

## 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 digoksininden ayırımı sağlanmıştır. Bu yöntemin biyolojik indirgenme ürününün digoksininden ayırımı ve izolasyonu için uygun olduğu saptanmıştır. İndirgenme olayının organizmadaki yerinin belirlenmesi amacıyla bir NADP-H üreten invitro sistem ile çalışılmıştır. Bu sistemde 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 alınışından itibaren yedinci günde bir artış, daha sonra hafif bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Gaz-kromatografik miktar tayininde, hassasiyeti arttırmak amacıyla bir temperatur programlaması yöntemi denenmiş, alınan sonuçlar tartışılmıştır.

### G İ R İ Ő

Dihidrodigoksin, organizmada, digoksinin bir metabolizma ürünüdür. Söz konusu ürün  $\beta$  lakton halkasının C-20(22) pozisyonundaki çifte bağ indirgenmesi ile oluşmaktadır. Dihidroksigeninin biyolojik sistemlerle varlığı, ilk olarak *Luchi* ve *ark.*<sup>1</sup> tarafından gösterilmiş, daha sonra *Watson* ve *ark.*<sup>2</sup>, kombine gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yöntemi ile bu metaboliti insanda saptamışlardır. Birçok kitap ve dergilerde, hala, digoksinin organizmadan çoğunlukla değişmeden atıldığı öne sürülmesine karşın<sup>3-5</sup>, son zamanlarda yapılan çalışmalar, dihidrodigoksinin insanda sık rastlanan bir me-

tabolit olduğunu ortaya koymuştur<sup>6-8</sup>. Digoksinin  $\beta$  lakton halkasının doymasının kardiyak aktivitede azalmaya neden olduğu da gösterilmiş, kimyasal yöntemlerle C-20(22)'deki çifte bağı indirgenmiş digoksin ile yapılan çalışmalarda, bu bileşiğin, yani dihidroksinin, ana drogun ancak onda biri kadar aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır<sup>6,10</sup>. İnsanda dihidrodigoksin oluşumu kişiden kişiye değişiklik göstermekte<sup>6-8</sup>, 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 digoksinin ve dihidroksinin birbirinden ayırımı sağlayabilmektedir<sup>11,12</sup>. Glikozitlerin ayırımı için önerilen bir ince tabaka kromatografisi yönteminin<sup>13</sup> 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 geliştirilmiştir<sup>14</sup>. 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 hiçbiri, biyolojik sistemlerde oluşan metabolitin parçalanmadan, glikozit halinde ayırımına olanak vermemektedir. Sentetik dihidrodigoksinin, yani kimyasal olarak indirgenmiş digoksinin iki stereoizomer karışımı olduğu bilinmektedir<sup>15</sup>. Biyolojik olarak meydana gelen metabolitin hangi izomer şekli olduğu henüz saptanamamıştır. Sentetik indirgeme ürününün, ana drogun 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 jeli sentezi yapılarak söz konusu amaç için denendi, kromatografik bir yöntem ve bazı uygulamaları üzerine çalışıldı.

Digoksinin organizmadaki indirgenme yeri de henüz bilinmemektedir. Karaciğerin bu metabolik basamakta başlıca rolü oynaya bileceğini gösterilmiş<sup>16</sup>, bazı ekstrahepatik yollar da ileri sürülmüştür<sup>11,17</sup>. Bu çalışmada, ayrıca digoksinin indirgenme yerinin belirlenmesi amacıyla, bir NADP-H üreten in vitro sistem kurularak fare ve sıçanlarda, 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 yöntem göre yapıldı<sup>18,19</sup>. 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-klorotrietilamin 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, süzülde ve 200 ml. lik parçalar halinde mutlak alkol ve dietileter ile yıkanarak 60°C da üç saat süre ile kurutuldu.

*Sütun Kromatografisi:* 40x0.9 cm. boyutlarındaki bir cam sütun, hazırlanmış olan DEAE-Sephadex LH-20 jeli paketlenildi. Bu sütuna, digoksin, dihidrodigoksin, 12  $\alpha$  - <sup>3</sup>H digoksin (New England Nuclear Co), 12 -  $\alpha$  <sup>3</sup>H dihidrodigoksin, ayrı ayrı veya karışımlar 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 sayılarak, 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<sup>R</sup>, 0.125 mg) alan iki kişiden, drog almından itibaren birinci, yedinci ve onördüncü günde, 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 uçucu türevleri, heptaflorobutirik asit anhidrit kullanılarak hazırlandı. Sentez sonucu oluşan digoksinin heptaflorobutirat ve dihidrodigoksinin 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 kromatografle (Tracor MT 220) tatbik edildi. Gaz kromatografi kolonu, Gaschrom Q üzerinde %3 OV 101 taşıyan, 12 cm x 2 mm iç çapında U şeklinde bir kolon, kolon sıcaklığı 235°C, helyum akış hızı 70 ml/dakika idi. İç standart olarak digoksinin heptaflorobutirat kullanıldı. Glikozitlerin işlemler sonucundaki veriminin tayini, diklorometan ekstraksiyonundan önce idrara eklenen trityum digoksinin, işlemler sonucu sıvı-sintilasyon spektrometresinde ölçülmesi ile yapıldı.

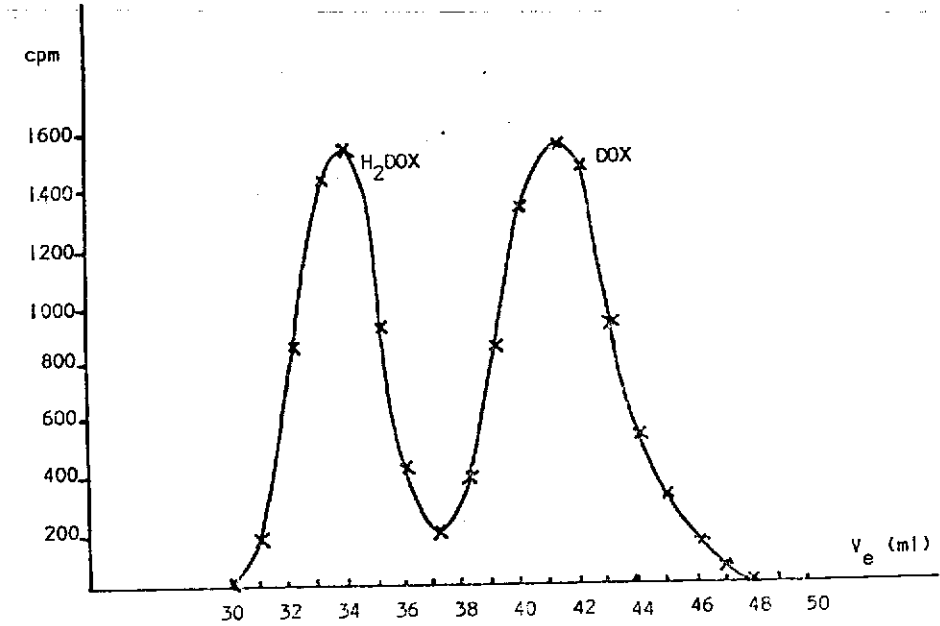
**Doku homojenizatlarının hazırlanması:** Fare ve sıçanlardan, karaciğer ve böbrekler alınarak<sup>20</sup>, -4°C de küçük parçalar halinde kesildi. Tris-sukroz tamponu, 0.15 M, pH 7.4 ile %50 (a/h) homojenizatları hazırlandı. 10.000xg de 10 dakika santrifüjle üstteki kısım alınarak tüm homojenizat elde edildi. Tüm homojenizat, 100.000xg de bir saat süre ile santrifüj edilerek 100.000xg fraksiyon (çözünür fraksiyon) ve mikrosomal pellet hazırlandı<sup>20</sup>.

**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 yapıldı<sup>20</sup>. Bu süre sonunda metilen klorür ile ekstre edilen glikozitler, DEAE-Sephadex LH-20 sütun kromatografisine tabi tutuldu.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

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

fraksiyonların gaz kromatografik analizi ile, maddeler tanımdı ve saflıkları gösterildi (Şekil : 2). Geliştirilen bu yöntem ile, dihidrodigoksinin digoksin-den glikozit bağının parçalanmadan ayrılması mümkün olmuştur. Bu yöntem

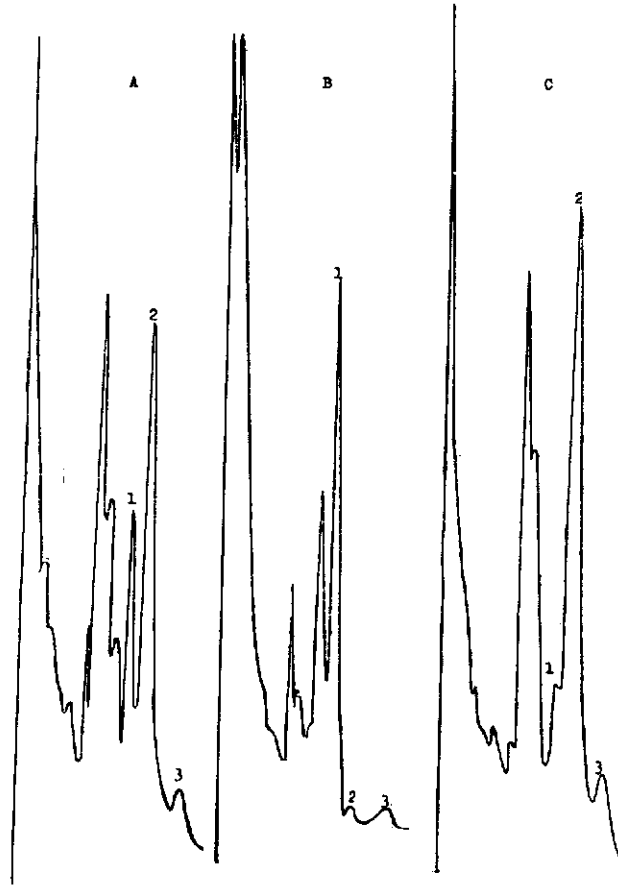


Şekil : 1 <sup>3</sup>H digoksin ve <sup>3</sup>H dihidrodigoksinin, DEAE-Sephadex LH-20 kolon kromatografisi ile ayırımı. Elusyon solvanı: Kloroform-metanol, 95:5; akış hızı, 0.25 ml/min. (DOX: digoksin, H<sub>2</sub>DOX: dihidrodigoksin).

ile, biyolojik metabolitin digoksin-den ayırımı ve izolasyonunun sağlanması, böylece gerçek kardiyotonik aktivitesinin ölçülmesi olanaklı görülmektedir. Bu yöntem, digoksinin organizmada indirgenme yerinin belirlenmesi çalışmalarında, doku homojenizatlarında bu glikozitlerin tayini amacı ile uygulanmıştır.

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

rol alabileceği, daha önce yapılan *in vivo* deneylerde gösterilmiş<sup>16</sup>, ancak bu indirgenme olayının *in vitro* olarak gösterilebilmesi mümkün olmamıştır. İndirgenmenin, anaerobik ortamda barsak florası tarafından yapıldığı öne sürülmüşse de<sup>17</sup>, oluşan dihidrodigoksinin tanıması 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: Dihidrodigoksinin heptaflorobutirat; 2: Digoksinin heptaflorobutirat; 3: Digitoksinin heptaflorobutirat.

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

normalden daha az olmadığı gözlenmiştir<sup>21</sup>. Bu veri, barsak florasının bu olayda rolü olabileceği kanısım 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 kanısındayız.

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 H<sub>2</sub>DOX/H<sub>2</sub>DOX + DOX değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Bulgular süjelerden birinin yüksek oranda

İdrar örneği	H <sub>2</sub> DOX/H <sub>2</sub> 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; H<sub>2</sub>DOX, dihidrodigoksin; DOX, digoksin.

dihidro metaboliti oluşturduğunu göstermektedir. Her iki örnekte de, dihidrodigoksin oluşumunun yedinci günde arttığı, ondördüncü günde ise hafif bir azalma olduğu saptanmıştır. Saat 18.00 idrar örnekleri değerleri de aynı bulguyu 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 temperatur 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. Temperatur programlamasının, özellikle çok düşük miktarlarda glikozit taşıyan biyolojik materyal ile yapılan çalışmalarda yararlı olacağı kanısına varıldı.

## SUMMARY

## STUDIES ON DIGOXIN METABOLISM

Dihydrodigoxin 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 olanağını sağlayan ve değerli yardımlarını 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., In. 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. Chromatog.*, **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.*, **15â**, 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 — KOLENDA, 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.