

## **Neonikotinoidi - Agonisti nikotinskih acetilkolinskih receptora**

## **Neonicotinoids - Agonists of the nicotinic acetylcholine Receptors**

**Broznić Dalibor \* , Milin Čedomila**

Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet, Braće Branchetta 20,  
Sveučilište u Rijeci, 51000 Rijeka, Hrvatska  
Tel./fax: ++385 51 651 135  
e-mail: dbroznic@medri.hr

Department of Chemistry and Biochemistry, School of Medicine, Braće Branchetta  
20, University of Rijeka, 51000 Rijeka, Croatia

### **Sažetak**

Neonikotinoidi spadaju u jednu od najnovijih skupina insekticida. Pojava otpornosti populacije štetnika na organofosfate i metilkarbamate, inhibitore acetilkolinesteraze, dovela je do njihove slabije učinkovitosti i uvjetovala da ih neonikotinoidi istisnu iz uporabe. Na osnovu strukture neonikotinoidni insekticidi su slični nikotinu, a djeluju na nikotinsku podskupinu acetilkolinskih receptora (nAChR). Imidakloprid[1-(6-kloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamin] je najvažniji neonikotinoid, a odlikuje se niskom postojanošću u tlu, visokom insekticidnom aktivnošću i niskom toksičnošću u sisavaca. U Hrvatskoj se imidakloprid često koristi u maslinicima Istre i Kvarnerskih otoka kao efikasno sredstvo u zaštiti nasada maslina protiv različitih nametnika. Neurofiziološke studije su potvrdile da je imidakloprid agonist postsinaptičkih nAChR insekata, pri čemu izaziva najprije stimulaciju postsinaptičkih membrana, a nakon toga paralizu prijenosa živčanih impulsa. Pretpostavlja se da djeluje kao acetilkolin podraživanjem specifičnih živčanih stanica. Njegovim dugotrajnim djelovanjem u insekata prekida se prijenos živčanih impulsa, a nastali poremećaji unutar živčanog sustava u većini slučajeva izazivaju smrt. Imidakloprid je selektivni insekticid s izraženijom toksičnošću prema insektima u odnosu na sisavce zbog jačeg vezivanja na nAChR insekata. Selektivnost ovisi o glavnim strukturnim razlikama u građi vezujućih strana neuronskih nAChR i o ionizaciji dušika u pirolidinskom prstenu. Važnu ulogu pri prijelazu imidakloprida u centralni živčani sustav kao i njegovo vezivanje za nAChR ima hidrofobnost. Ionizacijom se snižuje stupanj hidrofobnosti i ograničava prijelaz imidakloprida što rezultira nižom insekticidnom aktivnošću. Imidakloprid slabo ionizira u neutralnom mediju te lako prolazi kroz lipofilnu barijeru insekta. U ovom radu sumirana su dosadašnja saznanja o kemiji i toksikologiji imidakloprida, te uspoređivan način djelovanja imidakloprida sa ostalim insekticidima.

**Ključne riječi:** neonikotinoidi, imidakloprid, nikotinski acetilkolinski receptori, živčani sustav, vezivanje imidakloprida

## Abstract

Neonicotinoids are the newest major class of insecticides. They are increasingly replacing the organophosphate and methylcarbamate acetylcholinesterase inhibitors which are losing their effectiveness because of selection for resistant pest populations. The neonicotinoid insecticides are related to nicotine in their structure and action at the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Imidacloprid [1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine] is the most important neonicotinoid with low soil persistence, high insecticidal potency and relatively low mammalian toxicity. In Croatia, imidacloprid is most commonly used in olive growing areas, including Istria and Kvarner islands, as an effective means of olive fruit fly infestation control. Neurophysiological studies have confirmed that imidacloprid is an agonist at the postsynaptic nAChR of insects with a stimulation of the postsynaptic membrane first and then a paralyzing effect on nerve conduction. Imidacloprid appears to act like acetylcholine, by exciting specific nerve cells. Its prolonged action in insects disrupts normal nervous system operations and this substantial disorder within the nervous system leads to the consequent lethal action in most cases. Imidacloprid is selectively toxic to insects versus mammals in large part because of higher potency on insect than mammalian nAChR. The selectivity also depends in large part on major structural differences in the neuronal nAChR binding sites of mammals and insects and can be partly explained by differences in the ionization of the pyrrolidine nitrogen. For penetration into the insect central nervous system, hydrophobicity seemed to play an important role, as indicated by the binding of imidacloprid to the nAChR. The ionization reduced hydrophobicity and limited the penetration of imidacloprid, resulting in less insecticidal activity. Imidacloprid is poorly ionized in neutral media and thus passes easily through insect lipophilic barriers. This article reviews the current research status for the major features of imidacloprid chemistry, toxicology and compares imidacloprid mode of action with other insecticides.

**Key words:** neonicotinoids, imidacloprid, nicotinic acetylcholine receptors, nervous system, imidacloprid binding

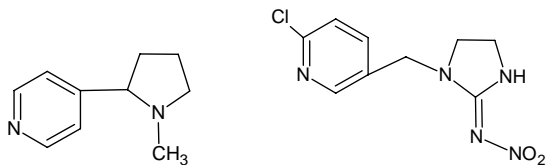
## Uvod

Ljudi od davnina pokušavaju kontrolirati rast i razvoj različitih štetnika zbog očuvanja zdravlja ljudi i zaštite nasada. U posljednjih nekoliko desetljeća u kontroli štetnika dominirale su tri glavne skupine insekticida. To su organofosfati, koji djeluju kao neurotoksini, karbamati inhibitori enzima acetilkolin esteraze (AChE) i piretroidi koji inhibiraju enzime jetre. Velik broj štetnika razvio je otpornost prema ovim insekticidima, što je dovelo do njihove ograničene uporabe te stvorilo potrebu za sintezom novih tvari koje će biti efikasne u suzbijanju štetnika, a netoksične za okoliš. Najbolje karakteristike dali su neonicotinoidi sa vrlo dobrom učinkovitosti i niskom toksičnošću za okoliš i sisavce. Imidacloprid (IMI) je bio prvi neonicotinoid registriran od *United States Environmental Protection Agency (USEPA)* za upotrebu kao pesticid. Zbog jake insekticidne aktivnosti, pokretnosti u tlu IMI se mnogo primjenjuje u poljoprivredi za zaštitu sjemena, tretmanu tla i lišća različitih kultura. Nakon njegove prve primjene 1992. započinje njegova široka uporaba. 2001.-2002. je svrstan u najprodavanije pesticide u svijetu. U Hrvatskoj se IMI često koristi u maslinicima Istre i Kvarnerskih otoka kao efikasno sredstvo u zaštiti nasada maslina protiv različitih nametnika. U ovom radu sumirana su dosadašnja saznanja o kemiji, toksikologiji neonicotinoida, te uspoređivan njihov način djelovanja sa ostalim insekticidima.

## Tekst rada

### 1. Osnovne karakteristike

Zbog strukturne sličnosti sa nikotinom, IMI i srodni insekticidi (Sl.1.) (dinotefuran, acetamiprid, clothianidin, thiamethoxam, nitenpyram) nazivaju se neonikotinoidima.<sup>(1)</sup>



Slika 1. Strukturne formule nikotina i IMIa

Za razliku od neonikotinoida, nikotin posjeduje slabo insekticidno djelovanje, nestabilan je i nije pogodan za uporabu u poljoprivredi za zaštitu sjemena i lišća različitih kultura. Obje skupine neonikotinoidi i nikotinoidi djeluju kao agonisti nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR). Osnovna razlika između ovih dvaju skupina je da su nikotinoidi ionizirani pri fiziološkom pH i selektivni za nAChR sisavaca; dok neonikotinoidi nisu ionizirani i jače su selektivni prema nAChR insekata. Selektivnost neonikotinoida zasniva se u različitoj građi i farmakološkim osobinama nAChR insekata i sisavaca.<sup>(2)</sup> Njihove molekule posjeduju insekticidnu N-(3-piridinil) metilnu grupu nikotina i dio nitroiminske grupe.

### 2. Mehanizam djelovanja

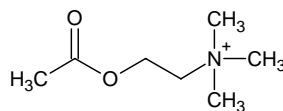
Bez primjene kemijskih insekticida u agrikulturi javljali bi se ogromni gubici. U 2001 ukupno 7.56 milijardi US dolara je potrošeno u zaštiti nasada protiv raznih štetnika.<sup>(3)</sup> U primjeni insekticida još se ipak najviše koriste tvari inhibitori AChE, važnog enzima koji je odgovoran za razgradnju neurotransmitora acetilkolina. Međutim, kao što je prikazano u Tablici 1. uporaba organofosfata i karbamata je u opadanju od 71% u 1987. do 51% u 1999. Zajednički na inhibitore AChE i insekticide koji djeluju na Na-kanale (piretroidi) otpada oko 70% ukupne primjene insekticida.

Tablica 1. Mehanizam djelovanja sto najprodavanijih insekticida/akaricida u svijetu<sup>(4)</sup>

Način djelovanja	1987 %	1999%	Promjena %
Acetilkolinesteraza	71	52	-20
Na-kanali	17	18	+1.4
Acetilkolinski receptori	1.5	12	+10
GABA-Cl kanali	5	8.3	+3.3
Biosinteza hitina	2.1	3	+0.9
NADH dehidrogenaza	0	1.2	+1.2
Oktopaminski receptori	0.5	0.6	+0.1
Ekdisoni receptori	0	0.4	+0.4

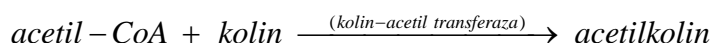
### Neurotransmitori

Simpatička i parasimpatička vlakna luče jednu od dviju sinaptičkih prijenosnih tvari, acetilkolin (ACh) (Sl. 2.) ili noradrenalin.



Slika 2. Strukturna formula acetilkolina

ACh se sintetizira u završecima kolinergičnih živčanih vlakana iz kolina. Slobodni kolin u živčanom se završetku acetilira citosolnim enzimom, *kolin-acetiltransferazom*, koji prenosi skupinu iz acetyl-CoA. Kemijsku reakciju sinteze prikazuje jednačina:



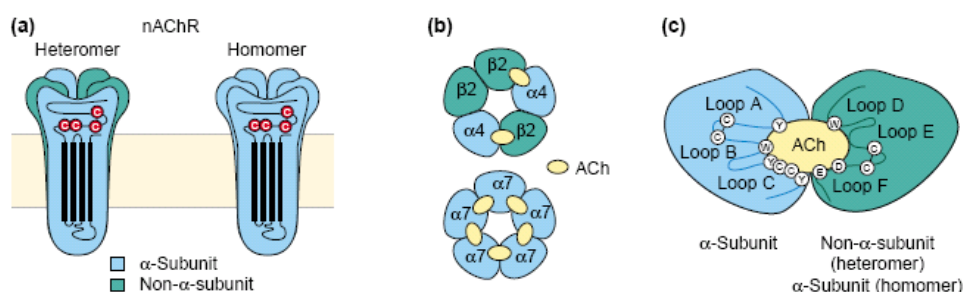
Nakon što se ACh izluči iz kolinergičnih živčanih završetaka, on ostaje u tkivu nekoliko sekunda i obavlja funkciju prijenosnika živčanog signala. Tada enzim *acetilkolin-esteraza* razgrađuje ACh na acetatni ion i kolin. Kolin koji pri tome nastane vraća se u živčane završetke, gdje se ponovno iskorištava za sintezu novih molekula ACh.

### Nikotinski ACh receptori (nAChR) – cilj djelovanja Neonikotinoida

nAChR su ligandni kation selektivni ionski kanali, koji su uključeni u fiziološke reakcije ACh. Svi nAChR su transmembranski oligomeri. Sastoje se od homolognih podjedinica, koje su kodirane velikim brojem različitih gena. Većinom su propusni za kalcij, odnosno reguliraju  $\text{Ca}^{2+}$  zavisne procese. Funkcije i farmakološke osobine nAChR zavise o sastavu podjedinica te o staničnoj i podstaničnoj raspodjeli.

### nAChR sisavaca

nAChR sisavaca se sastoje od pet istovrsnih ili raznovrsnih podjedinica - *Subunit* (Sl.3.). U sisavaca se nAChR nalaze na živčano-mišićnim sinapsama (mišićni nAChR), unutar centralnog i perifernog živčanog sustava (živčani nAChR) i na nekoliko ne-živčanih stanica. U neuronima, većinom nAChRs sadrže dva  $\alpha$  i tri  $\beta$  podjedinice.  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  podjedinice formiraju heteropentamere u mišićnim stanicama.<sup>(5,6)</sup>



Slika 3. Građa nikotinskih acetilkolinških receptora

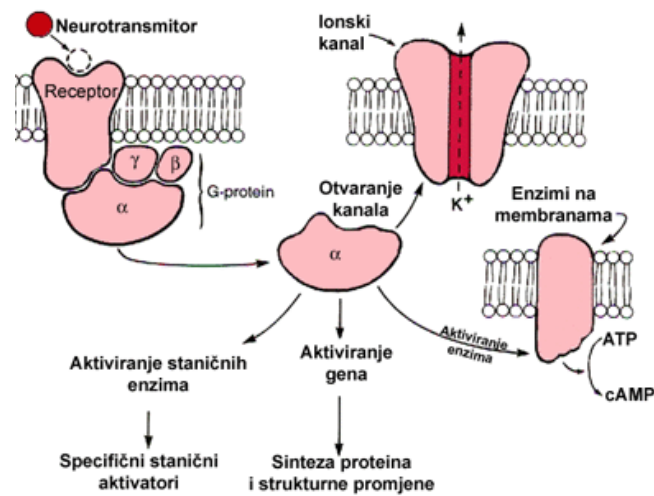
### nAChR insekata

Svi poznati nAChR insekata su neuronskog tipa, ali potpuno različiti od receptora sisavaca. Istraživane su nAChR podjedinice *Drosophila*<sup>(7)</sup>, ali ipak nije u potpunosti jasno koja podjedinica veže IMI. Visoka sposobnost vezivanja IMI-a za nAChR pronađena je kod velikog broja insekata: raznih ušiju, žohara, skakavaca, crva, voćnih mušica, kućnih muha i pčela.<sup>(8,9)</sup> Dugotrajna aktivacija receptora IMI-om

rezultira toksičnošću, tipičnoj kolinergičkoj hiperaktivnosti, nekordiniranim trbušnim drhtanjem, savijanjem krila, tremorom i jakom tresavicom cijelog tijela, što dovodi do potpune klonulosti i smrti. <sup>(10)</sup>

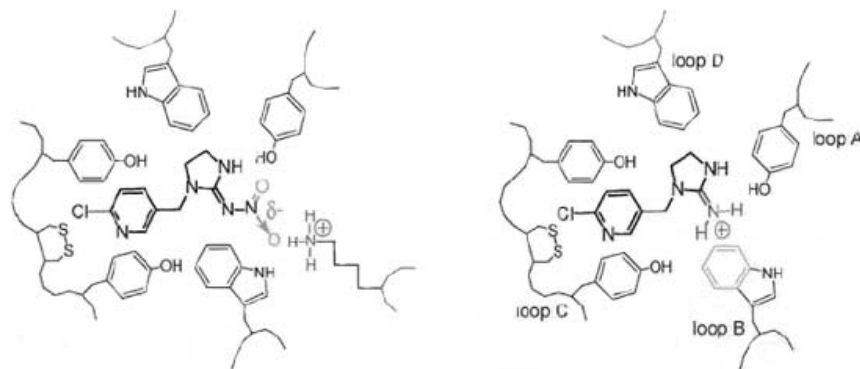
### Vezivanje neonicotinoida za nAChR

Mjesta vezivanja pojedinih podjedinica nazivaju se petlje. Neonicotinoidi se vežu za nAChR koji se sastoje od šest petlji (*Loop*), A do F i nekoliko podjedinica na ekstracelularnoj N-terminalnoj strani. Petlja F, formirana je kao negativna podstrana, te ulazi u reakciju s kvarternim dušikovim atomom ACh i nikotina. <sup>(11)</sup> IMI nema takvog dušikovitog atoma (Sl.1.). Najvažnija dugotrajna posljedica sinaptičke signalizacije je transkripcijska regulacija. nAChR-posredovana transkripcija zahtijeva ulaz kalcija koji se oslobađa s unutarnje strane te aktivira čitav niz enzima. <sup>(12)</sup> Ti enzimi, u povratku, opet aktiviraju transkripcijske faktore, čija ekspresija gena povlači za sobom sintezu neurotransmitera. <sup>(13,14)</sup>



Slika 4. Sinaptička signalizacija

Na slici 5. je prikazano vezivanje IMI-a za nAChR insekata i vezivanje desnitro-IMI-a za receptore sisavaca, oba za ACh agonističku stranu. Neonicotinoidi posjeduju ciano ili nitro grupu u svojoj strukturi koje su elektronegativno nabijene i vezuju se za pozitivno nabijenu stranu receptora insekata u odnosu na protonirane nikotinoide koji zahtijevaju kationsku interakciju za vezivanje na receptore sisavaca.



Slika 5. Vezivanje IMI-a i desnitro-IMI-a za nAChR insekata odnosno sisavaca

Utjecaj IMI-a za nAChR u mozgu insekata je znatno jači u odnosu na sisavce. Npr., sposobnost vezivanja IMI-a za *Drosophila* nAChR je preko 550-puta jača nego sposobnost za  $\alpha 4\beta 2$  sisavaca; IMI je oko 900-puta toksičniji za kućnu muhu nego za miša.<sup>(15,16)</sup> Pretpostavlja se da za razliku od anionske ACh-vezujuće podstrane receptora u sisavaca, podstrana u nAChR insekata sadrži kationske amino kiseline, koje reagiraju sa negativnom nitro grupom IMI-a.<sup>(2)</sup> Sukladno s tim modelom, vrlo male strukturne razlike u molekuli IMI-a, kao što su zamjena =NNO<sub>2</sub> grupe sa =NH (desnitro-IMI, Sl.5.), drastično povećava specifičnost za nAChR sisavaca.<sup>(17)</sup> Imino grupa desnitro-IMI-a se može brzo protonirati što rezultira pozitivnim nabojem i pospješuje sposobnost vezivanja za negativnu ACh podjedinicu sisavaca.<sup>(18)</sup>

### Otpornost štetnika na neonikotinoide

Iako se neonikotinoidi koriste već više od petnaest godina različiti štetnici nisu razvili ili su razvili vrlo slabu otpornost na njihovo djelovanje. Otpornost na neonikotinoide ipak može ovisiti o geografskom području. Studijama koje su proveli Nauen i ostali<sup>(19)</sup> osjetljivost *Myzus persicae* može varirati i više od 20 puta između populacija. Studije provedene na Damsonovoj biljnoj uši, *Phorodon humuli*, su pokazale da nije bilo većih nestalnosti u koncentracijama smrtnim za 95% testirane populacije (LC<sub>95</sub>) između 2001 i 2003 godine (Tablica 2.).

Tablica 2. Odgovor Damsonove biljne uši na IMI

Godina	n	LC <sub>95</sub> (ppm)	FL 95%
2001	3300	13	8,6-23
2002	4620	8,8	4,3-37
2003	3630	10	7,3-16

### 3.Toksikologija

Sprovedene su različite toksikološke studije o štetnim učincima IMI-a na ljudsko zdravlje, djelovanju na jetru i štitnu žlijezdu pri subkroničnoj i kroničnoj izloženosti. *Risk Characterization Document (RCD)* je utvrdio moguće štetno djelovanje na zdravlje pri izloženosti ostacima IMI-a u hrani i vodi za piće. Npr. akutna oralna LD<sub>50</sub> za štakore je oko 450 mg/kg tjelesne mase, dok je dermalna LD<sub>50</sub> >5000 mg/kg. Zbog slabog vezivanja za acetilkolinske receptore, neonikotinoidi se ne akumuliraju u masnom tkivu i ne prenose kroz moždanu barijeru.<sup>(20)</sup>

Tablica 3. Vezivanje IMI-a (mjereno kao radioaktivnost ili dpm-dezintegracija po minuti) za nAChR u različitim dijelovima tijela sisavaca i insekata <sup>(21)</sup>

Vrsta	Mozak	Glava	Cijelo tijelo
Sisavci	<0,01		
Insekti			
Kućna muha		16	1,4
Voćne mušice			2,1
Zrikavci	42	0,6	<0,05
Pčele		2,3	0,33
Žohari	24		0,09

IMI i ostali neonikotinoidi su selektivno toksični prema insektima zbog farmakodinamskih i farmakokinetičkih ograničenja u reakciji s ACh receptorima u sisavaca (Tablica 4.).

Tablica 4. Specifičnost neonikotinoidnih insekticida, metabolita IMI-a (desnitro-IMI-a), metabolita thiacloprida (descyanothiacloprid) i nikotina za nAChR insekata i sisavaca <sup>(22)</sup>

Insekticid	IC <sub>50</sub> (nM) Insekti	IC <sub>50</sub> (nM) Sisavci	Selektivnost Sisavci/ Insekti
Nikotin	4000	7,0	0,002
Imidakloprid	4,6	2600	565
Desnitro-imidakloprid	1530	8,2	0,005
Thiametoxam	5000	>100000	>20
Acetamiprid	8,3	700	84

IC<sub>50</sub> je insekticidna koncentracija koja uvjetuje 50% efikasnosti na acetilkolinskim receptorima. Niža IC<sub>50</sub> predstavlja vrlo jaku interakciju insekticida s receptorom. Razgradnjom insekticida nastaju metaboliti koji mogu biti toksičniji nego li sama materinska komponenta. Npr. olefinski metabolit IMI-a pokazuje istu toksičnost za pčele<sup>(18)</sup>, dok je desnitro-IMI mnogo toksičniji u sisavaca nego sama materinska komponenta. IMI kao i ostali neonikotinoidi svrstavaju se prema EPI u ekološki prihvatljive insekticide, zbog niske toksičnosti u sisavaca, osobito kada se ne prekoračuju prihvatljive koncentracije. Jedna od važnih činjenica je da koncentracija neonikotinoida koja će izazvati efektan učinak na štetnike je oko 10 puta niža nego kod organofosfornih i karbamatnih insekticida. Tablica 5. uspoređuje akutnu toksičnost nekoliko neonikotinoidnih insekticida i nikotina u glodavaca, ptica i riba.<sup>(22)</sup>

Tablica 5. Akutna toksičnost neonikotinoida

Neonikotinoidi	Akutna Oralna LD <sub>50</sub> Štakori (mg/kg)	NOAEL (mg/kg/dan)	Akutna Oralna LD <sub>50</sub> Ptice (mg/kg)	LC <sub>50</sub> Ribe (mg/L)
Nikotin	50-60	--	"Toksičan"	4
Imidakloprid	450	5,7	31	211
Thiametoxam	1563	0,6	1552	>100
Clothianidin	>5000	9,8	>2000	>100
Thiacloprid	640	1,2	49	31
Acetamiprid	182	7,1	180	>100

U Tablici 6. je prikazana usporedba toksičnosti glavnih grupa insekticida i njihova selektivnost.<sup>(22)</sup>

Tablica 6. Usporedba akutne toksičnosti glavnih skupina insekticida

Klasa	Djelovanje	Štakori (mg/kg)	Insekti (mg/kg)	Odnos (štakori/insekti)
Neonikotinoidi	nAChR	912	2,0	456
Organofosfati	AChE	67 (83)	2,0 (50)	33
Metilkarbamati	AChE	45 (15)	2,8 (27)	16
Poliklorocikloalkani	Na <sup>+</sup> ili Cl <sup>-</sup> kanali	230 (21)	2,6 (26)	91
Piretroidi	Na <sup>+</sup> kanali	2000 (11)	0,45 (35)	4500

## Zaključci

Neonikotinoidi pokazuju mnogo manju toksičnost u odnosu na druge skupine insekticida. Najvažnija uloga je njihov selektivni mehanizam djelovanja na nikotinske acetilkolinske receptore insekata u odnosu na sisavce, a javlja se uslijed elektrostatske interakcije nitroiminske grupe dušika sa nAChR aminokiselinskim ostacima. Vrlo su efikasni u suzbijanju različitih vrsta insekata i otpornost koju insekti razvijaju protiv njih je relativno mala. Povećanje proizvodnje neonikotinoida sa tri nova pripravka, Thiaclopridom, Clothianidinom i Dinotenfuranom doprinjeti će još boljom kontrolom štetnika.

## Reference

1. M. Tomizawa and I. Yamamoto (1993) *J Pestic Sci.* 18, 91-98;
2. M. Tomizawa et al (2003) *Biochemistry.* 42, 7819-7827;
3. M. Beckmann and K. J. Haack (2002) *Chemie in unserer Zeit.* 45,569;
4. R. Nauen et al (2001) BSN 2060 - A novel compound for whitefly and spider mite control. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases*, 2A-3, 39-44;
5. K. Matsuda et al (2001) *Trends Pharmacol Sci.* 22,573-580;
6. D. Bai et al (1991) *Pestic sci.* 33,197-204;
7. J.T. Littleton and B. Ganetzky (2000) *Neuron.* 26,35-43;
8. A. Zhang, et al (2000) *J Neurochem.* 75, 1294-1303;
9. M. Tomizawa and J. E. Casida (2003) *Annu Rev Entomol.* 48,339-344;
10. M.E. Schroeder and R.F. Flattum (1984) *Pestic Biochem Physiol.* 22,148-160;
11. P. J Corringer et al (2000) *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 40,431-458;
12. Q. Liu and D.K. Berg (1999) *J Neurosci.* 19 ,10280-10288;
13. K. Chang and D. K. Berg (2001) *Neuron.* 32,855-865;
14. V. D. G ueorguiev et al (2000) *J Neurochem.* 75,1997-2005;
15. M. Tomizawa et al (2000) *J Agric Food Chem.* 48,6016-6024;
16. M. Tomizawa et al (2001) *Toxicol Appl Pharmacol.* 177, 77-83;
17. M. Tomizawa and J. Casida (1999) *Br J Pharmacol.* 127,115-122;
18. K. Matsuda et al (2000) *Br J Pharmacol.* 130, 981-986;
19. R. Nauen (2001) *Pestic Sci.* 52,53-57;
20. B. Petersen and C. Walls (2001) Modeling Dietary Exposure and Special Section on Modeling Aggregate and Cumulative Exposure. In R. Krieger (Ed). *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 1., Academic Press, San Diego, California;
21. M. Liu et al (1993) *Pestic Biochem Physiol.* 46,200-206;
22. M. Tomizawa and J.E. Casida (2005) *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45,247-68.