

**DİHİDRODİGOKSİN:
DİGOKSİNDEN AYIRIMI VE OLUŞUM MEKANİZMASI ÜZERİNE
ÇALIŞMALAR**

Gülesi AYANOĞLU

*İstanbul Üniversitesi, Edirne Tıp Fakültesi,
Kimya, Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü, Fatih - İstanbul*

Ö Z E T

Dihidrodigoksin, digoksinin bir metabolizma ürünüdür. Bu çalışmada, DEAE-Sephadex LH-20 dekstran jeli sentezlenerek yapılan sütun kromatografisinde, bu metabolitin digoksinden ayırımı sağlanmıştır. Bu yöntemin biyolojik indirgenme ürününün digoksinden ayırımı ve izolasyonu için uygun olduğu saptanmıştır. Indirgenme olayının organizmadaki yerinin belirlenmesi amacıyla bir NADP-H üreten invitro sistem ile çalışılmıştır. Bu sisteme çeşitli hücre fraksiyonlarında, dihidrodigoksin oluşmadığı saptanmış, sonuçlar irdelenmiştir. Digoksin verilen iki sujenin idrar örneklerinde, gaz-kromatografisi ile yapılan dihidrodigoksin miktar tayinleri sonucu, bu metabolitin, drog alımıından itibaren yedinci günde bir artış, daha sonra hafif bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Gaz-kromatografik miktar tayininde, hassasiyeti artırmak amacıyla bir temperatür programlaması yöntemi denenmiş, alınan sonuçlar tartışılmıştır.

G İ R İ Ş

Dihidrodigoksin, organizmada, digoksinin bir metabolizma ürünüdür. Söz konusu ürün β laktون halkasının C-20(22) pozisyonundaki çift bağın indirgenmesi ile oluşmaktadır. Dihidroksigeninin biyolojik sistemlerle varlığı, ilk olarak *Luchi* ve *ark.*¹ tarafından gösterilmiş, daha sonra *Watson* ve *ark.*², kombine gaz kromotografisi-kütle spektroskopisi yöntemi ile bu metaboliti insanda saptamışlardır. Birçok kitap ve dergilerde, hala, digoksinin organizmadan çoğulkla değişmeden atıldığı öne sürülmüşe karşın³⁻⁵, son zamanlarda yapılan çalışmalar, dihidrodigoksinin insanda sık rastlanan bir me-

tabolit olduğunu ortaya koymuştur⁶⁻⁸. Digoksinin β lakton halkasının doymasının kardiyak aktivitede azalmaya neden olduğu da gösterilmiş, kimyasal yöntemlerle C-20(22)'deki çifte bağı indirgenmiş digoksin ile yapılan çalışmalarda, bu bileşinin, yani dihidroksinin, ana drogün ancak onda biri kadar aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır^{9,10}. İnsanda dihidrodigoksin oluşumu kişiden kişiye değişiklik göstermekte⁶⁻⁸, söz konusu biyolojik indirgenme reaksiyonunun mekanizması henüz bilinmemektedir.

Bu az rastlanan metabolik olayın mekanizması üzerinde yapılan çalışmaların azlığının nedenlerinden biri, çok düşük miktarlarda rastlanan dihidrodigoksinin tanınabilmesi ve miktar tayini için gerekli hassas yöntemlerin kolaylıkla bulunamamasıdır. Geliştirilen çeşitli kromatografik yöntemler ancak aglikon durumundaki digoksigenin ve dihidroksigenin birbirinden ayırmayı sağlayabilmektedir^{11,12}. Glikozitlerin ayırımı için önerilen bir ince tabaka kromatografisi yönteminin¹³ ise, nanogram düzeyindeki bileşiklerin biyolojik materyalde varlıklarının saptanmasına hassasiyet yönünden olanak vermediği görülmektedir. Biyolojik materyelde dihidrodigoksin miktar tayini için Watson ve Clark tarafından hassas bir gaz-kromatografik yöntem geliştirilmiştir¹⁴. Bu yöntemde, glikozitler biyolojik materyalden kısmen saf olarak elde edildikten sonra, parçalanarak uçucu türevleri hazırlanmakta olan ve elektron yakalayıcı bir detektör yardımıyla gaz kromatografisinde analiz edilmektedir. Ancak bu yöntemlerden hiçbir, biyolojik sistemlerde oluşan metabolitin parçalanmadan, glikozit halinde ayırmına olanak vermemektedir. Sentetik dihidrodigoksinin, yani kimyasal olarak indirgenmiş digoksinin iki stereoisomer karışımı olduğu bilinmektedir¹⁵. Biyolojik olarak meydana gelen metabolitin hangi izomer şekli olduğu henüz saptanamamıştır. Sentetik indirgeme ürününün, ana drogün onda biri olarak bulunan kardiyak aktivitesi, bu iki izomer karışımının aktivitesidir. Biyolojik metabolitin gerçek aktivitesinin saptanması, ancak, bu maddenin yapısı bozulmadan digoksin'den ayırımı ve izolasyonu sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi ile olanaklıdır. Bu çalışmada, bu amaca yönelik olarak, bir iyon değiştirici Sephadex dekstran jel sentezi yapılarak söz konusu amaç için denendi, kromatografik bir yöntem ve bazı uygalamaları üzerine çalışıldı.

Digoksinin organizmadaki indirgenme yeri de henüz bilinmemektedir. Karacigerin bu metabolik basamakta başlıca rolü oynaya bileceği gösterilmiştir¹⁶, bazı ekstrahepatik yollar da ileri sürülmüştür^{11,17}. Bu çalışmada, ayrıca digoksinin indirgenme yerinin belirlenmesi amacıyla, bir NADP-H üreten in vitro sistem kurularak fare ve sincanlarda, çeşitli dokular ve hücre fraksiyonları bu yönden incelendi.

Son olarak, digoksin verilen iki süjenin idrar örneklerinde dihidrodigoksin miktar tayini, gaz-kromatografik yöntem kullanılarak yapılmış ve belirli sürelerde dihidro oluşumu kantitatif olarak saptanmaya çalışılmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

DEAE - Sephadex LH-20 dekstran jelinin sentezi: DEAE - Sephadex LH-20, ilk olarak DEAE-selüloz hazırlanması için kurulmuş bir yönteme göre yapıldı^{18,19}. 60 g. Sephadex LH-20'ye (Pharmacia Fine Chem.), 170 ml. suda çözünmüş 40 g. NaOH eklendi. Karışım, arada karıştırılarak 30 dakika su banyosunda bekletildi. Üzerine, 45 ml. %85'lik 2-klorotriethylamin HCl sürekli karıştırılarak eklendi. Bu karışım, 85°C lik yağ banyosunda 35 dakika bekletildi. Buz banyosunda soğutulduktan sonra üzerine 250 ml. 2 M NaCl çözeltisi eklenerek filtre edildi. Çökelti, sıra ile 250 ml N NaOH, 250 ml. N HCl çözeltileri ve distile su ile yıkandı. Bu çökelti 250 ml. N NaOH ile tekrar suspansiyon haline getirilip yıkandı, süzüldü ve 200 ml. lk parçalar halinde mutlak alkol ve dietileter ile yıkanarak 60°C da üç saat süre ile kurultuldu.

Sütun Kromatografisi: 40×0.9 cm. boyutlarındaki bir cam sutun, hazırlanmış olan DEAE-Sephadex LH-20 jel paketlendi. Bu sütuna, digoksin, dihidrodigoksin, 12 α -³H digoksin (New England Nuclear Co), 12- α ³H dihidrodigoksin, ayrı ayrı veya karışım halinde tatbik edildi. Elusyon için, kloroform:metanol, 85:15, 90:10, 95:5 (h/h) çözücü sistemleri dakikada 0.25 ml. akış hızı ile uygulandı. Elde edilen fraksiyonlar, sıvı-sintilasyon spektrometresinde trityum için sayılık, digoksin ve dihidrodigoksin pikleri tespit edildi.

Sütundan elde edilen fraksiyonlar ayrıca, gaz - kromatografik yöntem ile analiz edildi.

İdrar örneklerinde digoksin ve dihidrodigoksin miktar - tayini: Digoksin (Lanoxin^R, 0.125 mg) alan iki kişiden, drog alımından itibaren birinci, yedinci ve ondördüncü gündə, 24 saatlik idrar alındı. Ayrıca, aynı günlerde saat 18.00 de 25-30 ml. idrar alındı. Bütün örneklerde, digoksin ve dihidrodigoksin tayinleri gaz-kromatografik yöntem ile yapıldı. Bu amaçla diklorometan ile ekstre edilen glikozitleri Silika gel G plaklarında, benzen:metanol, 4:1 (h/h) çözücü sistemi kullanılarak yapılan preparatif ince tabaka kroma-

tografisinde kısmen saflaştırıldı. Glikozitlerin üçer türevleri, heptafluorobutirik asit anhidrit kullanılarak hazırlandı. Sentez sonucu oluşan digoksigenin heptaflorobutirat ve dihidrodigoksigenin heptaflorobutirat, ikinci bir preparatif ince tabaka kromatografisi ile kirliliklerinden kurtarıldı. Bu amaçla Silika gel GF plakları ve çözücü sistemi olarak etil asetat:benzen, 7:3 ((h/h) kullanıldı. Plaktan asetonla ekstre edilen türevler, Ni-elektron yakalayıcı detektörü olan bir gaz kromatografla (Tracor MT 220) tatlık edildi. Gaz kromatografı kolonu, Gaschrom Q üzerinde %3 OV 101 taşıyan, 12 cm × 2 mm iç çapında U şeklinde bir kolon, kolon temperatürü 235°C, helyum akış hızı 70 ml/dakika idi. İç standart olarak digitoksiğenin heptaflorobutirat kullanıldı. Glikozitlerin işlemler sonucundaki veriminin tayini, diklorometan ekstrasyonundan önce idrara eklenen trityum digoksinin, işlemler sonucu sıvı sintilasyon spektrometresinde ölçülmesi ile yapıldı.

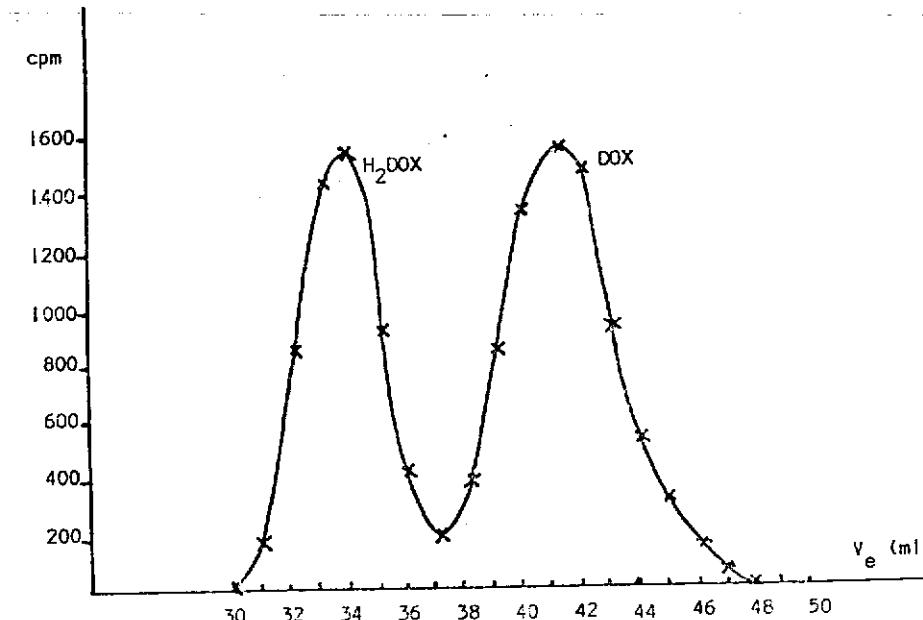
Doku homojenizatlarının hazırlanması: Fare ve sığanlardan, karaciğer ve böbrekler alınarak²⁰, —4°C de küçük parçalar halinde kesildi. Tris-sukroz tamponu, 0.15 M, pH 7.4 ile %50 (a/h) homojenizatları hazırlandı. 10.000xg de 10 dakika santrifüjle üstteki kısım alınarak tüm homojenizat elde edildi. Tüm homojenizat, 100.000xg de bir saat süre ile santrifüj edilerek 100.000xg fraksiyon (çözünür fraksiyon) ve mikrosomal pellet hazırlandı²⁰.

İnkubasyon: İnkubasyonlarda in vitro NADP-H üreten sistem olarak 25 μM glukoz-6-fosfat, 5 μM NADH, 2 μM NADP, 50 μM nikotinamid taşıyan 0.15 M Tris-salin tamponu, pH 7.4 kullanıldı. Bu kofaktör-tampon karışımına, substrat olarak trityum digoksin ve enzim kaynağı olarak çeşitli hücre fraksiyonlarının eklenmesiyle başlatılan inkubasyonlar, 37°C lik su banyosunda 30 dakika süre ile yapıldı²⁰. Bu süre sonunda metilen klorür ile ekstre edilen glikozitler DEAE-Sephadex LH-20 sütun kromatografisine tabi tutuldu.

BÜLGÜLAR VE TARTIŞMA

Digoksin ve dihidrodigoksin birbirinden ayırmayı sağlamak amacıyla DEAE-Sephadex LH-20 dekstran jel sentezlendi. Bu jel kullanılarak yapılan sütun kromatografisinde, kloroform:metanol, 85:15 ve 90:10 çözücü sistemlerinde, bileşiklerin ayrılmadığı görüldü. Kloroform:metanol, 95:5 çözücü sisteminde, digoksin ve dihidrodigoksin birbirinden ayrıldı ve total hacma karşı sabit elusyon hacimleri (V_e/V_t) elde edildi (Şekil : 1). Elde edilen

fraksiyonların gaz kromatografik analizi ile, maddeler tanımlı ve saflıklar gösterildi (Şekil : 2). Geliştirilen bu yöntem ile, dihidrodigoksinin digoksinden glikozit bağının parçalanmadan ayrılması mümkün olmuştur. Bu yöntem

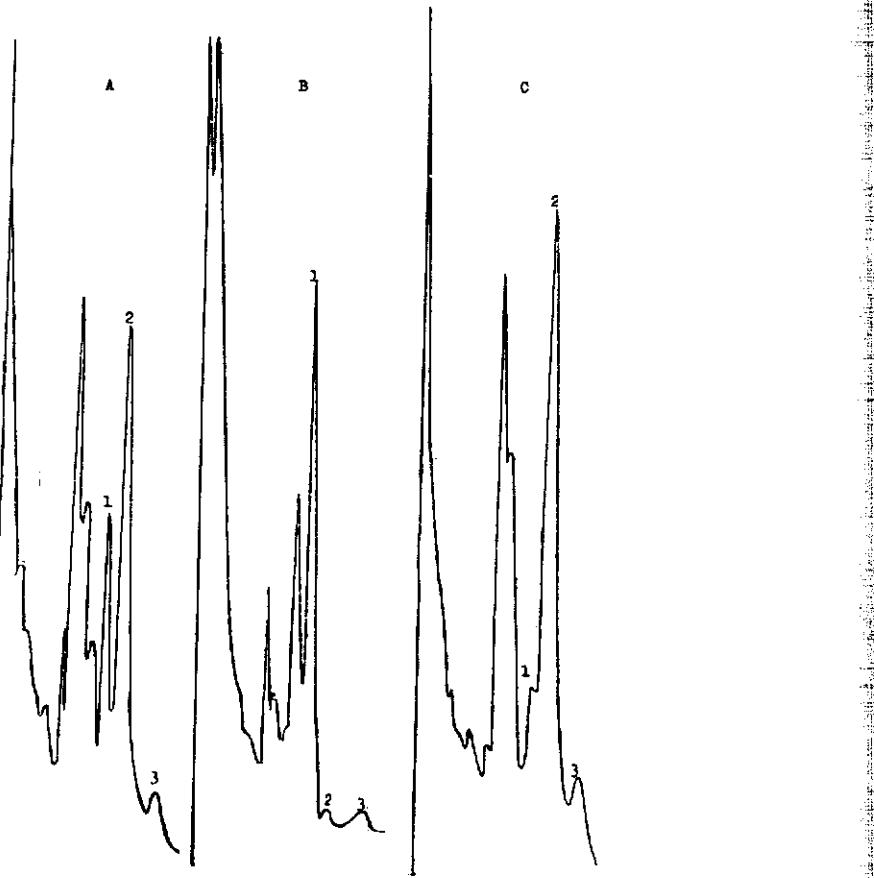


Şekil : 1 ^3H digoksin ve ^3H dihidrodigoksinin, DEAE-Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile ayırımı. Elusyon solvanı: Kloroform-metanol, 95:5; akış hızı, 0.25 ml/min. (DOX: digoksin, $H_2\text{DOX}$: dihidrodigoksin).

ile, biyolojik metabolitin digoksinden ayırım ve izolasyonunun sağlanması, böylece gerçek kardiyotonik aktivitesinin ölçülmesi olaklı görülmektedir. Bu yöntem, digoksinin organizmada indirgenme yerinin belirlenmesi çalışmalarında, doku homojenizatlarında bu glikozitlerin tayini amacıyla uygulanmıştır.

Digoksinin organizmada indirgenme yerinin belirlenmesi amacıyla, NADPH üreten in vitro bir sistem kullanılarak fare ve sığanlarda çeşitli hücre fraksiyonları incelendi. Karaciğer ve böbrek homojenizatlarında, karaciğer 100.000xg fraksiyonu ve mikrosomal fraksiyonda digoksinin indirgenmediği saptandı. Aynı sisteme, fare karaciğer homojenizatında, anaerobik ortamda da dihidrodigoksin oluşumu gözlenmedi. Karaciğerin bu metabolik basamakta

rol alabileceği, daha önce yapılan *in vivo* deneylerde gösterilmiş¹⁶, ancak bu indirgenme olayının *in vitro* olarak gösterilebilmesi mümkün olmamıştır. Indirgenmenin, anaerobik ortamda barsak florası tarafından yaptığı öne sürülmüşse de¹⁷, oluşan dihidrodigoksinin tanınması için kullanılan ince



Şekil: 2 DEAE-Sephadex LH-20 sütun kromatografisinden elde edilen fraksiyonların gaz-kromatografik analizi. A: Karışım sütuna tatbik edilmeden önce; B: Dihidrogoksin fraksiyonu; C: Digoksin fraksiyonu. 1: Dihidrogoksigenin heptaflorobutirat; 2: Digoksigenin heptaflorobutirat; 3: Digitoksigenin heptaflorobutirat.

kromatografisi sonuçlarının, doğrudan glikozitlerin ayırmını sağlayan hassas yöntemlerle pekiştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca yüz kişi üzerinde yapılan bir araştırmada, antibiyotik tedavisi uygulanan kişilerde dihidro oluşumunun,

normalden daha az olmadığı gözlenmiştir²¹. Bu veri, barsak florasının bu olayda rolü olabileceği kanısını doğrular nitelikte değildir. Digoksinin organizmadaki indirgenme yerinin belirlenmesi için, uzun süreli inkubasyonlar, değişik kofaktör sistemleri ve nikotinamid kullanımından kaçınarak, doğrudan NADP-H içeren *in vitro* sistemlerin denenmesiyle, bu mekanizmadan sorumlu olabilecek dokuların yeniden gözden geçirilmesi gerektiği kanıstdayız.

Günde 0.125 mg digoksin verilen iki süjede, birinci, yedinci ve dördüncü günde alınan idrar örneklerinde digoksin ve dihidrodigoksin miktar tayinleri gaz-kromatografik yöntem ile yapıldı. Örneklerdeki H₂DOX/H₂DOX + DOX değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Bulgular süjelerden birinin yüksek oranda

İdrar örneği	H ₂ DOX/H ₂ DOX + DOX		
	1. gün	7. gün	14. gün
1 a	10	16	11
1 b	11	19	13
2 a	4	14	10
2 b	2	15	12

Tablo : 1 İdrar örneklerinin gaz-kromatografik analiz sonuçları. a, 24 saatlik; b, saat 18 örnekleri; H₂DOX, dihidrodigoksin; DOX, digoksin.

dihidro metaboliti oluşturduğunu göstermektedir. Her iki örnekte de, dihidrogoksin oluşumunun yedinci günde arttığı, ondördüncü günde ise hafif bir azalma olduğu saptanmıştır. Saat 18.00 idrar örnekleri değerleri de aynı bulguya doğrulamaktadır. Dihidrodigoksinin oluşum süresi ile ilgili olarak saptanan bu özellik, bu mekanizmanın açıklanması bakımından önemli görülmüştür. Bu bulgunun, başka analitik yöntemlerle ve çok sayıda örnek ile pekiştirilmesi gerekmektedir.

Digoksin ve dihidrodigoksinin gaz-kromatografik analizinde ayrıca, bir temperatür programlaması denendi. Örnek tatbikinden itibaren 5 dakika süre içinde 225 - 245°C arasında yapılan programlama ile, daha iyi O noktaları ve daha hassas kantitatif sonuçlar veren uzun pikler elde edildi. Temperatür programlamasının, özellikle çok düşük miktarlarda glikozit taşıyan biyolojik materyal ile yapılan çalışmalarda yararlı olacağının varlığı.

SUMMARY**STUDIES ON DIGOXIN METABOLISM**

Dihydridogoksin is known to be a metabolite of digoxin. In this study, separation of this metabolite from digoxin was achieved by using DEAE-Sephadex LH-20 column chromatography. The site of reduction in various tissues was investigated. In urine samples of two subjects, the rate of metabolite was determined in a two weeks period by using a programmed temperature gas chromatographic technique and results were discussed.

TEŞEKKÜR

Laboratuvarlarında bu çalışmanın yürütülmesi olağanı sağlayan ve değerli yardımınarını esirgemeyen Prof. Dr. S. M. Kalman'a (Stanford Üniversitesi, Farmakoloji Bölümü, ABD) teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- 1 — LUCHI, R. J. ve GRUBER, J. W.: *Amer. J. Med.*, **45**(2), 322-328, 1968.
- 2 — WATSON, E. ve ark.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **184**, 424-428, 1978.
- 3 — DOHERTY, J. E.: *Am. J. Med. Sci.*, **255**, 382-412, 1968.
- 4 — MASON, D. T., *Ann. Int. Med.*, **80**, 520-530, 1974.
- 5 — GOODMAN, L. S. ve GILMAN, A.: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 653-682, MacMillan Publishing Co., Inc. New York, 1975.
- 6 — CLARK, D. R. ve KALMAN, S. M.: *Drug Med and Disp.*, **2**, 148-150, 1974.
- 7 — GREENWOOD, H. ve ark.: *Clin. Chem. Acta*, **62**(2) 213-224, 1975.
- 8 — SUDGEN ve ark.: *J. Chromatogr.*, **121**, 401-404, 1976.
- 9 — MARCUS, F. I. ve ark.: *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 610-620, 1975.
- 10 — BROWN, B. T. ve ark.: *Br. J. Pharmacol.*, **18**, 311-324, 1962.
- 11 — ABEL, R. M. ve ark.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **15a**, 403-468, 1965.
- 12 — JELIFFE, R. W. ve BLANKENHORN, D. H.: *J. Chromatogr.*, **12**(2), 267-270, 1963.
- 13 — RABITZCH, G.: *J. Chromatogr.*, **35**, 122-125, 1968.
- 14 — WATSON, E. ve KALMAN, S. M.: *J. Chromatogr.*, **56**, 209-218, 1971.
- 15 — BROWN, B. T. ve WRIGHT, S. E.: *J. Pharmacol.*, **13**, 262-267, 1961.
- 16 — KOLENDŁA, K. D. ve ark.: *Br. J. Pharmacol.*, **41**, 661-673, 1973.
- 17 — HERRMANN, I. ve REPKE, K.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 35-48, 1964.
- 18 — SUDGEN, H. ve ark.: *J. Chromatogr.*, **121**, 401-404, 1976.
- 19 — DITTMER, J. C.: *J. Chromatogr.*, **43**, 512-514, 1964.
- 20 — LADA, B. N. ve ark.: *Fundamentals of Drug Metabolism*, 552-555, Williams and Wilkins Publishing Co., Baltimore, 1971.
- 21 — PEETERS, U., kişisel görüşme.