

## TEORIJSKO ISTRAŽIVANJE OKSIDACIJE MELATONINA SA TAURINOM\*

Elvisa Hodžić\*\*, Halid Makić, Sebila Rekanović, Mejra Bektašević

(ORIGINALNI NAUČNI RAD)  
UDK 66.094.3+615.35:547.47

Univerzitet u Bihaću, Biotehnički fakultet, Bihać, Bosna i Hercegovina

Melatonin, sekretorni proizvod pinealne žlezde, se proizvodi u više ćelija i organa. Međutim, krvni nivoi melatonina su izvedeni gotovo isključivo iz epifize sisavaca. Delovanje melatonina je mnogo rašireno. Poznat je po svojim antioksidativnim, imunomodulatornim i protu-upalnim efektima [1]. Taurin je najobilnija slobodna amino kiselina u leukocitima. U aktiviranim neutrofilima taurin se pretvara u taurin hloramin (Tau-NHCl) kroz reakciju s HOCl, endogenim oksidantom koji se neutralizira sa melatoninom. Cilj rada je bio primenom metoda molekularnog modeliranja istražiti reaktivnost taurina sa melatoninom. Poređena je geometrija, termodinamička svojstva, te IR spektri jedinjenja. Izračunavanje je vršeno na različitim teorijskim nivoima: semi-empirijskim (PM3) i Hartree-Fock (HF, 3-21G). Nađeno je da melatonin reagira sa taurinom i formira metabolite melatonina: 2-hidroksimelatonin, te N1-acetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) [11]. Izračunati atomski naboji pokazuju da su atomi nitrogena najverovatnije mesta za interakciju sa drugim jedinjenjima. Dobivene vrednosti rezultata primenom semi-empirijskih i *ab initio* nivoa su različite i nisu pouzdane u analiziranju eksperimentalnih podataka.

**Ključne reči:** melatonin, spartan, taurin, *ab initio*, semi-empirijske metode

### Uvod

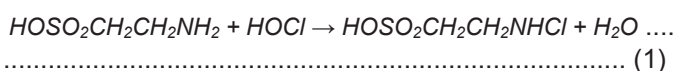
Taurin je poluesencijalna aminokiselina. Nije inkorporirana u proteinima, ali ipak se smatra esencijalnom aminokiselinom za mačke i uvetno esencijalnom za čoveka. Taurin je prisutan u ćelijama sisavaca i predstavlja najobilniju aminokiselinu u srcu, mrežnici, skeletnim mišićima, mozgu i leukocitima. Sadrži sumpor i prisutan je u visokim koncentracijama u plazmi i ćelijama sisavaca, te igra važnu ulogu u brojnim biološkim procesima, poput konjugacije žučne kiseline, antioksidacije, razvoja centralnog nervnog sistema i mrežnice, moduliranja kalcija, stabilizacije membrane, reprodukcije i imuniteta [2,3]. Na primer, oralna primena taurina djelotvorna je u suzbijanju arsenom izazvanog oksidativnog stresa i apoptozi testikularnog tkiva kod štakora [4]. Taurin je neobična biološka molekula jer sadrži sulfonsku kiselinu, dok većina bioloških kiselina sadrži slabije kiselu karboksilnu grupu. Iako se ponekad naziva aminokiselinom, te doista predstavlja kiselinu koja sadrži amino grupu, nije aminokiselina u uobičajenom biohemijskom smislu (jedinjenja koja sadrže i amino i karboksilnu grupu).

Nivoi cisteina i dekarboksilaze sulfinilne kiseline, enzima neophodnih za biosintezu taurina, su veoma niski kod mačaka i niski kod čoveka. Iz tih razloga taurin se dodaje u hranu za dojenčad i u parentalne otopine. Prisutan je u hrani, posebno purećem i pilećem crvenom

mesu, mleku, morskim plodovima gde je zastupljen u najvećim količinama [5]. Glavni dnevni unos određen je na oko 58mg [6].

Istraživanja provedena na životinjama nisu ustanovila toksično delovanje taurina, a ustanovljeno je da suplementacija taurinom značajno sužava ozbiljnost dijareje, skraćivanja debelog creva, aktivnost mijeloperoksidaze i abnormalnog delovanja makrofaga inflamatornog proteinskog gena kod kolitisa štakora [7].

U stimuliranim neutrofilima taurin se prevodi u taurin hloramin (Tau-NHCl) reakcijom sa HOCl (moćnim antimikrobnim agensom), prema reakciji 1:



Tau-NHCl je blagi antioksidans, a predloženo je i da služi kao oksidativni spremnik, izlagajući bilo kašnjenje oksidativnog efekta ili delujući kao oksidans na udaljenom mestu.

Melatonin je neurohormon sintetiziran iz aminokiseline triptofana i izlučivan iz pinealne žlezde u mozak. Melatonin je poznat po svom antioksidativnom, imunomodulatornom i protu-upalnom delovanju [8,9], poboljšavajući tako cirkadijarni ritam, krvni pritisak, reprodukciju i

\*Rad saopšten na X Simpozijumu „Savremene tehnologije i privredni razvoj“ sa međunarodnim učešćem, Leskovac, 22. i 23. oktobar 2013. godine

\*\* Adresa autora: Elvisa Hodžić, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Bihaću, Luke Marjanovića bb, 77000 Bihać, Bosna i Hercegovina

E-mail: elly\_civic@hotmail.com

Rukopis primljen: 05. jula 2013. godine

Rad prihvaćen: 05. septembra 2013. godine

imunitet. Sinteza melatonina se vrši noću, a svetlost je inaktivniše [10].

Uključenje melatonina i taurina u inflamatornom procesu i mogućnošću melatonina da deluje kao inhibitor mijeloperoksidaze, te skupljač HOCl, prekursora za Tau-NHCl, ukazuje na to da hemijski mehanizam ovih procesa može biti značajan u lečenju ljudskih bolesti [11].

Ranijim istraživanjima ispitana je reaktivnost melatonina sa taurinom i određen uticaj reakcijskog medija na pomenutu reakciju, te karakterizirani produkti reakcije [11]. Cilj ovog rada je, prema tome, bio da se ispitaju termodinamični parametri oksidacije melatonina taurinom primenom teorijskih metoda molekularnog modeliranja, na različitim novoima teorije.

### Eksperimentalni deo

Primenom metoda molekularnog modeliranja istražili smo reaktivnost taurina sa melatoninom i njegovim najznačajnijim metabolitom. Geometrijska optimizacija melatonina i njegovog metabolita vezanih za taurin rađena je u SPARTAN '08 programu molekularnog modeliranja. Izračunavanje je vršeno na različitim teorijskim nivoima: semi-empirijskim (PM3), Hartree-Fock, te teorijom funkcionalne gustoće (B3-LYP). Optimizirane su strukture, te izračunati atomski naboji i neka termodinamička svojstva. Konačno, izračunati su i IR spektri optimiziranih jedinjenja.

Izračunavanje počinje unosom („bilanjem“) analiziranih struktura jedinjenja, minimiziranjem njihove energije, te jednostavnim odabirom zelenih izračunavanja na programskoj traci.

### Molekularno modeliranje

Molekularno modeliranje obuhvata sve teorijske metode i računalne tehnike koje se koriste za modeliranje, ili oponašanje ponašanja molekula. Tehnike se koriste u području kompjuterske hemije, kompjuterske biologije i nauke o materijalima, te za proučavanje molekularnih sistema u rasponu od malih hemijskih sistema do velikih bioloških molekula i materijalnih sklopova.

Zajedničko obilježje tehnika molekularnog modeliranja je opis molekularnih sistema na atomističkom nivou - najniži nivo informacija su individualni atomi (ili mala grupa atoma), što je suprotno kvantnoj hemiji (poznatoj kao izračunavanje elektronskih struktura), gde se eksplicitno razmatraju elektroni. Prednost molekularnog modeliranja

je da smanjuje složenost sistema, dozvoljavajući tako da se razmatraju mnoge druge čestice za vrijeme simulacija. Molekularni modeli su matematički subjekti proizvedeni primenama fizičkih zakona na hemijske sisteme.

Molekularno mehanička i kvantno hemijska izračunavanja igraju veliku, ali i sve veću ulogu u modernoj hemiji. Primarna funkcija je da opskrbe informacije o strukturi, relativnoj stabilnosti i drugim osobinama izoliranih molekula. Zbog njihove inherentne jednostavnosti, molekularno mehanička računanja na složenim molekulama su široko rasprostranjena u cijeloj hemijskoj zajednici. Kvantno-hemijska računanja, uključujući i Hartree-Fock molekulsku orbitalna računanja, ali posebno izračunavanja koja uključuju elektronske korelacije, zahtevaju mnogo više vremena.

Molekularno mehaničke i dinamičke metode koriste Njutnovu mehaniku. Molekula se posmatra kao zbir čvrstih sfera (jezgre), povezanih fleksibilnim nitima (hemijske veze). Elektroni se eksplicitno ne uzimaju u obzir, a kao rezultat toga termohemijska svojstva, poput entalpije stvaranja,  $\Delta H_f$ , se ne mogu izračunati.

### Rezultati i diskusija

Ranije istraživanja su pokazala da je taurin endogeni oksidant u velikim količinama proizveden iz stimuliranih neutrofila. Istim istraživanjima utvrđeno je da taurin može vršiti oksidaciju melatonina, gde prvi korak uključuje elektrofilni napad HOCl na atom ugljika indolnog prstena, a drugi nukleofilni napad molekule vode na nitrogenov intermedijat. Konačan rezultat je proizvodnja 2-hidroksimelatonina kao glavnog produkta [11]. Termodinamička svojstva vezivanja melatonina i oksidacijom nastalog metabolita za taurin ispitali smo u ovom radu.

Melatonin zadržava zakrivljenu geometriju u svojoj strukturi, izlažući tako reaktivna mesta prema drugim reaktivnim molekulama (slika 1, 2). Najstabilnija struktura 2-hidroksimelatonina povezanog taurinom zajedno sa HOMO i LUMO energijom prikazana je na slikama 3 i 4.

Izračunati su i u tabeli 1 predstavljeni atomski naboji atoma svih struktura. Računanja na višem nivou teorije HF/6-31 pokazali su veću negativnost u naboju većine atoma. Razlike u naboju atoma kisika računati na višem nivou teorije su znatno manje u odnosu na izračunate naboje atoma azota. Izračunati naboji atoma N ukazuju na moguća mesta vezivanja za interakciju sa elektrofilnim reagensima.

**Tabela 1.** Atomski naboji azota i kisika  
**Table 1.** Atomic charges of nitrogen and oxygen atoms

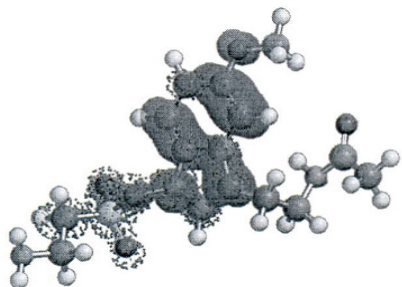
| Atom        | Melatonin+Taurin |          | Hydroksimelatonin+Taurin |          |
|-------------|------------------|----------|--------------------------|----------|
|             | PM3              | HF/6-31G | PM3                      | HF/6-31G |
| N (amin)    |                  |          | -0,843                   | -1,056   |
| N (pirol)   | -0,108           | -0,5624  | -0,485                   | -0,466   |
| N (-CONH)   | -0,655           | -0,9064  |                          |          |
| O (metoksi) | -0,560           |          | -0,289                   | -0,443   |
| O (-CONH)   |                  | -0,6376  | -0,686                   | -0,400   |

U tabeli 2 predstavljena su izračunata termodinamička svojstva simuliranih struktura vezivanja melatonina i njegovog metabolita za taurin, na semi-empirijskom (PM3) i HF (6-31G) nivou. Izračunata ukupna energija struktura tri puta je veća kada je računata na višem nivou teorije (*ab initio*), što ukazuje na to da se računanja na nižim nivoima teorije ne mogu pouzdano primeniti na velike molekule. Prema našim računanjima najstabilnija je struktura vezivanja hidrosimelatonina za taurin i računata na HF/6-31G energetskom nivou, koja i predstavlja konačni produkt oksidacije. Molekula sa najvećom energijom nulte tačke (ZPE) je opet hidrosimelatonin povezan sa taurinom.

**Tabela 2.** Energija simuliranih struktura računatih semi-empirijskim (PM3) i *ab initio* (HF/6-31G) nivoima teorije

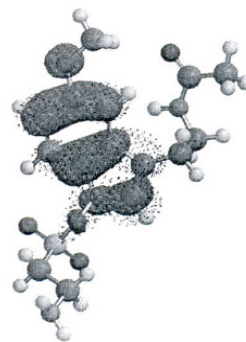
**Table 2.** The energy of simulated structures calculated with semi-empirical (PM3) and *ab initio* (HF/6-31G) levels of theory

| Nivo energije<br>energija (kJ/mol) | Struktura        |                              |
|------------------------------------|------------------|------------------------------|
|                                    | Melatonin+Taurin | Hidrosimelatonin +<br>Taurin |
| <u>Semi-empirijske</u>             |                  | PM3                          |
| Ukupna energija                    | -473,55          | -618,97                      |
| Dipolni moment                     | 6,46 debye       | 5,39 debye                   |
| HOMO energija                      | -69,13           | -856,06                      |
| LUMO energija                      | -840,06          | -34,95                       |
| Toplota stvaranja                  | -473,579         | -618,967                     |
| ZPE                                | 927,03           | 941,89                       |
| <u>Ab initio</u>                   |                  | HF/6-31G                     |
| Ukupna energija                    | -1507,259        | -1581,687                    |
| Dipolni moment                     | 7,91 debye       | 6,44 debye                   |
| HOMO energija                      | -811,40          | -813,64                      |
| LUMO energija                      | 277,36           | 346,12                       |
| ZPE                                | 1024,93          | 1042,53                      |



**Slika 1.** Optimalna struktura, te HOMO i LUMO energija melatonina i taurina izračunati na PM3 teorijskom nivou

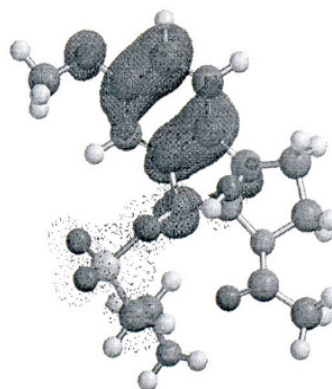
**Figure 1.** Optimal structure, HOMO and LUMO energies of melatonin and tryptophan calculated with PM3 theoretical level



**Slika 2.** Optimalna struktura, te HOMO i LUMO energija melatonina i taurina izračunati na HF teorijskom nivou

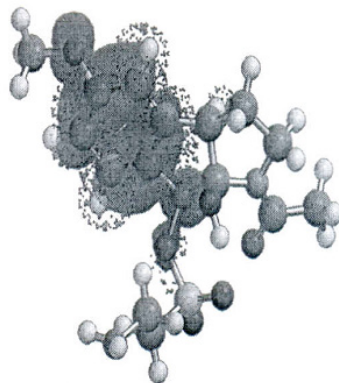
**Figure 2.** Optimal structure, HOMO and LUMO energies of melatonin and tryptophan calculated with HF theoretical level

Formalno povezivanje s HOMO orbitale u strukturi vezanog melatonina sa taurinom najverovatnije će se dogoditi oko indolnog prstena, u kojem učestvuju azot i susjedni ugljici melatonina. Najveći doprinos hemne LUMO orbitalne energije dolazi iz orbitala sa ugljika, iako postoji doprinos molekulske orbitali od atoma kisika i sumpora taurina (slika 1). Računanjem na višem nivou teorije najviše popunjene i najmanje nepopunjene orbitale se preklapaju, omogućavajući maksimalni prenos elektrona (slika 2). Vezivanjem metabolita melatonina dobijaju se, također, bolja preklapanja HOMO i LUMO energije računanjem na višem nivou teorije, opet omogućavajući prenos elektrona i energije, te ukazujući na moguća mesta interakcije (slika 3 i 4).



**Slika 3.** Optimalna struktura, te HOMO i LUMO energija hidrosimelatonina i taurina izračunati na PM3 teorijskom nivou

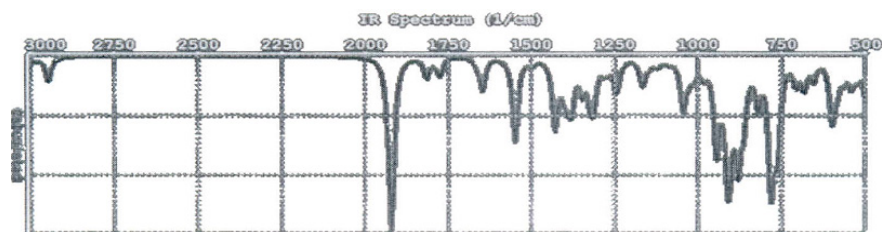
**Figure 3.** Optimal structure, HOMO and LUMO energies of melatonin and tryptophan calculated with PM3 theoretical level



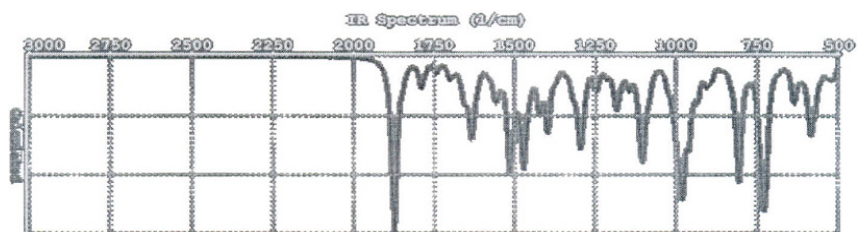
**Slika 4.** Optimalna struktura, te HOMO i LUMO energija hidrosimelatonina i taurina izračunati na HF teorijskom nivou  
**Figure 4.** Optimal structure, HOMO and LUMO energies of melatonin and taurine calculated with HF theoretical level

Slike 5, 6, 7 i 8 prikazuju izračunate vibracijske frekvencije melatonina i njegovog metabolita sa taurinom na nižem (PM3) i višem (HF/6-31G) teorijskom nivou. Iz simuliranih IR spektara se vidi da se u srednjoj infracrvenoj oblasti spektri jedinjenja znatno razlikuju. Razlike u frekvencijama istih tipova vibracija se mogu pripisati različitim međumolekulskim interakcijama usled razlika u strukturama. Istezanje S=O veze na taurinu računanjem semi-empirijskom metodom javlja se u području spektra  $906\text{cm}^{-1}$ , a ab initio metodom se ipak javlja pomak trake

ulevo i označen je na području  $1296$  i  $1271\text{cm}^{-1}$ . C=O istežanje veze se u svim strukturama na oba nivoa teorijskog računanja javlja na području od  $1873$  i  $1922\text{cm}^{-1}$ . Istežuće vibracije C-C veze u prstenu se kod struktura računatih višem teorijskom nivou pomeraju sa  $1815\text{cm}^{-1}$  na  $1100$  i  $1324\text{cm}^{-1}$ . Područje valnih dužina od  $600$  do  $1400\text{cm}^{-1}$  predstavljeno je trakama srednje jakog intenziteta, a označuju ga C-H deformacione vibracije. N-H deformacione vibracije su frekvencije  $722\text{cm}^{-1}$  računane na višem i  $1043\text{cm}^{-1}$  na nižem teorijskom nivou.

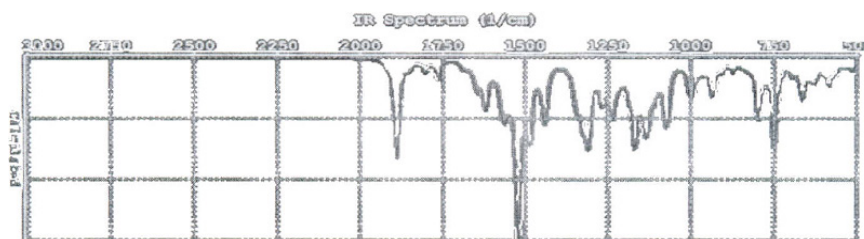


**Slika 5.** IR spektar melatonina i taurina na PM3 teorijskom nivou  
**Figure 5.** IR spectrum of melatonin and taurine at PM3 theoretical level

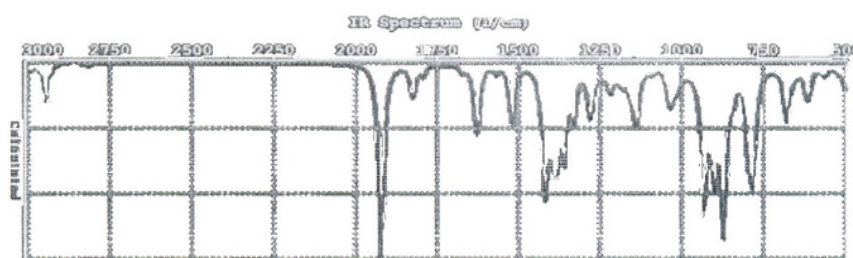


**Slika 6.** IR spektar melatonina i taurina na HF/6-31G teorijskom nivou  
**Figure 6.** IR spectrum of melatonin and taurine at HF/6-31G theoretical level





**Slika 7.** IR spektar hidroksimelatonina i taurina na HF/6-31G teorijskom nivou  
**Figure 7.** IR spectrum of hydroxymelatonin and taurine at HF/6-31G theoretical level



**Slika 8.** IR spektar hidroksimelatonina i taurina na PM3 teorijskom nivou  
**Figure 8.** IR spectrum of hydroxymelatonin and taurine at PM3 theoretical level

## Zaključak

Provedena su teorijska ispitivanja najstabilnijih struktura i termodinamičkih svojstava strukture taurina povezane sa melatoninom i njegovim metabolitom (hidroksimelatoninom) u cilju objašnjenja mogućnosti oksidacije melatonina taurinom. Stabilnost ovih struktura je važna, s obzirom da obe postoje u biološkim sistemima i pokazuju određenu reaktivnost prema slobodnim radikalima. Izračunati atomski naboji, koji se ne mogu eksperimentalno odrediti, pokazuju područja visoke elektronske gustoće, područja mogućih interakcija. Najstabilnija simulirana struktura je molekula vezivanja hidroksimelatonina sa taurinom, što je i konačni produkt oksidacije melatonina taurinom, kako je i prikazano u ranijim istraživanjima Valdecira i sur 2010. godine, gde je uz formiranje ovog konačnog produkta prikazan još jedan produkt oksidacije, AFMK (N(1)-acetil-N(2)-formyl-5-metoxykynuramin). Ovaj produkt je formiran oksidativnim rascepom indolnog prstena. Konačno, prikazano je da je melatonin sposoban za neutralizaciju taurina.

Također je prikazano da taurin sa halogenim elementima proizvode aktivirani eosinofilni leukociti, koji povećavaju odgovore na alergijske i parazitske infekcije [12].

Iz svih navedenih razloga, potrebno je provesti preciznija kompjuterska istraživanja i za mehanističke puteve oksidacije melatonina taurinom.

## Literatura

[1] Russel J. Reiter, Dun-xian Tan, M. Pilar Terron, Luis J. Flores and Zbigniew Czarnocki. Melatonin and its

metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica*. vol 54 (2007) 1-9.

- [2] Huxtable, R.J. The physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72 (1992) 101-163.
- [3] Sturman, J.A. Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73 (1993) 119-148.
- [4] Das J, Ghosh J, Manna P. Taurine protects rat testes against NaAsO<sub>2</sub>-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways. *Toxicol Lett.* 187 (2009) 201-210.
- [5] Wojcik OP, Koenig KL, Zeleniuch-Jacquotte A et al. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 208 (2010)19-25.
- [6] Parcell, S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.* 7 (2002) 22-44.
- [7] Shimizu M, Zhao Z, Ishimoto Y. Dietary taurine attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice. *Adv Exp Med Biol.* 643 (2009) 265-271.
- [8] Tan DX, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1 (1993) 57-60.
- [9] Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res.* 47 (2009) 109-126.
- [10] Zeman, M., Dulkova, K., Bada, V., Herichova, I. Plasma melatonin concentrations in hypertensive patients with the dipping and non-dipping blood pressure profile. *Life Science,* 76 (2005) 1795-803.
- [11] Valdecir F. Ximenes, Camila Z. Padovan, Danielle A. Carvalho and Joao Roberto Fernandes Oxidation of melatonin by taurine chloramines. *J. Pineal Res.* 49 (2010) 115-122.
- [12] Marcinkiewicz J. Taurine bromamine: a new therapeutic

option in inflammatory skin diseases. Pol Arch Med Wewn. 119 (2009) 673–676.

---

## Summary

# THEORETICAL RESEARCH OF OXIDATION OF MELATONIN BY TAURINE

Elvisa Hodžić, Halid Makić, Sebila Rekanović, Mejra Bektašević

(ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER)  
UDK 66.094.3+615.35:547.47

University of Bihać, Biotechnical Faculty, Bihać, Bosnia and Herzegovina

Melatonin, a secretory product of the pineal gland, is produced in multiple cells and organs. However, the blood levels of melatonin are derived almost exclusively from the mammalian pineal gland. The effect of melatonin is very widespread. It is known for its antioxidant, immunomodulatory and anti-inflammatory effects. Taurine is the most abundant free amino acid in leukocytes. In activated neutrophils, taurine is converted to taurine chloramine (Tau-NHCl) through the reaction with HOCl, the endogenous oxidant that counteracts with melatonin. The aim of this study was to investigate the reactivity of taurine with melatonin through molecular modeling. We compared the geometry, thermodynamic properties, and IR spectra of the compounds. Computation was performed on different theoretical levels: semi-empirical (PM3) and Hartree-Fock (HF, 3-21G). It was found that melatonin reacts with taurine, forming metabolites of melatonin: 2-hidroksimelatonin and N1-acetyl-N2-formyl-5-metoksikinuramin (AFMK). Calculated atomic charges showed nitrogen atoms as the most possible sites for interactions with other compounds. The obtained values calculated at semi-empirical and *ab initio* levels are different and they are not reliable when explaining experimental data.

**Keywords:** melatonin, spartan, taurine, *ab initio*, semi-empirical methods