

ENZIMSKA RAZGRADNJA KARBAMATA

MIRA ŠKRINJARIĆ-ŠPOLJAR i ELSA REINER

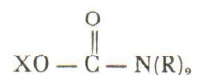
*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Jugoslavenske akademije
znanosti i umjetnosti, Zagreb*

(Primljeno 15. III 1968)

U ovom prikazu opisan je mehanizam hidrolize karbamata u vodenim otopinama i metabolizam karbamata u sisavcima i insektima.

Poznato je da su esteri karbaminske kiseline inhibitori kolinesteraza. Jediní prirodni spoj te grupe – eserín – izoliran je već prije 100 godina, a prije 40 godina identificiran je kao N-metilkarbamát (1). Od tog vremena do danas sintetizirano je niz estera karbaminskih kiselina sa širokom primjenom u medicini, javnom zdravstvu i poljoprivredi (2, 3, 4).

Po kemijskoj strukturi su biološki aktivni karbamati esteri N-alkil ili N-dialkilkarbaminske kiseline opće formule (1):



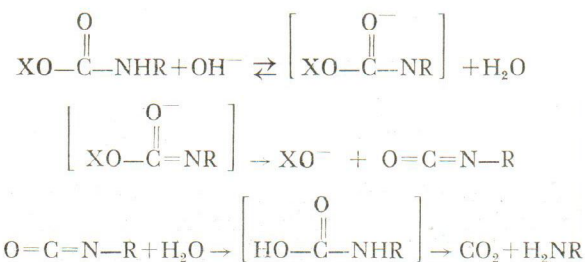
U spojeva koji se primjenjuju kao insekticidi jedan *R* je obično metil, a drugi je vodik; *X* je najčešće supstituirani fenil. Kod spojeva koji posjeduju veoma izražena antikolinesterazna svojstva radikal *X* sadrži baznu dušikovu skupinu, kojoj je $\text{pH} > 8$, tako da je pri fiziološkom pH takav spoj gotovo sasvim ioniziran. Karbamati koji sadržavaju kvarterni dušik u povoljnoj udaljenosti od esterske veze su naročito jaki inhibitori kolinesteraza (5), kao na primjer neostigmin i njegov monometilni analog (6). Smatra se da pozitivni naboj u molekuli povećava inhibičnu moć nekog spoja vezanjem inhibitora elektrostatskim silama na anionsku stranu aktivnog centra kolinesteraza (7).

Toksičnost karbamata pripisuje se prvenstveno inhibičiji kolinesteraze. Za razumijevanje mehanizma toksičnog djelovanja potrebno je, međutim, poznavati i niz drugih svojstava i djelovanja tih spojeva, a jedan od važnih faktora je metabolizam karbamata i eventualno toksično djelovanje nastalih metabolita.

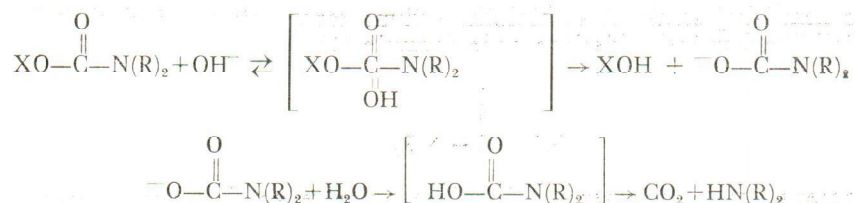
MEHANIZAM HIDROLIZE KARBAMATA

Već je *Stedman* (8) ustanovio da se neki karbamati razlažu u kipećoj vodi uz razvijanje mirisa na izocijanat. *Aeschliman* i *Reinert* (9) su do istog rezultata došli pri istraživanju stabilnosti nekih N-monosupstituiranih karbamata; miris izocijanata javljao se nakon nekoliko sati i bez zagrijavanja, a trenutno pri temperaturi vrenja. N-metilkarbamati se pri temperaturama iznad 100 °C vrlo lako razlažu u metilizocijanat i fenol (10).

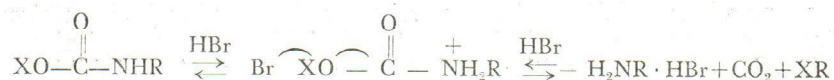
Hidroliza karbamata u alkalnom mediju slijedi kinetiku reakcije drugog reda, a mehanizam hidrolize N-alkilkarbamata različit je od mehanizma hidrolize N-dialkilkarbamata (11). Kod N-alkilkarbamata stvara se kao međuprodukt izocijanat:



Pri hidrolizi N-dialkilkarbamata međuprodukt je karbamatni ion:



Karbamati su relativno stabilni u kiselinama, ali djelovanje solne ili bromne kiseline na karbamate u ledenoj octenoj kiselini dovodi do ovih reakcija (11):

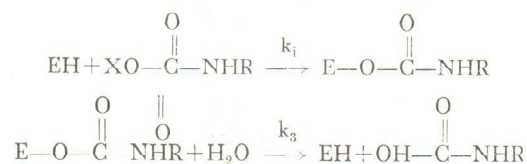


U literaturi su objavljene mnoge vrijednosti konstanta brzine hidrolize karbamata (12, 13). Prema *Kolbezenu* i sur. (3) esteri N-etil, N-benzil i N-fenilkarbaminske kiseline brže se hidroliziraju od odgovarajućih N-metil derivata. U drugom nizu karbamata stabilnost raste u nizu ovih alkilnih supstituenata karbamilne skupine (13): monoizopropil < monoetil < mono-n-propil < monometil < dimetil < dietil < di-n-propil < di-n-butil < di-izopropil.

METABOLIZAM KARBAMATA U SISAVCIMA
I INSEKTIMA

Hidroliza i oksidacija su najčešći mehanizmi razgradnje estera karbaminskih kiselina *in vivo*. Između metabolizma karbamata u sisavcima i metabolizma u insektima nema bitne razlike, a slijed reakcija koji doводи do razgradnje nekog spoja u organizmu nije moguće predskazati na osnovu poznate biološke sudbine sličnih molekula (5, 14, 15).

Kolinesteraze reagiraju s karbamatima tako da se stvara karbamilirani enzim, koji zatim reagira s vodom i daje odgovarajuću karbaminsku kiselinu i slobodnu kolinesterazu (16, 17, 18):



EH predstavlja kolinesterazu, k_i je konstanta brzine inhibicije, a k_3 je konstanta brzine spontane reaktivacije. Prema toj reakcijskoj shemi, kolinesteraze hidroliziraju karbamate, ali s obzirom na to da je prijetvorni broj, tj. k_3 konstanta, relativno malena, nije vjerojatno da kolinesteraze igraju značajnu ulogu u razgradnji karbamata *in vivo*.

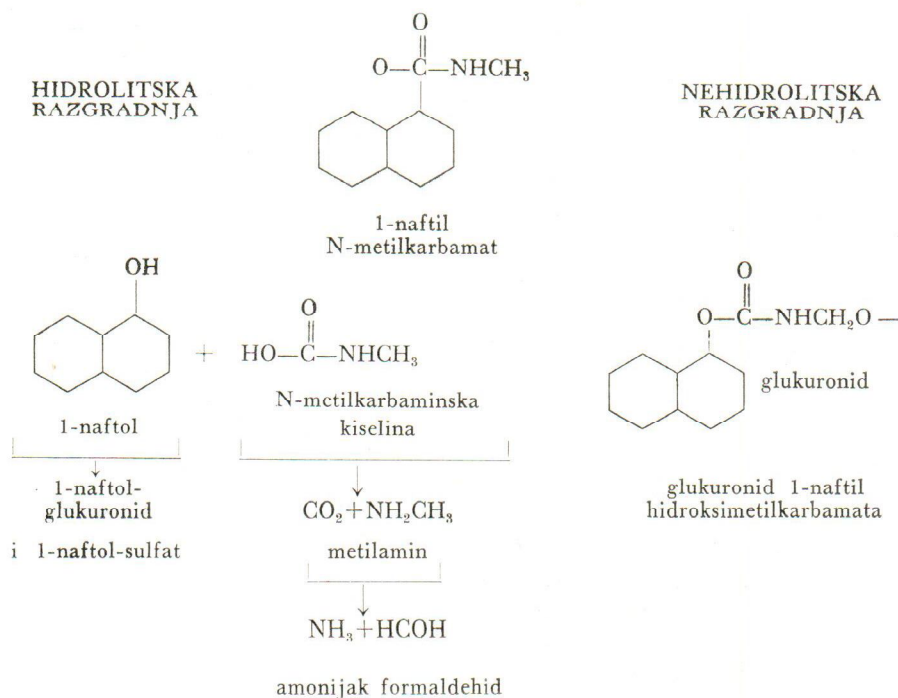
Osim sa kolinesterazama, karbamati reagiraju i sa drugim esterazama. Tako je, na primjer, hidroliza fenilacetata i nekih estera glicerina inhibirana u miševa i štakora trovanih nekim karbamatskim insekticidima; inhibicija je reverzibilna i nije poznat mehanizam interakcije enzima i inhibitora, pa prema tome niti uloga te reakcije u mehanizmu razgradnje karbamata (19, 20). Hidrolizu p-nitrofenil N-metilkarbamata kataliziraju u neznatnoj mjeri ovi enzimi: arilesteraze ljudske plazme, kolinesteraze, kimotripsin, pepsin i lipaza (13).

Hidroliza 1-naftil N-metilkarbamata, koji je još poznat i pod imenom sevin, veoma je opsežno studirana. *Augustinsson* i *Casida* (21) mjerili su brzinu hidrolize sevinu u plazmi 15 životinjskih vrsta. Najaktivnije su bile plazme kunića i svinje, a najmanje aktivna plazma miša. Plazma kunića bila je 2-3 puta aktivnija od drugih tkiva kunića, kao na primjer jetre, bubrega i mozga. *Casida* i *Augustinsson* (22) su elektroforetskom separacijom plazme 8 vrsta životinja pokazali da se hidroliza sevinu odvija u albuminskoj frakciji plazme, a da sevin ne hidroliziraju arilesteraze ni karboksilesteraze. Jednak rezultat dala je i separacija proteina ljudske plazme metodom frakcioniranog taloženja etanolom prema *Cohnu* i sur. (23): aktivnost prema sevinu bila je vezana uz albuminsku frakciju (22). Osim sevinu, albuminska frakcija plazme hidrolizira i neke supstituirane fenil N-alkilkarbamate, ali ne katalizira hidrolizu derivata karbamilkolina (24).

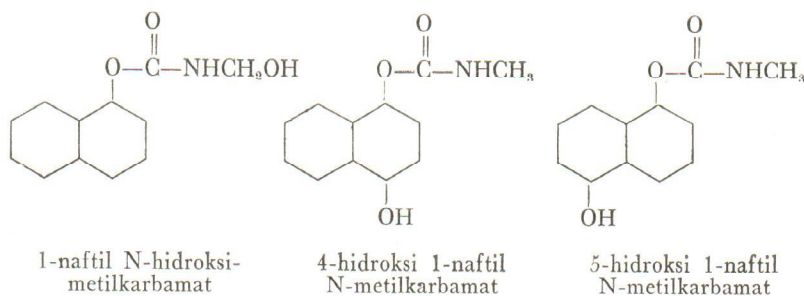
Osim sevinu, *Augustinsson* i *Casida* (21) studirali su također i hidrolizu N-dimetilkarbamilfluorida u 16 različitih tkiva kunića i u plazmi

10 vrsta kralježnjaka, uključivši kunića; plazma kunića bila je najaktivnija. Od istraženih tkiva, spomenuti spoj hidrolizirao se u znatnijoj mjeri samo u homogenatima jetre i bubrega. Na osnovu elektroforetske separacije i djelovanja iona nekih metala autori su zaključili da bi esterase plazme koje hidroliziraju N-dimetilkarbamilfluorid mogle biti identične s enzimima koji hidroliziraju diizopropil fluorofosfat.

Hassan, Zaved i Abdel-Hamid (25) studirali su metabolizam sevina na štakorima, kojima je jednokratno apliciran sevin označen sa ^{14}C . Unutar 48 sati nakon aplikacije nađeno je 75–80% aktivnosti u urinu i izdisanom zraku. Hidrolizom sevina nastala je N-metilkarbaminska kiselina, koja se spontano raspala na ugljični dioksid i metilamin. Ugljični dioksid sačinjavao je 43.5% aktivnosti ^{14}C . Nehidrolitskim putem eliminirao se u urinu jedan metabolit sevina, koji je vjerojatno bio vezan na glukuronsku kiselinu. Taj metabolit predstavlja 56.5% aktivnosti ^{14}C . Metabolit u urinu vjerojatno sadrži N-hidroksimetilnu skupinu umjesto N-metilne u molekuli sevina. Taj nalaz govori u prilog rezultata *Dorrougha, Leelinga i Caside* (26) koji su našli da se u mikrosomima jetre štakora uz dodatak nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD) oksidira metilna grupa sevina. Na osnovu svojih rezultata *Hassan, Zaved i Abdel-Hamid* (25) postavili su ovu shemu metabolizma sevina u štakorima:



Metabolizam sevina u ličinkama *Prodania litura* F. također se odvija hidrolitskim i nehidrolitskim putem kao i u štakora (27), ali s tom razlikom što hidroliza doprinosi svega 14% razgradnji, a nehidrolitski put 86%. Nehidrolitskim metabolizmom modificira se naftalenski prsten, i to vjerojatno hidroksiliranjem. Autori smatraju da se nastali metabolit nije vezao na detoksicirajuću supstanciju i uspoređuju svoje rezultate s rezultatima *Dorougha* i *Casida* (28), koji su također ustanovili da detoksikacija sevina u insektima ne uključuje vezanje na glukozu, glukuronsku kiselinu ili sulfat. *Dorough* i *Casida* (28) našli su 8 metabolita sevina u žoharima i muhama, te u mikrosomima jetre štakora. Tri metabolita su vjerojatno:



Dva neidentificirana metabolita sadržavaju intaktnu strukturu: — C — O — C(O) — N — C —, a dva neidentificirana metabolita nisu karbamati. Osmi metabolit je 1-naftol.

p-Nitrofenil N-dialkilkarbamati također se metaboliziraju u mikrosomima jetre štakora uz prisustvo molekularnog kisika i NAD (29). Metaboliti nisu identificirani, ali daljom degradacijom metabolita dobiven je 1 mol formaldehida na svaki mol p-nitrofenola. Autori smatraju da je prvi stepen u metabolizmu istraženih spojeva uslijedio na jednoj metilnoj skupini.

Studij spojeva koji potenciraju toksično djelovanje karbamata mnogo je pridonio razjašnjenju mehanizma djelovanja karbamata (1). Smatra se da se jedan od glavnih putova sinergističkog djelovanja mnogih spojeva sastoji u inhibiciji oksidacije koja detoksicira karbamate. Tako je, na primjer, dokazano da SKF-525-A $[(C_2H_5)_3N \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot O \cdot CO \cdot C(C_6H_5) (C_3H_7)]$ i piperonilbutoksid inhibiraju oksidaciju p-nitrofenil N-dimetilkarbamata i p-nitrofenil N-dietilkarbamata u mikrosomima (29). SKF-525-A također inhibira metabolizam neostigmina u mikrosomima jetre štakora (30).

Praćenje metabolizma markiranjem jednog od atoma u molekuli standardni je postupak pri studiju razgradnje nekog spoja. Međutim, nakon razgradnje se markirani atom ne mora nužno naći u metabolitu ishodne supstancije, nego može posati sastavni dio prirodnih spojeva. *Dorough* i *Ivie* (31) pratili su metabolizam furadana (2,2-dimetil 2,3-dihidro 7-benzofuranil N-metilkarbamata) u krava muzara kojima je ^{14}C -fura-

dan apliciran oralno. Kada je furadan sadržavao označenu karbonilnu skupinu, nađeno je u mlijeku krava 2% doze ^{14}C . Radioaktivni materijal u mlijeku nije bio metabolit furadana nego normalni sastavni dio mlijeka. Autori smatraju da je prekursor tog radioaktivnog spoja vjerojatno markirani ugljični dioksid, koji je nastao hidrolizom furadana. Nakon markiranja furadana u benzofuranilnom prstenu autori su našli u mlijeku 0.2% dodane ^{14}C doze. Ali ta aktivnost je potjecala od metabolita furadana.

Metabolizmom karbamati ne gube uvijek svoje inhibitorno svojstvo prema kolinesterazama, što su dokazali *Hodgson* i *Casida* (32) za metabolite nekih N-dimetilkarbamata koje su dobili iz homogenata jetre štakora. U opsežnom radu o metabolizmu većeg broja metil- i dimetilkarbamata u mikrosomima jetre štakora, *Oonnithan* i *Casida* (33) su dokazali da u pravilu hidrolizom karbamata i njihovih metabolita nastaju spojevi koji nemaju antikolinesterazna svojstva, dok nehidrolitskim metabolizmom (hidroksiliranjem, dealkiliranjem, sulfoksidiranjem) neki spojevi zadržavaju inhibitorna svojstva prema kolinesterazama, a neki metaboliti imaju dapače i jača antikolinesterazna svojstva od ishodnog spoja. Isti autori su nadalje dokazali da se karbamati vežu na mikrosome jetre štakora, vjerojatno karbamiliranjem nekih proteina, a ta veza je stabilnija nego karbamilirana kolinesteraza.

Brojni i među sobom različiti putovi metabolizma karbamata u sisavaca i insekata vjerojatno su i važan faktor koji uzrokuje razlike u toksičnosti estera karbaminskih kiselina za različite životinjske vrste (5, 34).

Literatura

1. *Casida, J. E.*: Mode of Action of Carbamates, *Ann. Rev. Entom.*, 8 (1963) 39.
2. *Gysin, H.*: Über einige neue Insektizide, *Chimia*, 8 (1954) 205 i 221, cit. prema 1.
3. *Kolbezen, M. J., Metcalf, R. L., Fukuto, T. R.*: Insecticidal Activity of Carbamate Cholinesterase Inhibitors, *J. Agr. Food Chem.*, 2 (1954) 864.
4. *David, W. A. L., Metcalf, R. L., Winton, M.*: The Systemic Insecticidal Properties of Certain Carbamates, *J. Econ. Entom.*, 53 (1960) 1021.
5. *O'Brien, R. D.*: Organophosphates and Carbamates. u: »Metabolic Inhibitors«, Ed. R. M. Hochster i J. H. Quastel. Academic Press, London, 1963, Vol. II, str. 207.
6. *Reiner, E., Aldridge, W. N.*: Effect of pH on Inhibition and Spontaneous Reactivation of Acetylcholinesterase Treated with Esters of Phosphorus Acids and of Carbamic Acids, *Biochem. J.*, 105 (1967) 171.
7. *Wilson, I. B.*: The Mechanism of Enzyme Hydrolysis Studied with Acetylcholinesterase, u: *The Mechanism of Enzyme Action*, Izd. W. D. McElroy i B. Glass, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, str. 642.
8. *Stedman, E.*: Studies on the Relationship Between Chemical Constitution and Physiological Action. I. Position Isomerism in Relation to Miotic Activity of Some Synthetic Urethanes, *Biochem. J.*, 20 (1926) 719, cit. prema 1.
9. *Aeschlimann, J. A., Reinert, M.*: The Pharmacological Action of Some Analogues of Physostigmine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 43 (1931) 413, cit. prema 1.

10. Krishna, J. G., Dorrough, H. W., Casida, J. E.: Synthesis of N-methylcarbamates via Methyl Isocyanate-C¹⁴ and Chromatographic Purification, *J. Agr. Food Chem.*, **10** (1962) 462.
11. Adams, P., Baron, F. A.: Esters of Carbamic Acid, *Chem. Rev.*, **65** (1965) 567.
12. Chaikin, S. W.: Study of the Hydrolysis of Several Physostigmine Analogs, *J. Am. Chem. Soc.*, **69** (1947) 1266.
13. Casida, J. E., Augustinsson, K. B., Jonsson, G.: Stability, Toxicity and Reaction Mechanism with Esterases of Certain Carbamate Insecticides, *J. Econ. Entom.*, **53** (1960) 205.
14. Casida, J. E.: Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance, Intern. Atomic Energy Agency, Beč 1963, str. 223.
15. Casida, J. E.: Esterase Inhibitors as Pesticides, *Science*, **146** (1964) 1011.
16. Wilson, I. B., Hatch, M. A., Ginsburg, S.: Carbamylation of Acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.*, **235** (1960) 2312.
17. Reiner, E., Simeon-Rudolf, U.: The Kinetics of Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Monomethylcarbamates, *Biochem. J.*, **98** (1966) 501.
18. Winteringham, F. P. W., Fowler, K. S.: Substrate and Dilution Effects on the Inhibition of Acetylcholinesterase by Carbamates, *Biochem. J.*, **101** (1966) 127.
19. Baron, R. L., Casterline, J. L., Fitzhugh, O. G.: Specificity of Carbamate-induced Esterase Inhibition in Mice, *Toxic. Appl. Pharmacol.*, **6** (1964) 402.
20. Baron, R. L., Casterline, J. L., Orzel, R.: In vivo Effect of Carbamate Insecticides on Mammalian Esterase Enzymes, *Toxic. Appl. Pharmacol.*, **9** (1966) 6.
21. Augustinsson, K. B., Casida, J. E.: Enzymic Hydrolysis of N:N-dimethylcarbamoyl Fluoride, *Biochem. Pharmacol.*, **3** (1959) 60.
22. Casida, J. E., Augustinsson, K. B.: Reaction of Plasma Albumin with 1-Naphthyl N-Methylcarbamate and Certain Other Esters, *Biochim. Biophys. Acta*, **36** (1959) 411.
23. Cohn, E. J., Gurd, F. R. N., Surgenor, D. M., Barnes, B. A., Broen, R. K., Dercauxm, G., Gillespie, J. M., Kahnt, F. M., Lever, W. F., Liu, C. N., Mittelman, D., Mounton, R. F., Schmidt, K., Uroma, F.: A System for the Separation of the Components of Human Blood: Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma, *J. Am. Chem. Soc.*, **72** (1950) 465.
24. Augustinsson, K. B., Fredriksson, T., Suidwall, A., Jonsson, G.: Biochemical and Pharmacological Studies on N-methylated Carbamoylcholines, *Biochem. Pharmacol.*, **3** (1959) 68.
25. Hassan, A., Zayed, S. M. A. D., Abdel-Hamid, F. M.: Metabolism of Carbamate Drugs, I. Metabolism of 1-naphthyl N-methylcarbamate (Sevin) in the Rat, *Biochem. Pharmacol.*, **15** (1966) 2045.
26. Dorrough, H. W., Leeling, N. X., Casida, J. E.: Nonhydrolytic Pathway in Metabolism of N-methylcarbamate Insecticides, *Science*, **140** (1963) 170.
27. Zayed, S. M. A. D., Hassan, A., Hussein, T. M.: Metabolism of Carbamate Drugs. II. Degradation of 1-naphthyl N-Methylcarbamate (Sevin) in Adult Larva of the Cotton Leaf Worm (*Prodenia litura* F.), *Biochem. Pharmacol.*, **15** (1966) 2057.
28. Dorrough, H. W., Casida, J. E.: Nature of Certain Carbamate Metabolites of the Insecticide Sevin, *J. Agr. Food Chem.*, **12** (1964) 294.
29. Hodgson, E., Casida, J. E.: Biological Oxidation on N,N-dialkyl Carbamates, *Biochem. Biophys. Acta*, **42** (1960) 184.
30. Roberts, J. B., Thomas, B. H., Wilson, A.: Metabolism of Neostigmine *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **17** (1968) 9.
31. Dorrough, H. W., Ivie, G. W.: Carbon-14 Milk Constituents from Cows Fed Carbamate Labelled with Carbon-14 on the Carbonyl, *Science*, **159** (1968) 732.
32. Hodgson, E., Casida, J. E.: Metabolism of N:N-dialkyl Carbamates and Related Compounds by Rat Liver, *Biochem. Pharmacol.*, **8** (1961) 179.

33. *Oonnithan, E. S., Casida, J. E.*: Oxidation of Methyl- and Dimethylcarbamate Insecticides by Microsomal Enzymes and Anticholinesterase Activity of the Metabolites, *J. Agr. Food Chem.*, 16 (1968) 28.
34. *Metcalf, R. L., Fukuto, T. R.*: Effect of Chemical Structure on Intoxication and Detoxication of Phenyl N-methylcarbamates in Insects, *J. Agr. Food Chem.*, 13 (1965) 220.

Summary

CARBAMATE METABOLISM

In this review article the metabolism of carbamates in mammals and insects is described. Special attention has been paid to the mechanism of carbamate hydrolysis.

*Institute for Medical Research,
Yugoslav Academy of Sciences and Arts,
Zagreb*

*Received for publication
March 15, 1968*