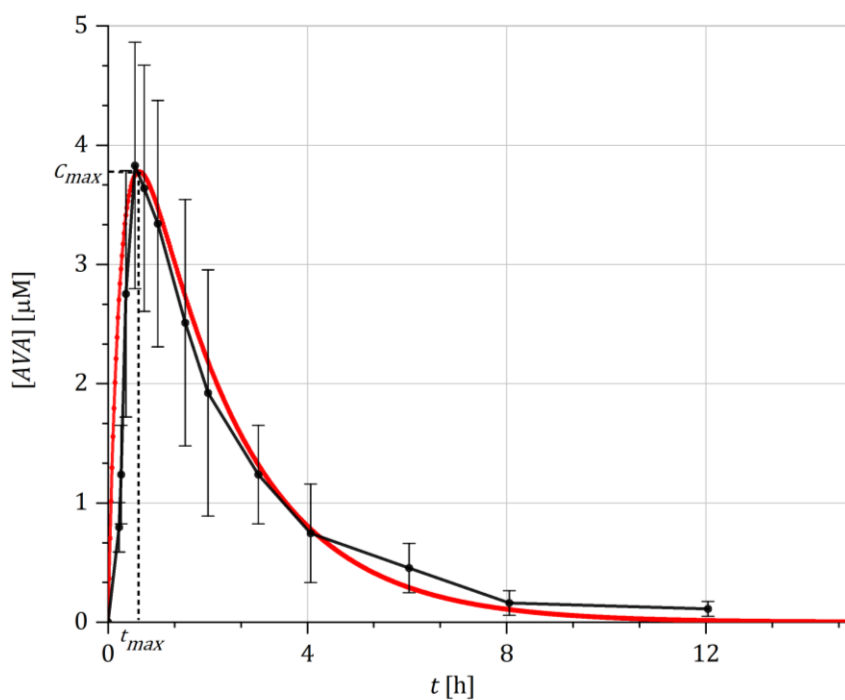
Slika 4. Molarna koncentracija sildenafilila [*SIL*] v krvni plazmi v odvisnosti od časa (*t*) za oralno dozo 100 mg. Rdeča krivulja je prilagojena izmerjenim vrednostim [17], ki so zgolj povezane s črno črto.  $C_{max}$  je maksimalna koncentracija sildenafilila v krvni plazmi,  $t_{max}$  je čas potreben za doseg  $C_{max}$ .



Slika 5. Molarna koncentracije vardenafila [*VAR*] v krvni plazmi v odvisnosti od časa (*t*) za oralno dozo 20 mg. Rdeča krivulja je prilagojena izmerjenim vrednostim [14], ki so zgolj povezane s črno črto.  $C_{max}$  je maksimalna koncentracija vardenafila v krvni plazmi,  $t_{max}$  je čas potreben za doseg  $C_{max}$ .



Slika 6. Molarna koncentracija tadalafila [TAD] v krvni plazmi v odvisnosti od časa ( $t$ ) za oralno dozo 20 mg. Rdeča krivulja je prilagojena izmerjenim vrednostim [16], ki so zgolj povezane s črno črto.  $C_{max}$  je maksimalna koncentracija tadalafila v krvni plazmi,  $t_{max}$  je čas potreben za doseg  $C_{max}$ .



Slika 7. Molarna koncentracija avanafila [AVA] v krvni plazmi v odvisnosti od časa ( $t$ ) za oralno dozo 100 mg. Rdeča krivulja je prilagojena izmerjenim vrednostim [15], ki so zgolj povezane s črno črto.  $C_{max}$  je maksimalna koncentracija avanafila v krvni plazmi,  $t_{max}$  je čas potreben za doseg  $C_{max}$ .

Farmakokinetični parametri vseh štirih inhibitorjev, ki so pridobljeni s prilagajanjem enačbe (1), ki izhaja iz dvoshrambnega farmakokinetičnega modela za oralno doziranje so prikazani v tabeli 1.

| Inhibitor <i>PDE5</i> | $k_a$ [ $\text{h}^{-1}$ ] | $k_e$ [ $\text{h}^{-1}$ ] | $V/F$ [L] | $AUC$ [ $\mu\text{M h}$ ] |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|---------------------------|
| sildenafil            | 1,88                      | 0,38                      | 105       | 3,55                      |
| vardenafil            | 1,85                      | 0,33                      | 772       | 0,15                      |
| tadalafil             | 1,00                      | 0,0040                    | 71        | 16,8                      |
| avanafil              | 0,50                      | 3,70                      | 40        | 14,1                      |

Tabela 1. Farmakokinetični parametri inhibitorjev encima *PDE5*, pridobljeni s prilagajanjem enačbe (1) izmerjenim vrednostim, kjer je  $k_a$  koeficient absorpcije,  $k_e$  koeficient eliminacije in  $V/F$  navidezni volumen ( $V$ ), deljen z deležem v krvi absorbirane učinkovine ( $F$ ).  $AUC$  je površina pod krivuljo časovne odvisnosti molarne koncentracije zdravilne učinkovine v krvni plazmi in je osnova za izračun biološke razpoložljivosti.

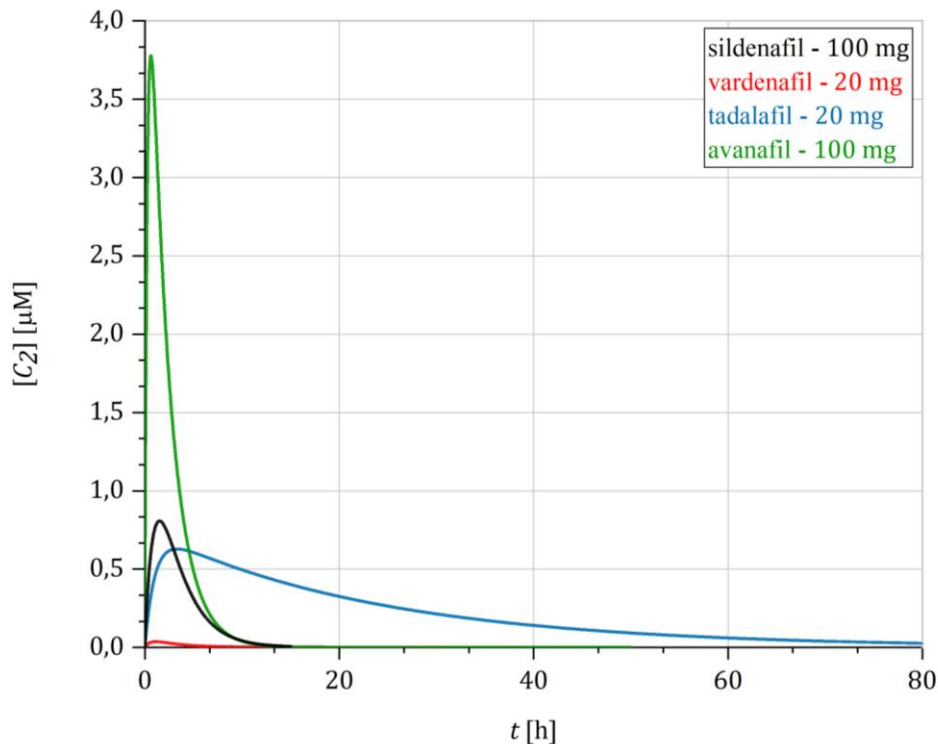
Iz tabele 1 je razvidno, da se v kri najhitreje absorbira sildenafil, saj največjo koncentracijo v krvni plazmi doseže med 30 in 120 minutami po oralni uporabi na prazen želodec. Klinične študije so dokazale, da se  $t_{max}$  in  $C_{max}$  zmanjšata za približno 60 min oziroma 29%, če so obložene tablete sildenafilu zaužite skupaj s hrano [18]. Avanafil se najhitreje eliminira iz krvi, medtem ko se tadalafil daleč najpočasneje. Navidezni volumen, deljen z deležem v krvi absorbirane učinkovine ( $V/F$ ), je prvi indikator dobre ali slabe biološke razpoložljivosti učinkovine. Višja kot je ta vrednost, slabša je biološka razpoložljivost. To lahko vidimo pri primerjavi sildenafilu in vardenafilu, ki imata zelo podobne hitrostne konstante eliminacije in absorpcije, a se razlikujeta po parametru  $V/F$ .

| Inhibitor <i>PDE5</i> | $D$ [mg] | $C_{max}$ [ $\mu\text{M}$ ] | $t_{max}$ [h] | $t_{1/2}$ [h] | $AUC/D$ [ $\mu\text{M h/mg}$ ] |
|-----------------------|----------|-----------------------------|---------------|---------------|--------------------------------|
| sildenafil            | 100      | 0,81                        | 1,50          | 4,40          | 0,03                           |
| vardenafil            | 20       | 0,03                        | 1,10          | 4,20          | 0,0075                         |
| tadalafil             | 20       | 0,62                        | 3,18          | 20,7          | 0,84                           |
| avanafil              | 100      | 3,75                        | 0,60          | 2,60          | 0,14                           |

Tabela 2. Rezultati farmakokinetičnih modelov za inhibitorje fosfodiesteraze 5 (*PDE5*), kjer je  $D$  doza inhibitorja,  $C_{max}$  maksimalna molarna koncentracija inhibitorja v krvni plazmi,  $t_{max}$  čas potreben za doseg  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$  čas potreben za eliminacijo ene polovice maksimalne koncentracije inhibitorja in razmerje  $AUC/D$  biološka razpoložljivost inhibitorja, izražena relativno glede na dozo učinkovine.

Še bolj objektivno pa biološko razpoložljivost opisuje vrednost  $AUC$ , deljena z dozo učinkovine ( $AUC/D$ ) (tabela 2). V tabeli 2 so predstavljeni še parametri  $C_{max}$ , ki je maksimalna

koncentracija inhibitorja v krvni plazmi,  $t_{max}$ , ki je čas potreben za doseg  $C_{max}$ , in  $t_{1/2}$ , ki je čas potreben za eliminacijo ene polovice maksimalne koncentracije inhibitorja. Izmed vseh učinkovin po farmakokinetiki najbolj izstopa tadalafil. Se najpočasneje absorbira in eliminira. Čas potreben za eliminacijo ene polovice koncentracije tadalafila je 20,7 ur. Tadalafil ima približno 6-krat višjo relativno biološko razpoložljivost glede na dozo ( $AUC/D$ ) kot avanafil, 30-krat višjo kot sildenafil in 100-krat višjo kot vardenafil (tabela 2). Po drugi strani, avanafil v najkrajšem času doseže maksimalno koncentracijo v krvni plazmi, ki je skoraj 5-krat večja kot pri sildenafilu pri enaki dozi. Na sliki 7 je prikazana primerjava časovnih odvisnosti molarne koncentracij vseh inhibitorjev PDE5 v krvni plazmi po oralnem doziranju. Iz primerjave je razvidno, da avanafil doseže pri oralni dozi 100 mg najvišjo molarno koncentracijo v krvni plazmi, vardenafil pri dozi 20 mg pa najnižjo. To pa seveda še ne pomeni, da ima avanafil nujno največji, vardenafil pa najmanjši učinek. Farmakokinetični profili podajajo predvsem informacijo o dolžini učinkovanja in biološki razpoložljivosti posameznega zdravila, ne pa tudi o njegovi učinkovitosti. Ta je odvisna od jakosti inhibicije in selektivnosti inhibitorja za posamezni izoenzim, kar je opisano v poglavju 3.



Slika 7. Časovna odvisnost molarne koncentracije inhibitorjev PDE5 ( $[C_2]$ ) v krvni plazmi po oralnem doziranju. V simulaciji so uporabljene tipične terapevtske doze.

### 3 Model sinteze in razgradnje cGMP

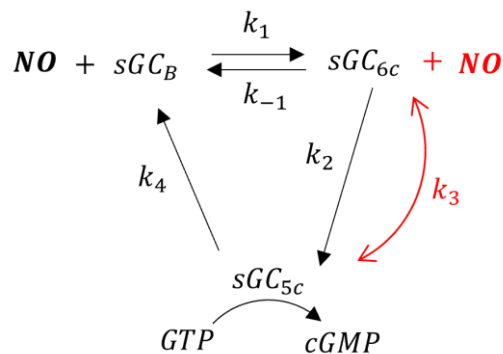
Model sinteze in razgradnje cGMP v gladkih mišičnih celicah žil je že obstoječ fizikalno-matematični model [6, 8], ki opisuje encimsko kinetiko v signalni poti NO/cGMP. Ta model nadgradimo tako, da ga sklopimo s farmakokinetičnimi modeli inhibitorjev PDE5 in

primerjamo njihove učinke na ravni časovne odvisnosti količine cGMP v gladki mišični celici po oralnem doziranju. Model je sestavljen iz 6 diferencialnih enačb prvega reda, ki jih rešujemo numerično v računalniškem programu Berkeley Madonna z metodo Runge-Kutta četrtega reda.

V začetnih študijah je bilo veliko ugibanj in nejasnosti glede vezave NO na encim sGC in njegove aktivacije [19]. Kasneje so ugotovili, da je interakcija NO z encimom sGC zelo kompleksna in hitra ter da vsebuje več vmesnih stanj, ki vodijo do aktivacije encima [19]. Shematsko in poenostavljeno je ta proces prikazan na sliki 8. Sinteza cGMP v gladki mišični celici je odvisna od deleža aktivne oblike sGC ( $sGC_{5C}$ ). Ta oblika nastaja iz bazalne neaktivne oblike ( $sGC_B$ ) preko vmesne oblike  $sGC_{6C}$ , ki nastaja z vezavo NO na neaktivno obliko ( $sGC_B$ ). Oblika  $sGC_{6C}$  se z izomerizacijo ali s ponovno vezavo NO pretvarja v aktivno obliko  $sGC_{5C}$ . V modelu predpostavimo, da se skupna koncentracija encima sGC ( $sGC_0$ ) ohranja, kar opisuje ohranitvena enačba:

$$sGC_B + sGC_{6C} + sGC_{5C} = 1, \quad (2)$$

kjer so  $sGC_B = [sGC_B]/[sGC_0]$ ,  $sGC_{6C} = [sGC_{6C}]/[sGC_0]$  in  $sGC_{5C} = [sGC_{5C}]/[sGC_0]$  relativni deleži posameznih oblik encima.



Slika 8. Kinetična shema aktivacije encima topne gvanilat ciklaze (sGC) v vaskularni gladki mišični celici, kjer je NO dušikov oksid,  $sGC_B$  neaktivna oblika encima sGC,  $sGC_{6C}$  vmesna šest-koordinatna oblika encima sGC,  $sGC_{5C}$  aktivna pet-koordinatna oblika encima,  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  in  $k_4$  pa hitrostne konstante encimskih reakcij. Prehod iz oblike  $sGC_{6C}$  v obliko  $sGC_{5C}$ , ki je odvisen od NO je obarvan rdečo.

Aktivacijo sGC delimo na tri glavne korake. Prvi korak aktivacije je vezava NO na bazalno neaktivno obliko encima  $sGC_B$ , iz katere reverzibilno nastane oblika  $sGC_{6C}$ , kjer sta  $k_1$  in  $k_{-1}$  hitrostni konstanti encimske reakcije. V študijah [6] predpostavljajo, da encim iz oblike  $sGC_{6C}$  v aktivno obliko  $sGC_{5C}$  prehaja po dveh vzporednih poteh, ki predstavljata drugi korak v procesu aktivacije sGC. Ena pot je odvisna od NO ( $k_3$ ), druga pa ne ( $k_2$ ). Prva pot predstavlja spontano izomerizacijo  $sGC_{6C}$  v  $sGC_{5C}$  s hitrostno konstanto  $k_2$ . Proces, ki je odvisen od NO, je ireverzibilna encimska reakcija, ki temelji na Michaelis–Mentenini kinetiki, kjer parameter  $k_3$  predstavlja hitrostno katalitično konstanto v smeri naprej. Tretji korak aktivacije poteka ireverzibilno in je opisan s kinetiko prvega reda. Predstavlja pa prehod iz popolnoma aktivne oblike  $sGC_{5C}$  v neaktivno obliko  $sGC_B$  s hitrostno konstanto  $k_4$ , ki je odvisna od cGMP. Sintezo cGMP iz GTP katalizira le aktivna oblika  $sGC_{5C}$ . Iz ohranitvene enačbe (2) lahko

sklepamo, da je sinteza cGMP največja, ko je relativna koncentracija  $sGC_{5C}$  maksimalna ( $sGC_{5C} = 1$ ). Celoten proces kinetike  $sGC$  opišemo s tremi diferencialnimi enačbami:

$$\frac{dsGC_B}{dt} = -k_1sGC_B[NO] + k_{-1}sGC_{6C} + k_4sGC_{5C} , \quad (3)$$

$$\frac{dsGC_{6C}}{dt} = k_1sGC_B[NO] - k_{-1}sGC_{6C} - k_2sGC_{6C} - k_3sGC_{6C}[NO] , \quad (4)$$

$$\frac{dsGC_{5C}}{dt} = k_3sGC_{6C}[NO] + k_2sGC_{6C} - k_4sGC_{5C} . \quad (5)$$

V našem modelu so začetni pogoji sledeči:  $sGC_B = 1$ ,  $sGC_{6C} = 0$  in  $sGC_{5C} = 0$ . Parameter  $k_4$  je odvisen od koncentracije cGMP, zato ga v modelu zapišemo kot:

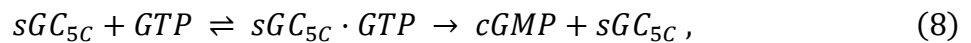
$$k_4 = K_4[cGMP] , \quad (6)$$

kjer je  $K_4$  konstanta, ki določa hitrost pretvorbe iz oblike  $sGC_B$  v  $sGC_{5C}$ .

Vezava  $NO$  na  $sGC$  in kompleksna kinetika celotnega procesa posledično povzroči spremembo v koncentraciji  $NO$ . Model poenostavimo s predpostavko, da  $NO$  difundira v gladko mišično celico zelo hitro, kar simuliramo z začetno koncentracijo  $[NO] = 0,22 \mu M$ , kar bi naj bila tipična vrednost [6]. Eliminacijo oz. razgradnjo v gladki mišični celici simuliramo s kinetiko 1. reda s hitrostno konstanto  $k_{dNO}$ :

$$\frac{d[NO]}{dt} = -k_{dNO}[NO] . \quad (7)$$

V seminarju želimo analizirati predvsem, kako se koncentracija cGMP spreminja s časom in kako hitro potekajo encimske reakcije sinteze in razgradnje molekule cGMP pod vplivom inhibitorjev PDE5. Proces sinteze cGMP lahko opišemo z Michaelis-Mentenino kinetiko [6]:



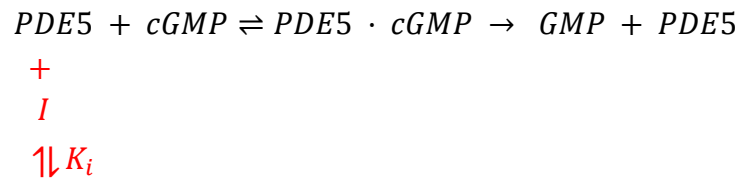
kjer substrat gvanozin trifosfat  $GTP$  in encim  $sGC_{5C}$  skupaj tvorita produkt  $cGMP$ , pri čemer encim  $sGC_{5C}$  ostane nespremenjen.

V modelu upoštevamo poenostavljeno kinetiko in predpostavimo, da je koncentracija  $GTP$  zelo visoka v primerjavi s količino encima, hkrati pa se s časom kaj dosti ne spreminja, zato za sintezo  $cGMP$  upoštevamo le odvisnost od  $sGC_{5C}$  [6]. Hitrost produkcije cGMP ( $v_s$ ) je tako podana z enačbo:

$$v_s = V_{max,sGC}sGC_{5C} , \quad (9)$$

kjer je  $V_{max,sGC}$  največja stopnja aktivnosti  $sGC_{5C}$ .

Vezava encima PDE5 na molekulo cGMP in njegova razgradnja na GMP je prav tako encimska reakcija. Kinetična shema reakcije je prikazana na sliki 9, ki pa vključuje še interakcijo s kompetitivnim reverzibilnim inhibitorjem PDE5 (I).



Slika 9. Shema encimske kinetike z upoštevanjem reverzibilne vezave kompetitivnega inhibitorja (I). Substrat ciklični gvanozin monofosfat (cGMP) in encim fosfodiesteraza 5 (PDE5) tvorita produkt gvanozin monofosfat (GMP). Na encim PDE5 se lahko namesto substrata (cGMP) veže inhibitor (I), ki zavira encimsko reakcijo.  $K_i$  je ravnovesna disociacijska konstanta interakcije inhibitorja (I) z encimom PDE5.

V primeru, ko je inhibitor vezan na encim, je encim neaktiven. Inhibitorji PDE5 so kompetitivni reverzibilni inhibitorji, saj »tekmujejo« z molekulo cGMP za vezavo na isto aktivno mesto na encimu PDE5, njihova vezava z encimom pa je reverzibilna. Hitrost nastajanja produkta ( $d[P]/dt$ ) z upoštevanjem tovrstne inhibicije opišemo z enačbo:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{v_{\max}[S]}{K_m\alpha + [S]}, \quad (10)$$

kjer je  $[P]$  koncentracija produkta,  $v_{\max}$  največja hitrost nastajanja produkta,  $[S]$  koncentracija substrata,  $K_m$  Michaelis-Mentenina konstanta reverzibilne encimske reakcije,  $\alpha$  pa je parameter, ki opisuje jakost inhibicije, in je odvisen od koncentracije inhibitorja in ravnovesne disociacijske konstante za interakcijo inhibitor - encim:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}, \quad (11)$$

kjer je  $[I]$  koncentracija inhibitorja,  $K_i$  pa ravnovesna disociacijska konstanta inhibicije, ki se razlikuje za vsak inhibitor.

Za primer razgradnje cGMP velja:

$$v_d = \frac{V_{\max, PDE5}[cGMP]}{K_m\alpha + [cGMP]}, \quad (12)$$

kjer je  $V_{\max, PDE5}$  največja možna hitrost razgradnje cGMP s hitrostno konstanto  $k_{PDE5}$ , ki jo opišemo s enačbo:

$$V_{\max, PDE5} = k_{PDE5}[cGMP]. \quad (13)$$

V modelu predpostavimo, da je koncentracija PDE5 približno sorazmerna s koncentracijo cGMP ( $[cGMP]$ ). Zato je v enačbi (13)  $V_{\max, PDE5}$  sorazmerna s  $[cGMP]$  [6]. Vrednosti vseh modelnih parametrov so prikazane v tabeli 3.

| Parameter     | Vrednost [6]                             | Opis  |
|---------------|--|---|
| $k_1$         | 2000 [ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] | hitrostne konstante encimskih reakcij                                 |
| $k_{-1}$      | 100 [ $\text{s}^{-1}$ ]                  |   |
| $k_2$         | 0,1 [ $\text{s}^{-1}$ ]                  |   |
| $k_3$         | 3 [ $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]    |   |
| $K_4$         | 0,098 [ $\text{s}^{-1}$ ]                |   |
| $k_{dno}$     | 0,01 [ $\text{s}^{-1}$ ]                 | hitrostna konstanta razgradnje NO                                     |
| $V_{max,SGC}$ | 1,09 [ $\mu\text{M s}^{-1}$ ]            | maksimalna produkcija cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP)          |
| $k_{PDE5}$    | 0,032 [ $\text{s}^{-1}$ ]                | hitrostna konstanta razgradnje cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP) |

Tabela 3. Parametri modela aktivacije topne gvanilat ciklaze (sGC) in produkcije ter razgradnje cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP), ki je opisan z enačbami (3) – (16). Povzeto po [6].

Delovanje inhibitorjev preučujemo tako, da primerjamo hitrost encimske reakcije v odsotnosti in prisotnosti inhibitorja. Jakost inhibicije se določi eksperimentalno tako, da se izbere poljubna konstantna koncentracija substrata  $[S]_0$ , pri kateri se izvede več zaporednih eksperimentov pri različnih koncentracijah inhibitorja  $[I]$ . Ob tem se določi parameter  $IC_{50}$ , ki predstavlja koncentracijo inhibitorja, ki je potrebna za znižanje hitrosti encimske reakcije pri dani konstantni koncentraciji substrata  $[S]_0$  na polovico začetne vrednosti. Disociacijsko konstanto inhibicije ( $K_i$ ) in  $IC_{50}$  povezuje Cheng–Prusoffova enačba:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]_0}{K_m}} \quad (14)$$

Nižja vrednost  $K_i$  pomeni močnejšo inhibicijo, saj je potrebna manjša koncentracija inhibitorja, da se hitrost encimske reakcije prepolovi.

Izmerjene vrednosti  $IC_{50}$  za inhibitorje *PDE5* ob prisotnosti konstante koncentracije substrata ([cGMP]) z vrednostjo  $1 \mu\text{M}$  so prikazane v tabeli 4 in so povzete iz iste reference [20]. Izmerjena vrednost  $K_m$  za *PDE5* je  $2 \mu\text{M}$  [21].



| <i>PDE5</i> inhibitor | $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] | $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ] |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| sildenafil            | $1,6 \cdot 10^{-3}$         | $1,1 \cdot 10^{-3}$     |
| vardenafil            | $0,084 \cdot 10^{-3}$       | $0,056 \cdot 10^{-3}$   |
| tadalafil             | $4,0 \cdot 10^{-3}$         | $2,7 \cdot 10^{-3}$     |
| avanafil              | $5,2 \cdot 10^{-3}$         | $3,5 \cdot 10^{-3}$     |

Tabela 4: Izmerjene vrednosti  $IC_{50}$  za štiri inhibitorje *PDE5*: sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil, povzeto po [20], in preračunane ravnovesne disociacijske konstante  $K_i$ .

Iz vrednosti  $IC_{50}$  in  $K_i$  v tabeli 4 je razvidno, da je vardenafil daleč najmočnejši inhibitor *PDE5*, avanafil pa najšibkejši, pri čemer vrednosti za sildenafil in tadalafil ne odstopata bistveno od slednje. Po drugi strani pa so študije pokazale, da je avanafil visoko selektiven za *PDE5* v primerjavi z drugimi inhibitorji [22]. To je razvidno iz tabele 5, ki prikazuje vrednosti  $IC_{50}$  še za *PDE6* in *PDE11* ter razmerja med  $IC_{50}$  za *PDE6* in *PDE5* ter *PDE11* in *PDE5*. Višja vrednost  $IC_{50}$  za *PDE6* in *PDE11* pomeni večjo selektivnost inhibicije za *PDE5*. Prav tako višje razmerje med  $IC_{50}$  za *PDE6* in *PDE5* ter *PDE11* in *PDE5* pomeni večjo selektivnost za *PDE5*. Zaradi višje selektivnosti za encim *PDE5* avanafil povzroči manj neželenih stranskih učinkov, saj se inhibitor ne veže na podobne izoencime v drugih tkivih. Vardenafil in sildenafil za razliko od avanafila in tadalafila poleg *PDE5* močno inhibirata tudi izoencim fosfodiesterazo 6 (*PDE6*), ki se nahaja v očesni mrežnici, zato lahko povzročita motnje vida. Vardenafil in tadalafil pa nekoliko močnejše inhibirata tudi fosfodiesterazo 11 (*PDE11*), v primerjavi s sildenafilom in avanafilom. Posledice inhibicije *PDE11* pa še niso znane [23].

| Inhibitor <i>PDE5</i> | $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] |              | $\frac{IC_{50}(\textit{PDE6})}{IC_{50}(\textit{PDE5})}$ | $\frac{IC_{50}(\textit{PDE11})}{IC_{50}(\textit{PDE5})}$ |
|-----------------------|-----------------------------|--------------|---|--|
|                       | <i>PDE6</i>                 | <i>PDE11</i> |   |  |
| sildenafil            | $25 \cdot 10^{-3}$          | 7,8          | 16  | 4875   |
| vardenafil            | $1,8 \cdot 10^{-3}$         | 0,5          | 21  | 5952   |
| tadalafil             | 2,2                         | 0,1          | 550   | 25   |
| avanafil              | 0,63                        | > 100        | 121   | > 19 231   |

Tabela 5: Izmerjene vrednosti  $IC_{50}$  inhibitorjev encima fosfodiesteraza 5 (*PDE5*) za encima fosfodiesteraza 6 (*PDE6*), fosfodiesteraza 11 (*PDE11*) in razmerja med  $IC_{50}$  za *PDE6* in *PDE5* ter *PDE11* in *PDE5*. Povzeto po [22].

Model sinteze in razgradnje cGMP sklopimo s farmakokinetičnim modelom inhibitorjev tako, da v enačbi (11) kot koncentracija inhibitorja ( $[I]$ ) nastopajo časovne odvisnosti koncentracij posameznih učinkovin ( $[C_2]$ ), ki jih podaja farmakokinetični model, podan z enačbo (1):

$$\alpha = 1 + \frac{[C_2]}{K_i}. \quad (15)$$

Prav tako v enačbi (11) nastopajo disociacijske konstante ( $K_i$ ), ki pripadajo vsaki posamezni učinkovini in so podane v tabeli 4. Končna enačba, ki opisuje hitrost spreminjanja koncentracije cGMP v odvisnosti od časa pod vplivom inhibitorja, je tako podana:

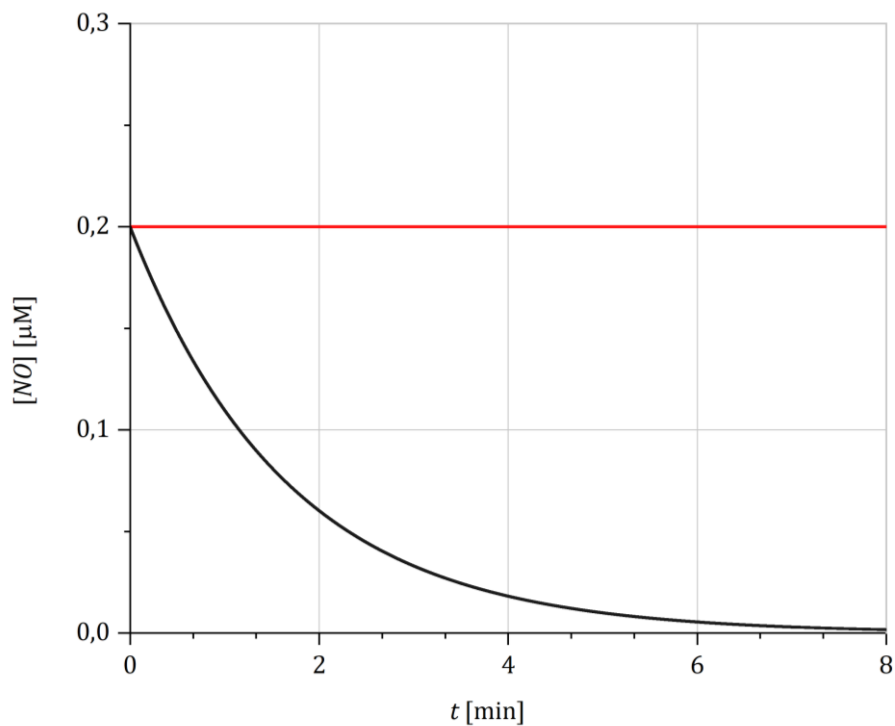
$$\frac{d[cGMP]}{dt} = V_{max,SGC} sGC_{5c} - \frac{V_{max,PDE} [cGMP]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [cGMP]}. \quad (16)$$

## 4 Rezultati in analiza

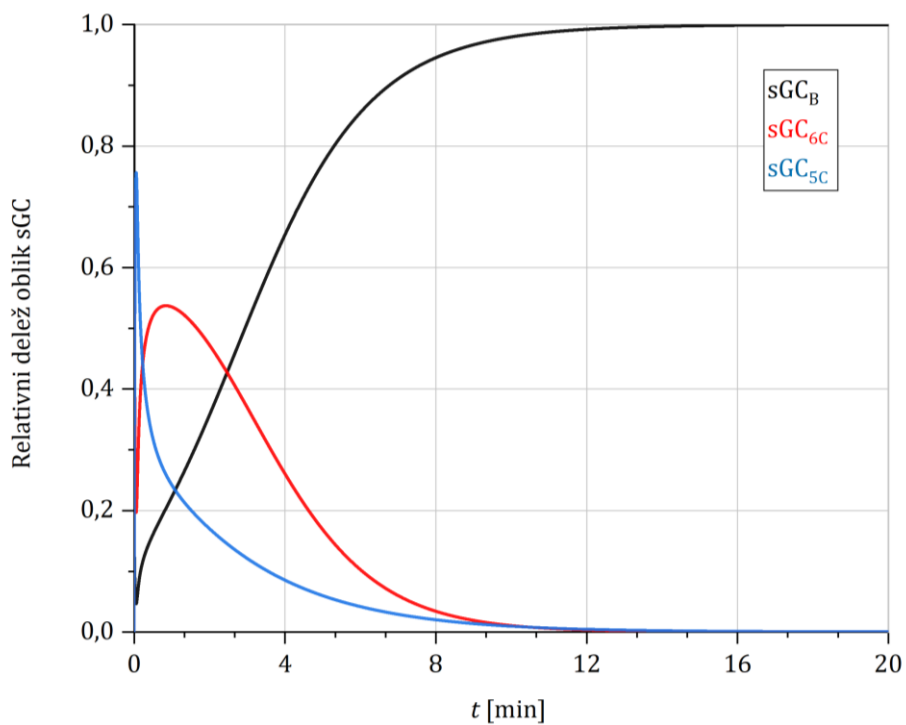
V tem poglavju predstavimo rezultate modela sinteze in razgradnje cGMP. Najprej prikažemo, kako se spreminjajo relativni deleži oblik encima sGC v odvisnosti od časa brez dodatnega inhibitorja PDE5 v primeru, ko koncentracija NO v celici pada in v primeru, ko je konstantna. Nato prikažemo, kako se spreminja molarna koncentracija cGMP v odvisnosti od časa brez prisotnosti inhibitorjev PDE5. Nato simuliramo časovni potek molarne koncentracije cGMP po oralnem doziranju inhibitorjev PDE5. Rezultate, kjer smo upoštevali razgradnjo NO s hitrostno konstanto  $k_{dno}$ , smo primerjali z rezultati, kjer je bila koncentracija NO v celici konstantna, s čimer je simuliran konstanten dotok NO, ki je enak hitrosti eliminacije. Prikazali smo tudi odvisnost molarne koncentracije cGMP od koncentracije NO brez vpliva in pod vplivi inhibitorjev PDE5.

Najprej prikažemo rešitve sistema brez upoštevanja inhibitorjev PDE5. Prikažemo časovne odvisnosti različnih stanj encima sGC in koncentracije cGMP v celici. V enem primeru upoštevamo razgradnjo NO, v drugem pa predpostavljamo, da je NO konstanten. Časovna odvisnost koncentracije NO je za oba primeri prikazana na sliki 10.

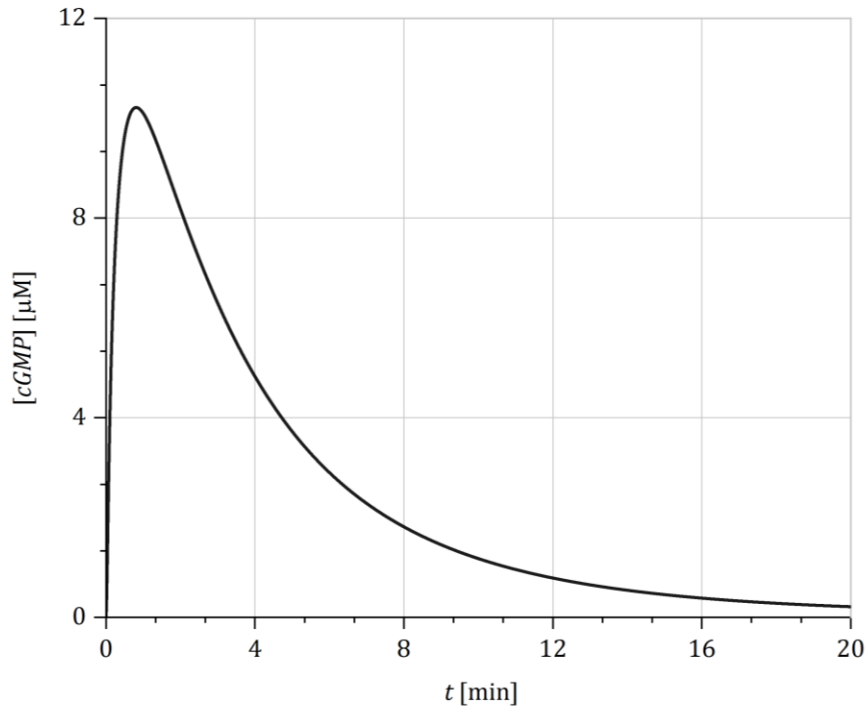
Na sliki 11 so prikazani grafi časovnih odvisnosti relativnih deležev posameznih oblik encima sGC ( $sGC_B$ ,  $sGC_{6c}$  in  $sGC_{5c}$ ) v primeru razgradnje NO pri začetnih pogojih  $sGC_B = 1$ ,  $sGC_{6c} = 0$  in  $sGC_{5c} = 0$ , kar pomeni, da je encim ob času 0 v celoti neaktiven. Slika 11 kaže, da po 15 minutah encim ni več aktiven, kar pomeni, da se vzpostavi začetno stanje. Slika 12 prikazuje sočasno časovno odvisnost koncentracije cGMP v celici, ki doseže vrh pri približno minuti in pol, nakar pade proti vrednosti 0, saj se vrednost koncentracije aktivnega  $sGC_{5c}$  zmanjšuje (slika 11), hkrati pa PDE5 razgrajuje cGMP. V drugem primeru predpostavimo, da je koncentracija NO konstantna ( $[NO] = 0,22 \mu M$ ) in simuliramo časovni potek deležev posameznih oblik sGC, ki je prikazan na sliki 13. Encim sGC iz začetne oblike  $sGC_B$  hitro preide v obliko  $sGC_{5c}$ , ki doseže vrh v prvih 10 sekundah. Po eni minuti pride do ravnovesnega stanja, kjer so vsi deleži konstantni. Ker je pri konstantni koncentraciji  $[NO]$  vezava NO z obliko  $sGC_B$  hitrejša kot prehod iz  $sGC_{6c}$  v  $sGC_{5c}$ , je v ravnovesju delež  $sGC_{6c}$  največji. Slika 14 prikazuje časovno odvisnost koncentracije cGMP, ki v tem primeru naraste do konstantne vrednosti  $12,8 \mu M$ , ki je tipična za gladko mišično celico.



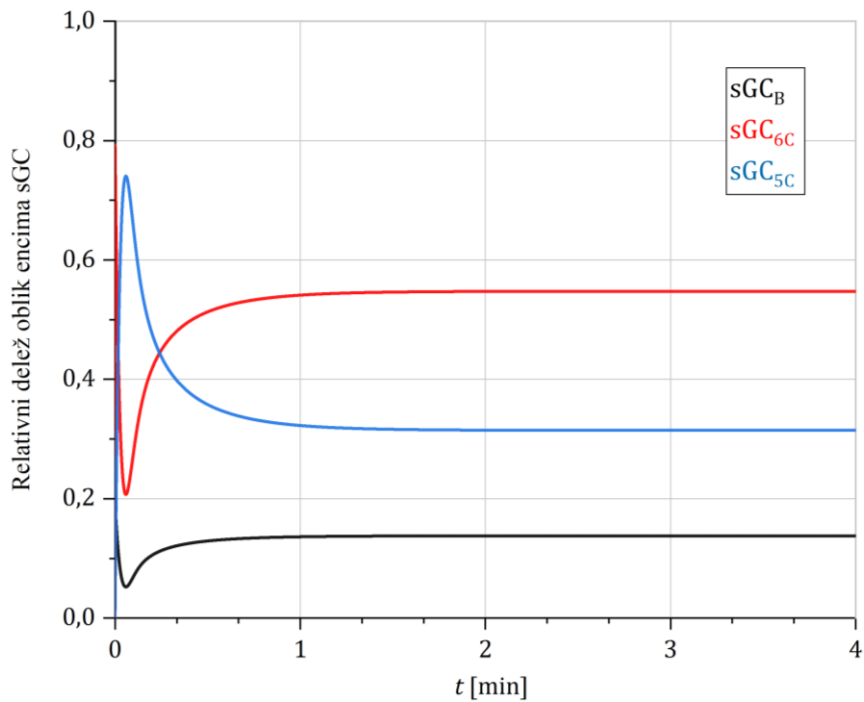
Slika 10. Časovna odvisnost molarne koncentracije dušikovega oksida ( $[NO]$ ). Začetna koncentracija  $NO$  je  $0,22 \mu M$ . Rdeča krivulja predstavlja primer, ko je  $NO$  konstanten, črna krivulja pa primer ko se  $NO$  razgrajuje.



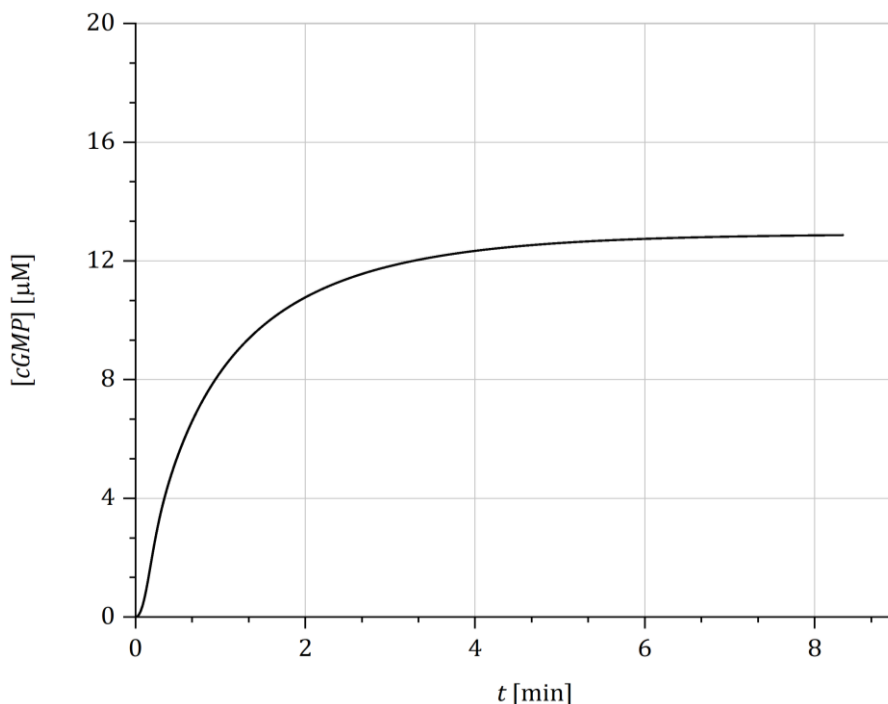
Slika 11. Časovna odvisnost deležev različnih oblik encima topna gvanilat ciklaza (sGC) ob upoštevanju razgradnje dušikovega oksida ( $NO$ ).  $sGC_B$  je neaktivna oblika sGC,  $sGC_{6C}$  je delež šest koordinatne oblike sGC in  $sGC_{5C}$  delež aktivne oblike sGC.



Slika 12. Časovna odvisnost molarne koncentracije cikličnega gvanozin monofosfata ( $[cGMP]$ ) ob upoštevanju razgradnje dušikovega oksida ( $NO$ ).



Slika 13. Časovna odvisnost deležev različnih oblik encima topna gvaniat ciklaza ( $sGC$ ) pri konstantni koncentraciji dušikovega oksida ( $[NO] = 0,22 \mu M$ ).  $sGC_B$  je neaktivna oblika  $sGC$ ,  $sGC_{6C}$  je delež šest koordinatne oblike  $sGC$  in  $sGC_{5C}$  delež aktivne oblike  $sGC$ .

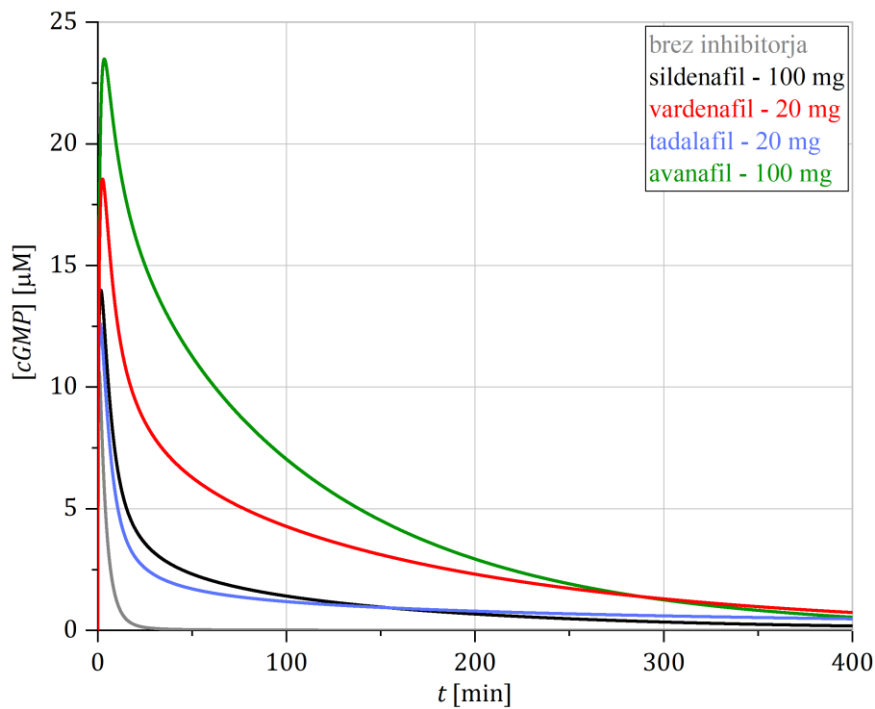


Slika 14. Časovna odvisnost molarne koncentracije cikličnega gvanozin monofosfata ( $[cGMP]$ ) ob konstantni koncentraciji dušikovega oksida ( $[NO] = 0,22 \mu M$ ).

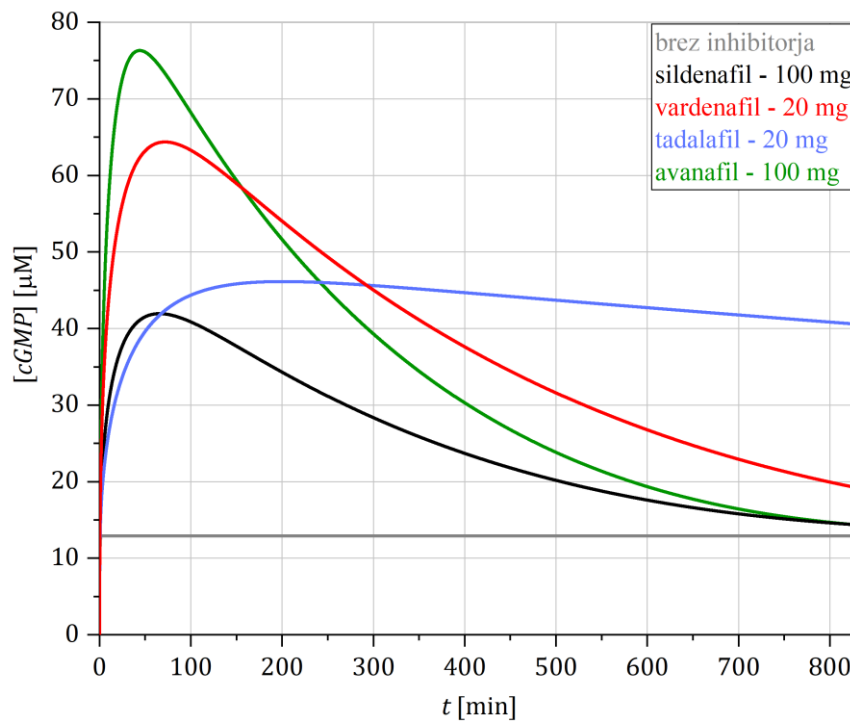
Časovna odvisnost molarne koncentracije cGMP ni odvisna samo od aktivnosti encima sGC in koncentracije NO, temveč tudi od delovanja encima PDE5, ki razgrajuje cGMP v GMP. Analizirali smo, kako se koncentracija cGMP spreminja s časom pod vplivom štirih inhibitorjev PDE5, sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil. Slika 15 prikazuje časovno odvisnost molarne koncentracije cGMP pod vplivom inhibitorjev PDE5 in brez vpliva inhibitorja (siva krivulja) za primer, ko se razgrajuje NO. Razvidno je, da se pod vplivom inhibitorjev PDE5 maksimalna molarna koncentracija cGMP zviša in da se čas razgradnje cGMP podaljša, kar je tudi fiziološko smiselno. Pri doziranju 100 mg avanafila se maksimalna koncentracija cGMP poveča do vrednosti  $23 \mu M$ , kar je največ izmed vseh inhibitorjev. To je v skladu s farmakokinetičnimi lastnostmi avanafila, saj doseže po oralni dozi 100 mg zelo visoko maksimalno koncentracijo v krvni plazmi (tabela 2) in je v primerjavi z ostalimi inhibitorji bolj selektiven za PDE5 encim (tabela 4). Kljub temu, da ima vardenafil pri oralni dozi 20 mg najnižjo maksimalno molarno koncentracijo v krvni plazmi, poveša koncentracijo cGMP do maksimalne vrednosti  $20 \mu M$ . Sildenafil jo zviša do  $13,5 \mu M$ , tadalafil pa do  $12,5 \mu M$ . Vardenafil namreč najmočneje inhibira encim PDE5 ( $IC_{50} = 0,084 \text{ nM}$ ) (tabela 4).

Slika 16 prikazuje simulacijo časovne odvisnosti  $[cGMP]$  pod vplivom inhibitorjev PDE5 pri konstantni koncentraciji NO. Z nje je razvidno, da so maksimalne vrednosti  $[cGMP]$  za posamezne inhibitorje tri do štirikrat višje kot v primeru razgradnje NO (slika 15). Prav tako inhibitorji vplivajo na čas razgradnje cGMP, tako da ga bistveno podaljšajo. Ob odsotnosti inhibitorjev PDE5 doseže koncentracija cGMP maksimalno vrednost  $12,8 \mu M$ , njeno polovično vrednost pa v približno 30 sekund. Iz primerjavah slik 15 in 16 sklepamo, da ima kombinacija

stalnega dotoka NO ob dodatku inhibitorja PDE5 največji učinek na cGMP ter s tem tudi na čas in jakost sprostitve gladkih mišičnih celic.

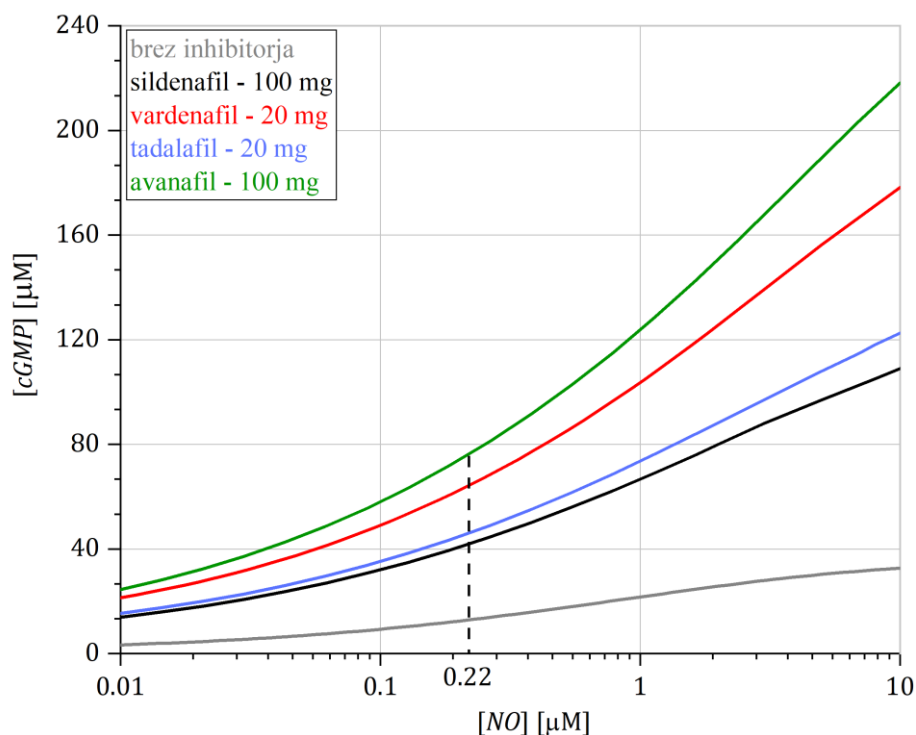


Slika 15. Časovna odvisnost molarne koncentracije cikličnega gvanozin monofosfata ( $[cGMP]$ ) ob upoštevanju razgradnje dušikovega oksida ( $NO$ ) za inhibitorje encima fosfodiesteraza 5 ( $PDE5$ ).



Slika 16. Časovna odvisnost molarne koncentracije cikličnega gvanozin monofosfata ( $[cGMP]$ ) ob konstantni koncentraciji dušikovega oksida ( $[NO] = 0,22 \mu M$ ) za inhibitorje encima fosfodiesteraza 5 ( $PDE5$ ).

Slika 17 prikazuje ravnovesno vrednost  $[cGMP]$  v odvisnosti od konstantne koncentracije NO (črna krivulja), ostale štiri krivulje pa prikazujejo odvisnosti maksimalnih koncentracij cGMP po oralnem doziranju tipičnih doz inhibitorjev PDE5 ter prav tako konstantni vrednosti koncentracije NO. Z grafa je razvidno, da imajo inhibitorji PDE5 velik vpliv na porast  $[cGMP]$  v območju fizioloških koncentracij NO med 0,1 in 10  $\mu\text{M}$ . Nam pa grafi na sliki 17 podajo informacijo le o vplivih inhibitorjev PDE5 na časovni skali približno 1 h, saj ob tem času vrednosti cGMP dosežejo maksimum. Dodatne informacije pa nam poda tudi razpolovni čas, v katerem se vrednost maksimalne koncentracije cGMP prepolovi. To nam pove več o dolgoživosti učinka inhibicije, saj bi se dalo učinek na maksimalno koncentracijo cGMP prilagajati z višjo dozo,  $t_{1/2}$  pa je direktna posledica farmakokinetičnih lastnosti. Po parametru  $t_{1/2}$  daleč prednjači tadalafil, saj pod njegovim vplivom  $[cGMP]$  najpočasneje pada.



Slika 17. Odvisnost molarne koncentracije cikličnega gvanozin monofosfata ( $[cGMP]$ ) od koncentracije dušikovega oksida ( $[NO]$ ) za inhibitorje encima fosfodiesteraza 5 (PDE5).

## 5 Zaključek

V diplomskem seminarju smo obravnavali vpliv štirih inhibitorjev encima fosfodiesteraze 5 (PDE5) na produkcijo cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP). Ti inhibitorji so sildenafil, vardenafil, tadalafil in avanafil. Najprej smo opisali biološko ozadje signalne poti NO/cGMP (slika 1) v vaskularni endotelijski in gladki mišični celici, kjer se sintetizira in razgrajuje cGMP. Nato smo opisali delovanje inhibitorjev PDE5 in njihovo vlogo v zdravljenju erektilne disfunkcije in pljučne hipertenzije. Analizirali smo farmakokinetični profil sildenafil (slika 4), vardenafila (slika 5), tadalafila (slika 6) in avanafila (slika 7) po oralnem doziranju ter izračunali in primerjali farmakokinetične parametre inhibitorjev (tabele 1 in 2). Ugotovili smo, da avanafil z dozo 100 mg doseže najvišjo maksimalno molarno koncentracijo v krvni plazmi, vardenafil z dozo 20 mg pa najnižjo. Rezultati kažejo, da se sildenafil najhitreje absorbira s koeficientom absorpcije  $k_a = 1,88 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ , tadalafil pa se najpočasneje eliminira s koeficientom eliminacije  $k_e = 0,004 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ . S pridobljenimi farmakokinetičnimi parametri smo sklopili že obstoječ fizikalno-matematični model sinteze in razgradnje cGMP s farmakokinetičnimi modeli PDE5 inhibitorjev (enačba 1). Z modelom smo simulirali časovno odvisnost koncentracije cGMP (sliki 12 in 14) ter oblik encima sGC (sliki 11 in 13) ob konstantni koncentraciji NO in ob upoštevanju razgradnje NO (slika 10). Časovno odvisnost molarne koncentracije cGMP smo simulirali brez vpliva inhibitorja (sliki 12 in 14). Ugotovili smo, da ob konstantnem dotoku NO koncentracija cGMP doseže nekoliko višjo stacionarno vrednost, medtem ko ob razgradnji NO kaže odziv v obliki zvonaste krivulje. Nato smo med seboj primerjali časovno odvisnost molarne koncentracije cGMP pod vplivom posameznih inhibitorjev PDE5 za primer s konstantno koncentracijo NO in ob upoštevanju razgradnje NO (sliki 15 in 17). Rezultati kažejo, da z oralnim doziranjem 100 g avanafila, dosežemo najvišjo molarno koncentracijo cGMP, z doziranjem 100 g sildenafil pa najnižjo. Pod vplivom 20 mg tadalafila se cGMP najpočasneje razgrajuje. Iz tega lahko sklepamo, da farmakološki profil inhibitorja in moč inhibicije vplivata na produkcijo cGMP. Pri konstantni koncentraciji NO so molarne koncentracije cGMP pod vplivom inhibitorjev višje za faktor med 3 in 4 kot takrat, ko se NO razgrajuje. Iz teh rezultatov sklepamo, da je kombinacija inhibitorjev PDE5 in vzdrževanja konstantne koncentracije NO najbolj učinkovita terapija za zviševanje molarne koncentracije cGMP in njegovo počasnejšo razgradnjo. To bi se dalo izkoristiti tudi kot učinkovitejšo terapijo, pri kateri bi istočasno dozirali učinkovino, ki sproži sintezo in sproščanje NO (npr. nitroglicerinske tabletko) ter inhibitorje PDE5 v primerih akutne pljučne hipertenzije npr. pri pojavu višinske bolezni.

Model bi lahko nadgradili tako, da bi preučevali vpliv inhibitorjev PDE5 na produkcijo cGMP skupaj z zaužitjem hrane, saj raziskave kažejo, da zaužitje hrane skupaj z inhibitorji zniža njihovo maksimalno molarno koncentracijo v krvi in podaljša čas absorpcije [18]. Lahko bi preučevali tudi, kako se produkcija cGMP spreminja, če bi dozirali različne doze inhibitorjev PDE5. V signalni poti NO/cGMP je še vedno veliko neznanega, saj dinamika NO, kateremu so gladke mišične celice fiziološko izpostavljene, še ni dovolj raziskana [8]. V našem modelu smo dinamiko NO poenostavili in predpostavili, da celotna koncentracija NO naenkrat difundira v



gladko mišično celico. Če bi bila dinamika difuzije NO v gladko mišično celico bolj raziskana, bi model lahko nadgradili tudi z upoštevanjem postopne difuzije NO v celico. V prihodnosti se lahko izdelata model, s katerim bi preučili, kako se signalna pot NO/cGMP spreminja za različna fiziološka in patološka stanja, kot so razne kardiovaskularne bolezni in diabetes.

## LITERATURA IN VIRI

- [1] V. Boswell-Smith, D. Spina in C. P. Page, *Phosphodiesterase inhibitors*, Br J Pharmacol **147**, 252-57 (2006).
- [2] A. Y. Kots, E. Martin in I. G. Sharina, *A Short History of cGMP, Guanylyl Cyclases, and cGMP-Dependent Protein Kinases*, Handb Exp Pharmacol **191**, 1-14 (2009).
- [3] I. H. Osterloh, *The discovery and development of Viagra® (sildenafil citrate)* (Springer, Basel, 2004).
- [4] Wikipedia, *Endothelium*. Pridobljeno 15.5.2022, iz: <https://en.wikipedia.org/wiki/Endothelium>.
- [5] K. Sakuma, *Muscle Cell and Tissue – Current Status of Research Field* (Intechopen, London, 2018).
- [6] J. Yang, J.W. Clark, R.M. Bryan in C.S. Robertson, *Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell*, Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**, 886-97 (2005).
- [7] E. R. Derbyshire in M. A. Marletta, *Biochemistry of Soluble Guanylate Cyclase*, Handb Exp Pharmacol, **191**, 17-31 (2009).
- [8] E. Mo, H. Amin in I. H. Bianco, *Kinetics of a Cellular Nitric Oxide/cGMP/Phosphodiesterase-5 Pathway*, J Biol Chem **279**, 26149-58 (2004).
- [9] S.D. Rybalkin, C. Yan in K. E. Bornfeldt, *Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function*, Circ Res **93**, 280-91 (2003).
- [10] B. Zhu in S. J. Strada, *The Novel Functions of cGMP-Specific Phosphodiesterase 5 and its Inhibitors in Carcinoma Cells and Pulmonary/Cardiovascular Vessels*, Curr Top Med Chem **7**, 437-54 (2007).
- [11] K. E. Andersson, *PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery*, Br J Pharmacol **175**, 2554-65 (2018).
- [12] K. Hatzimouratidis, A. Salonia in G. Adaikan, *Pharmacotherapy for Erectile Dysfunction: Recommendations From the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015)*, J Sex Med **13**, 465-88 (2016).

- [13] J.D. Duarte, R. L. Hanson in R. F Machado, *Pharmacologic treatments for pulmonary hypertension: exploring pharmacogenomics*, *Future Cardiol* **9**, 335-49 (2013).
- [14] M. Gupta, A. Kovar in B. Meibohm, *The Clinical Pharmacokinetics of Phosphodiesterase-5 Inhibitors for Erectile Dysfunction*, *J Clin Pharmacol* **45**, 987-1003 (2005).
- [15] J. Jung, S. Choi in S. H. Cho, *Tolerability and pharmacokinetics of avanafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor: a single- and multiple-dose, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy Korean male volunteers*, *Clin Ther* **32**, 1178-87 (2010).
- [16] S. I. Park, S. H. Heo in G. Kim, *Comparison of tadalafil pharmacokinetics after administration of a new orodispersible film versus a film-coated tablet*, *Drug Des Devel Ther* **12**, 935-42 (2018).
- [17] A. Alwhaibi, S. Alsanea in Z. Alrabiah, *Pharmacokinetic profile of sildenafil citrate in healthy Middle Eastern Males: Comparison with other ethnicities*, *Saudi Pharm J* **12**, 1498-1505 (2021).
- [18] D. J. Nichols, G. J. Muirhead in J. A. Harness, *Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality*, *Br J Clin Pharmacol* **53**, 5-12 (2002).
- [19] Y. Zhao, P. E. Brandish in D. P. Ballou, *A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase*, *Proc Natl Acad Sci* **96**, 14753-8 (1999).
- [20] J. Kotera, H. Mochida in H. Inoue, *Avanafil, a potent and highly selective phosphodiesterase-5 inhibitor for erectile dysfunction*, *J Urol* **188**, 668-74 (2012).
- [21] I.V. Turko, S. H. Francis in J. D. Corbin, *Hydropathic analysis and mutagenesis of the catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). cGMP versus cAMP substrate selectivity*, *Biochemistry* **37**, 4200-5 (1998).
- [22] R.Wang, A. L. Burnett in W. H. Heller, *Selectivity of avanafil, a PDE5 inhibitor for the treatment of erectile dysfunction: implications for clinical safety and improved tolerability*, *J Sex Med* **9**, 2122-9 (2012).
- [23] G. Kayık, N. Ş Tüzün in S. Durdagi, *Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development*, *J Enzyme Inhib Med Chem* **32**, 311-30 (2017).