

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Kadınlarda (özellikle vertebranın trabeküler kemiğinde) kemik kaybı menopoz öncesi ve menopozdan 3-5 yıl sonra artmaktadır (1). Kemik yıkımı, yapımı geçtiğinde demineralizasyon olmakta bu da osteoporozu neden olmaktadır. Postmenopozal osteoporozun patojenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Postmenopozal osteoporozda; östrojen eksikliğinin önemli rolü olduğuna inanılmaktadır. Östrojen , PTH 'nın kemiğe destrüktif etkilerine karşı koruyucu ve kemik yıkım ürünlerini inhibe edici etkiye sahiptir. Gerçekten de hiperparatiroidili postmenopozal kadınlarda osteoporoz insidansı artmıştır ve bu kadınlarda östrojen replasmanı serum ca düzeylerini normale getirmektedir. Menopozda östrojen kaybı belki de PTH 'nın etkilerinin karşılanmamış olmasına bağlıdır. Postmenopozal osteoporozda östrojen eksikliğinin rolü olduğuna dair diğer bir delil, anoreksia nervosa hastalardaki östrojen eksikliğine bağlı osteoporoz görülme sıklığının artmış olmasıdır (1). Bununla birlikte östrojen dışında başka faktörlerin de osteoporozun artmasında etkili olduğu düşünülmüştür.

Pineal bez, beyinde bulunan nöroendokrin bir organdır. Dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere birçok sistemin fonksiyonundaki değişiklikleri düzenlemektedir. Pineal bezden salgılanan ana hormon melatonindir. Melatonin, pineal bezden salgılanan uyku, yaşlanma, tümör büyümesi ve üreme gibi fonksiyonlar üzerinde rolü olduğu düşünülen,

antioksidatif etkileri olan bir hormondur (2). Menopozal period, nöroendokrin değişikliklerle birlikte pineal bezin sekretuar aktivitesindeki azalmayla birlikte görülür (3). Menopoz; pineal bezdeki değişiklikler ile birlikte pineal bezin gonadotropin salınımı üzerindeki düzenleyici etkisine bağımlıdır (4). Pineal bezdeki kalsifikasyon insidansı ki bu da pineal bezin sekretuar aktivitesini yansıtmakta, menopozda artmıştır (5). İlginçtir ki kadınlarda 30'lu yaşlardan sonra pineal kalsifikasyon insidansı sabit kalmakla birlikte menopozda kalsifikasyon artmaktadır (3).

Memeli kemiği, eski kemiğin osteoklastlar tarafından resorpsiyonu ve yeni kemiğin osteoblastlar tarafından oluşumunu içeren devamlı, remodeling işlemine sahiptir. Birbiriyle ilişkili bu iki proses kemiğin anatomik ve yapısal bütünlüğünün devamı için gereklidir. Normal şartlar altında, kemiğin remodeling prosesi osteoklastların kemiğe yapışması ve proteolitik enzimler yardımı ile eski kemiğin uzaklaştırılması ile başlar. Kısa bir süre sonra osteoklastların bıraktığı resorbe alana osteoblastlar invaze olur, matrix kollajeni ve proteinlerin sekresyonu ve sonrasında mineralize olması ile sona erer. Kemik oluşumu tamamlandıktan sonra, kemiğin yüzeyi farklılaşmış osteoblast hücreleri ile çevrelenir (6).

Osteoklastlar kemik yıkımını sağlamak için birçok kimyasal ajan kullanırlar. Bu işlemin en önemli komponenti serbest radikallerdir. Osteoklastlar yıkım sırasında yüksek konsantrasyonlarda süperoksit radikalleri oluşturarak yıkıma katkıda bulunurlar. Bunların ortadan kaldırılması için bir yöntem süperoksit koruyucu ya da yakalayıcı enzim SOD (süperoksit dismutaz)'dır (7).

Melatonin hem fizyolojik hem de farmakolojik dozlarda serbest radikal yakalayıcı ajan ve antioksidandır (8-9). Bunun yanısıra, birçok serbest radikali ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin nötralize edilmesini sağlar. Melatonin birçok antioksidatif enzimi stimüle eder. Melatonin, hücre yapısındaki tüm makromolekülleri yüksek lipid çözünürlüğü ile oksidatif hasara karşı korur (8-9). Bu yüzden melatoninin osteoklastik aktiviteyi engellemesi, onun serbest radikalleri toplayıcı etkisine dayandırılabilir.

Kemik iliği hücrelerinde; yüksek konsantrasyonlarda melatonin ve serotonin, N-Asetil Transferaz ve Hidroksi-O-Metil Transferaz aktivitesinin (ki melatoninbiosentezinde rol alan son enzim) bulunduğu gösterilmiştir (10). Daha da fazlası kemik iliği hücreleri uzun süreli kültüre edildiğinde yüksek düzeyde melatonin konsantrasyonuna rastlanılmaktadır (10). Gerçekten de kemik iliği hücrelerinde, intrasellüler olarak pozitif melatonin reaksiyonuna rastlanılmıştır (11). Bu bulgular melatoninin kemik metabolizması üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Melatonin düzeyleri yaşla birlikte; azalma göstermektedir. Bundan dolayı yaşla ilişkili hastalıklarda melatonin eksikliğinin rolü olduğuna dair şüpheler uzun zamandır mevcuttur.

Bu çalışma, pineal bez fonksiyonlarının ve bezden melatonin salınımının postmenopozal osteoporoz gelişimi için ilave bir faktör olabileceğini göstermeyi amaçlamaktadır. Bu hipotez melatoninin; anti-aging hormonu olmasına, salınımının yaşla azalmasına ve kalsiyum hemostazının iyi bir regülatörü olmasına dayandırılmıştır (1).

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 OSTEOPOROZ

##### 2.1.1. Tanım

Osteoporoz (OP) en sık görülen kemik hastalığıdır. Günümüzde beklenen yaşam süresinin uzaması nedeni ile önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Kemik kaybına sekonder gelişen vertebra, el bileği ve kalça kırıklarıyla birlikte en sık karşılaşılan metabolik kemik hastalığıdır (12).

Osteoporozun ABD’de 20 milyon kişiyi etkilediği düşünülmektedir ki bunların %90’ını postmenopozal dönemdeki kadınlar oluşturmaktadır. Bundan dolayı osteoporoz yıllık 45 yaş üstü bir milyon kadında görülen kırıkların %70’ini oluşturan temel halk sağlığı problemidir (1). Avrupa’da ve Amerika’da 2.3 milyon osteoporotik kırığın yıllık tıbbi tedavi maliyeti 27 milyar dolara ulaşmıştır.

OP tanımı çok değişik şekillerde yapılmaktadır:

İlk olarak 1829’da Jean Georgeas Lobstein tarafından “porous bone “ (Gözeli kemik) olarak tanımlanmıştır (13-16).

1948’de Albright tarafından “too little bone in bone “ (Kemik içinde çok az kemik ) tanımlaması yapılmıştır (13-16).

Bugün için kabul gören tanımı 1993’de Konsensus Geliştirme Konferansı tarafından; düşük kemik kütlesi ve kemiğin mikromimarisinde değişikliklerle özellenen ve bunun sonucunda kemik kırılabilirliğinin ve kırık riskinin arttığı sistemik bir iskelet hastalığı olarak kabul edilmiştir.

1996 yılında Amsterdam'daki Dünya OP Kongresi sonunda yapılan konsensusa göre OP tanımı WHO tarafından yeniden düzenlenmiştir. Buradaki tanımlama tanı yöntemlerinden Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre (DEXA) kullanılarak elde edilen değerlere göre yapılmaktadır (16). Bu tanıma göre;

**Normal:** Genç erişkine göre kemik mineral yoğunluğunun (BMD) veya kemik mineral içeriğinin (BMC) 1 standard sapmanın (SD) altında olmasıdır.

**Osteopeni (Düşük kemik kütlesi):** BMD'nin genç erişkine göre -1 SD ile -2.5 SD arasında olması.

**Osteoporoz :** BMD'nin genç erişkine göre -2.5 SD 'dan fazla olmasıdır

### 2.1.2 Osteoporozun Sınıflandırılması

Osteoporozun değişik açılardan sınıflandırılması yapılmıştır:

**-Yaşa göre:** Juvenil, Erişkin, Senil

**-Lokalizasyona göre:** Genel, Bölgesel

**-Tutulan kemik dokuya göre:** Trabeküler, Kortikal

**-Etyolojiye göre:** Primer, Sekonder

**-Histolojik döngüye göre:** Hızlı döngülü, Yavaş döngülü

En yaygın etiolojiye göre sınıflandırma sistemi kullanılır ;

**1)Primer OP:** Birincil OP 'da altta yatan hastalığa neden olabilecek bir hastalık ya da neden yoktur. 2 alt tipi olup Tip 1; 65 yaş altı postmenopozal kadınlarda görülürken Tip 2; 65 yaş üstü kadınlarda görülüp senil olarak sınıflandırılır.

**2)Sekonder OP:** İkincil OP'da altta yatan bir neden mevcuttur. Bunlar:

**-Endokrin nedenler:**Hipogonadizm, Over Agenezisi, Hipertiroidi, Hiperparatiroidi, Cushing Hastalığı, Diabet

**-Malign Nedenler:** Multiple Myelom, Lösemi, Lenfoma

**-İlaçlar:** Heparin, Etanol, Tiroid Hormonu, Kemoterapi

**-Kollajen sentez bozuklukları**

**-Beslenme:** Ca'dan fakir , proteinden zengin diyet

**-İmmobilizasyon**

Genel OP'u trabeküler ya da kortikal kemiğin etkilenmesine göre ikiye ayırmak mümkündür. Bu sınıflama zora ki fakat klinik önemi olan bir sınıflamadır.

Kortikal kemikteki kayıp uzun kemiklerden birinde kırık oluşmasına yol açabilir. Kırıklar genellikle ağrılı ve deplasedir, normal sürede iyileşebilir. Buna karşılık

trabeküler kemik kaybı deplase olmayan vertebra kırıklarına neden olur. Çoğu kez vertebral kolon deformitelerine yol açar bazen ağrısız olabilir.

Erişkin idiyopatik OP nadirdir. Genç erkek ve premenopozal kadınlarda ortaya çıkar. Birincil nedeni bulmak mümkün değildir. Kadınlarda doğumu takiben gelişebilir. Bu tablo bazı hastalarda idiyopatik juvenil Osteoporozun devamı olarak tanımlanabilmektedir.

OP hakkındaki epidemiyolojik bilgilerimiz günümüzde dahi yetersiz kalmaktadır. Çünkü hastalığın kesin tanı kriterleri yoktur. Ayrıca kemik dansitesi ölçümlerinde tam bir standardizasyon gösterilememiştir.

### 2.1.3 Risk Faktörleri

Osteoporoz önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmasına karşın genellikle klinik olarak kırık oluştuğundan sonra tanınabilen bir hastalıktır. Bu nedenle risk faktörlerinin bilinmesi hastalığın tanınması, önlenmesi ve tedavi rejimlerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Risk faktörleri değiştirilebilir nedenler ve değiştirilemez nedenler olmak üzere ikiye ayrılır (Tablo 3) (17). Böylece değiştirilebilen risk faktörleri modifiye edilerek kırıklar önlenir.

Değiştirilebilir risk faktörleri	Değiştirilemez risk faktörleri
<ul style="list-style-type: none"><li>• Yetersiz Egzersiz</li><li>• Yetersiz Beslenme<ul style="list-style-type: none"><li>- Kalsiyum</li><li>- D vitamini</li><li>- Dengeli beslenme</li></ul></li><li>□ İlaçlar</li><li>• Sigara ve alkol kullanımı</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yaş</li><li>• Cinsiyet</li><li>□ Erken menopoz</li><li>□ Genetik yatkınlık</li><li>• Irk</li></ul>

**Tablo 3 :** Osteoporozda risk faktörleri

**Yaş** : Yaşla birlikte intestinal kalsiyum emiliminde azalma, PTH'da yükselme, kalsitoninde azalma ve kemiğin hücresel düzeyde yaşlanması ile birlikte kemik kaybı ortaya çıkar ve kemik kütlesi giderek azalır (18).

**Genetik** : Genetik olarak en güçlü risk faktörü anneye ait kalça kırığı öyküsüdür. (85)19. Bununla birlikte siyah ırkın kemik mineral yoğunluğu en fazla olup bunu sırası ile sarı ve beyaz ırk izler (20).

**Cinsiyet** : Kadınlarda menapozdan sonra östrojenin azalması, erkeklerde ise 65 yaşından sonra hem östrojen hem de androjenin azalmasına bağlı olarak kalsiyum emiliminin azalması osteoporozun ortaya çıkmasına yol açar. Ayrıca erken menapoz, 6 aydan daha uzun süreli amenore, kısa doğurganlık süresi, uzun emzirme süresi ve doğum kontrol hapı kullanımı risk faktörleri arasında sayılabilir (21).

**Fiziksel aktivite** : Doruk kemik kütlesinin oluşmasına, kazanılmış KMY'nin sürdürülmesine ve kendisine yük bindirilen iskelet bölgelerinde kırık riskinin azalmasına katkıda bulunur. Bu alandaki çalışmalar fiziksel aktivitenin özellikle ergenlik öncesi daha etkili olduğunu, erkek çocuklarda etkisinin daha fazla olduğunu, aktivitenin kortikal ve apendiküler kemik üzerindeki etkisinin %10 olduğunu göstermiştir (22).

**Sigara ve alkol** : Hepatik östrojen metabolizmasında değişiklik yapması ve osteoblastlar üzerine olumsuz etkisiyle osteoporozun en önemli risk faktörleri arasındadır

Bireyin kırık riski bütün bu faktörlerin net sonucudur. Bu faktörlerin önemi iskeletteki bölgeye, bireyin içinde bulunduğu yaşamsal dönemlere ve bireyden bireye değişkenlik gösterir.

Osteoporoz için belirlenmiş risk faktörleri kemik kütlesindeki değişikliklerin % 20-40'ını yansıtır. Bu durum risk faktörlerinin belirlenmesinin risk altındaki bireyleri belirlemede, kemik kütlesi ölçülmesi yerine geçmeyeceğinin düşünülmesine yol açmıştır.

Bu risk faktörleri arasında geç menarş, erken menopoz, 6 aydan daha uzun süreli amenore, kısa doğurganlık süresi, ooferektomi sonrası gelişen iatrojenik menopoz, doğum sayısı, doğum kontrol hapı kullanımı, emzirme varlığı ve süresi sayılabilir.

Menopoz ile ortaya çıkan gonadal yetersizliğe bağlı gelişen östrojen eksikliği kadınlardaki hızlı kemik kaybindan sorumlu tutulmaktadır. Menopoz ve östrojen düzeyleri düştüğünde kemik yıkımının hızlandığı gösterilmiştir. Doğal menopozdan

önceki ooferektominin kemik kaybını ve kalça kırığı riskini artırdığı bilinmektedir. Ayrıca doğal erken menopoza veya geç menarş ile birlikte gelişen doğurganlık süresinin kısa olması perimenopozal kadınlardaki düşük kemik kütlesinden sorumludur.

#### **2.1.4 Osteoporoz Patojenezi**

OP patojenezinde çeşitli faktörlerin etkileştiği karmaşık olaylar rol oynar. Kemik gücünü belirleyen en önemli ve üzerinde en çok çalışılmış faktör kemik kütlesi-kemik yoğunluğudur. Kemik gücü, belirli bir kemik yoğunluğu değerinde, yoğunluğun karesi oranında artar. Erişkin bir bireyin kemik kütlesini belirleyen iki faktör adolesan dönemde bireyin ulaştığı doruk kemik kütlesi ve daha sonraki yaşlarda kaybedilen kemik miktarıdır. Yeniden yapılanma siklusundaki fizyolojik ve patofizyolojik olaylar sonunda kemik kütlesi değişime uğrar. İdeal koşullarda yeniden yapılanma siklusu sonunda yıkılan kemik ile yeniden yapılan kemik miktarı eşittir. Klasik olarak osteoporoz patojenik açıdan yeniden yapılanma siklusunda yıkımın yapımı geçtiği yani eşleşme fenomeninin bozulduğu ve net kemik kaybının geliştiği koşul olarak tanımlanır.

Genelde kemik kırılabilirliğine yol açan tek faktör kemik kütlesi gibi yorumlansa da bu doğru değildir. Yapılan hesaplamalar kemik kütlesinin kırık riskinden en fazla %50 oranında sorumlu olduğunu göstermiştir. Kemik kalitesinde yetersizliğe yol açan en önemli neden ileri yaştır. Değişik yaş gruplarında ön kol kemik mineral yoğunluğunun farklı düzeyleri için kırık riskinin değerlendirildiği bir çalışmada şu üç önemli sonuca ulaşılmıştır:

- 1-Kemik kütlesi azaldıkça kırık riski artmaktadır,**
- 2-Yaş ilerledikçe aynı kemik mineral yoğunluğunda dahi kırık riski daha yüksektir,**
- 3-Yaş ilerledikçe kırık risk artışı daha fazladır. Yani kemik mineral yoğunluğunda belirli bir azalma kırık riskini genç yaş grubuna oranla yaşlı grupta daha fazla artırır.**

Yeniden yapılanma siklusundaki bazı evreler kemik kütlesinde önemli değişime yol açacak şekilde çeşitli lokal ve sistemik etkiye karşı çok duyarlıdır. Bunların içinde en önemlisi aktivasyon evresi ve osteoklastların aktivasyon bölgesine göçüdür. Östrojen eksikliği, endojen PTH (parathormon) artışı, sitokin uyarısı, büyüme hormon pikleri, glukokortikoid fazlalığı ve serum kalsiyum düzeyindeki değişiklikler sonucunda yeniden yapılanma siklusu aktive olur. Östrojen eksikliği osteoblast ve osteoklast yapımını artırarak yeniden yapılanma hızını artırır. Önceleri yapım yıkıma yetişse de her bir yeniden yapılanma



siklusundaki yıkım ve yapım sürelerinin farklılığı nedeniyle (sırasıyla 10-13 gün ve 3 ay) yıkılan kemik yapılan miktarı aşar ve net kemik kaybı gelişir.

Postmenopozal osteoporozun patojenezi tam olarak anlaşılmış değildir. Fakat son 10 yıl içinde önemli gözlemler ve hipotezler ortaya atılmıştır. Postmenopozal osteoporozda östrojen eksikliğinin önemli rol oynadığına inanılmaktadır. Bununla birlikte, osteoporotik ve yaşla eşleştirilmiş kadınlarda östrojen düzeyleri arasında farka rastlanılmamıştır (1). Buna ilaveten anoreksia nervosa ve amenoreli kadınlarda düşük östrojen düzeyleri bulunmasına rağmen kemik mineral dansitesinde azalmaya rastlanılmamıştır (23). Yemek yeme bozuklukları bulunanlarla birlikte kemik mineral dansitesi ile plazma östradiol düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (24). Sonuç olarak östrojen eksikliği tüm menopoza giren kadınlarda görüldüğünden başka faktörler osteoporozun artmasında etkili olduğu düşünülmüştür. Bu faktörler, diyetle Ca alımının az olması, Vit D yetersizliği, kalsitonin eksikliği, hareketsizlik gibi faktörleri içerebilir. Irk da önemli olabilir. Çünkü zenci ırkta osteoporozda daha sık rastlanılmaktadır (12).

OP patojenezinde etkili olduğu düşünülen diğer bir faktör sekonder hiperparatiroidi ve Ca eksikliğidir. Kemik kaybı menopozdan hemen sonraki dönemde hızlansa da son yıllardaki çalışmalar kemik yıkımının biyokimyasal parametrelerinin ileri yaşlarda da belirgin olarak yükseldiğini göstermiştir. Diyetle ileri yaşlarda yetersiz Ca tüketimi ile sekonder hiperparatiroidi gelişmektedir. İleri yaşlardaki bireylerin günlük Ca tüketimi en fazla 800-900 mg'dır. Paratiroid hormon osteoblastları uyararak yeniden yapılanmayı hızlandırır, açığa çıkan çeşitli sitokinler kemik yıkımını iyice artırır.

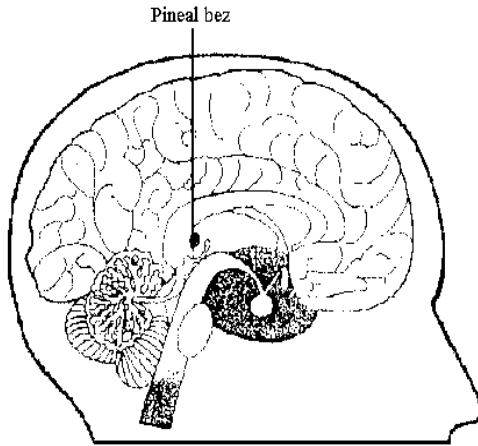
1932'de Harvey Cushing'in belirgin osteopeni ve kemik kırıklarında klinik tabloya hakim olduğu endojen cushing sendromunu tanımlamasından beri yüksek düzeydeki glukokortikoidin kemik kütesine önemli ölçüde olumsuz etkilediği bilinmektedir. Osteoklast ve osteoblast üzerine doğrudan etki yanında glukokortikoidler sekonder hipogonadizm ve hiperparatiroidi oluşturur.

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan da anlaşılacağı gibi osteoporoz etyolojisinde birçok faktör suçlanmıştır.

## **2.2. PİNEAL BEZ**

Epifiz bezi olarak da bilinen pineal bez, beyinde bulunan nöroendokrin bir organdır. İnsanda, beyin içerisinde iyi bir şekilde gizlenmiş olmasına rağmen; Hint

felsefesinde, diğer ikisine göre daha gerçekçi ve derinlemesine görebilen bir “üçüncü göz” olarak kabul edilir (25). Dış çevrenin aydınlık ve karanlık olmasına göre organizmanın başta endokrin sistem olmak üzere birçok sistemin fonksiyonundaki değişiklikleri düzenler. Suprakiazmatik nükleus (SCN) ile birlikte aktivitelerimizi doğa ile senkronize bir şekilde yapmamızı sağlayan biyolojik saat olduğu düşünülmektedir (26-27). Üçyüz yıl önce, Fransız filozof Rene Descartes, pineal bezi “ruhun sandalyesi” olarak tanımladı. Buradan salgılanan ana maddenin melatonin olduğu ise, ancak 1950’li yılların sonlarına doğru gösterildi (28). Pineal bez sirkadiyan bir ritimde salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir. Böylece günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (14, 15)26-27. Melatoninin, sirkadian ritimler, uyku, ruhsal durum, üreme, tümör gelişimi ve yaşlanma gibi birçok olayın biyolojik regülasyonunda rolü olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (29). Ancak, melatoninin insan fizyolojisi ve patofizyolojisindeki önemine yönelik bilgiler henüz çok yetersizdir.



**Şekil 1:** Pineal bezin insandaki lokalizasyonunun şematik olarak gösterilmesi

### **2.2.1. Anatomisi ve Histolojisi:**

Pineal bez (epiphysis cerebri, corpus pineale), insanlarda, 120-150 mg ağırlığındadır. İnsan pineal bezinin anatomik ilişkileri diğer memelilerinkine benzer. Pineal bez posterior komissur ve üst dorsal habenular komissur arasında 3. ventrikülün posterior tavanına bitişik bir haldedir. Diensefalon’dan 3.ventriküle doğru uzanır. Arterial beslenmesi arteria cerebri posteriordan kaynaklanan arteria

choridea posteriorun ince dalları tarafından sağlanır ve pineal bezin venöz kanı v. Cerebri magna yada v. cerebri internaya dökülür.

Önemli derecede damarlaşıma göstermekte olup, kan akımı yönünden, 4 ml/dak/g'lık değerle, endokrin organlar içinde, böbreklerden sonra ikinci sırada gelmektedir. Pineal bezde, pinealositler ve nöroglia hücreleri bulunmaktadır. Dominant olan ve melatonin sentezinin yapıldığı yer pinealositlerdir. Ayrıca, melanin, hemosiderin ve lipofuksin gibi pigment maddeleri de vardır (18)30. Pineal bez insanda diğer hayvan türlerinde olduğu gibi yaşa bağlı olarak değişik derecelerde kalsifikasyon gösterir (31).

Sıçanlarda, gerek beyin hemisferlerine gerekse beyinciğe ait kısımlara göre daha derinde bulunan pineal bez bir çukura gömülmüş gibidir. 0,9-1,56 mg ağırlığındadır ve çok ince bir sap aracılığı ile 3.ventrikül tavanına bağlanmıştır Yuvarlağımsı-oval şekilli olan bez, beyazımsı ve homojendir.

## **2. 3. MELATONİN**

### **2. 3. 1 Sentez, Salıverilme ve Metabolizma:**

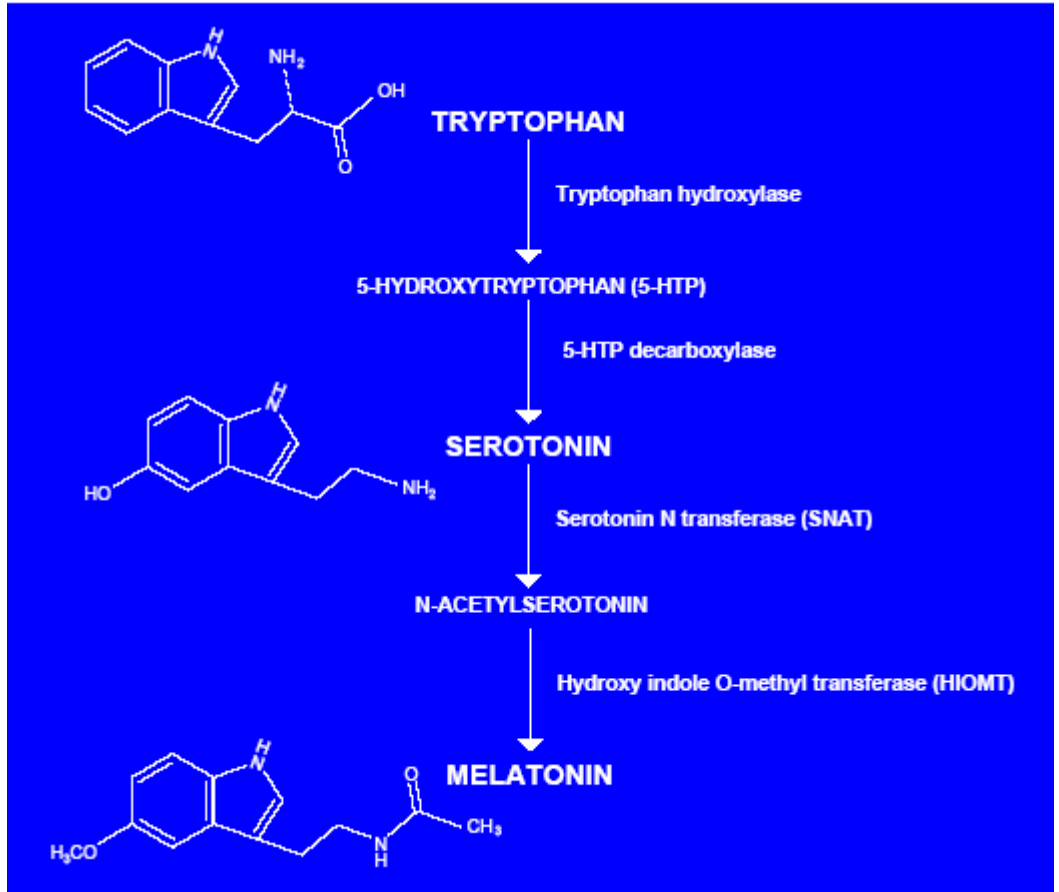
Pineal bez, elektriksel sinyalleri hormonal sinyale çeviren nöroendokrin bir transdüser olarak görev yapar. Melatonin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör, çevrenin aydınlık veya karanlık olmasıdır. Genel olarak, ışık melatonin yapımını azaltır, karanlık ise artırır. Melatonin ritmi gecenin endokrin markırı olarak ifade edilir (32).

Pineal bezin endokrin aktivitesi, çoğu endokrin organdan farklı olarak, önemli derecede sinirsel innervasyona bağlıdır.

Retinohipotalamik pineal sistem, retinanın fotoreseptörlerinden başlar ve retinal sinir ile retinohipotalamik yoldan suprakiazmatik nükleusa, oradan da servikal ganglion ve postganglionik sempatik lifler ile pineal beze ulaşır (18)30. Buradaki sempatik sinir uçlarından salgılanan norepinefrin, melatonin sentezini artırır. Propranolol ise, melatonin sentezini azaltır. Bu nöronal sistem, ışığa maruz kaldığında inhibe, karanlıkta ise aktive olur. Melatonin sentezinin günlük ritmi ise, suprakiazmatik nükleustaki "pacemaker"lar ile sağlanmaktadır (29).

Melatonin sentezinde başlangıç maddesi, pineal bez tarafından plazmadan alınan ve bir indol aminoasit olan "triptofan"dır. Triptofan, esansiyel bir aminoasit olup, besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir. Dışarıdan triptofan verilmesi,

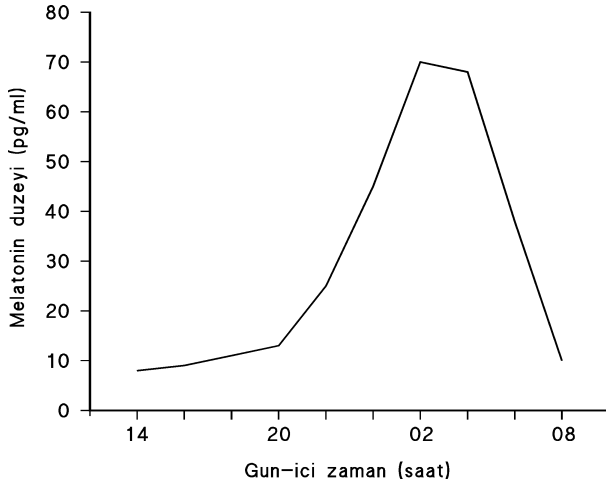
dolaşımdaki melatonin düzeyini artırır. Triptofan, pinealositlerde, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofan'a hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan, aromatik-L-aminoasid dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamin (serotonin)'e dekarboksillenir. Serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil serotonin'e ve bu da, hidroksiindol-o-metil transferaz etkisi ile melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)'e dönüşür (29). Melatonin sentezi için gerekli enzimlerin, pinealositler dışında, suprakiazmatik nükleus, retina ve ince barsakta da bulunduğu, immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Dolaşımdaki melatonin konsantrasyonu pineal bezdeki melatonin üretimini yansıtır. Retina ve harderyan bezinde olan sentez plazma melatonin konsantrasyonlarını etkilemez. Lokal etki yapar ve çok çabuk katabolize edilir (32).



**Resim 1.** Melatonin biosentezi

Melatonin, pineal bezde, depolanmadan hızlı bir şekilde komşu kapiller damarlara geçer. Lipofilikliğinin çok yüksek olmasından dolayı, tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır. Plazmada yaklaşık %70'i albumine bağlı olarak taşınır. Çoğu karaciğer de olmak üzere, böbrekte de metabolize edilir. Karaciğerde 6-hidroksimelatonin'e dönüşür; bu da, böbrekte sülfat ve glüküronik aside bağlanarak idrarla atılır. Başlıca metaboliti, 6- sülfatoksimeleatonin'dir (29). N asetil serotonin melatonin prekürsörü aynı zamanda da metabolitidir (33).

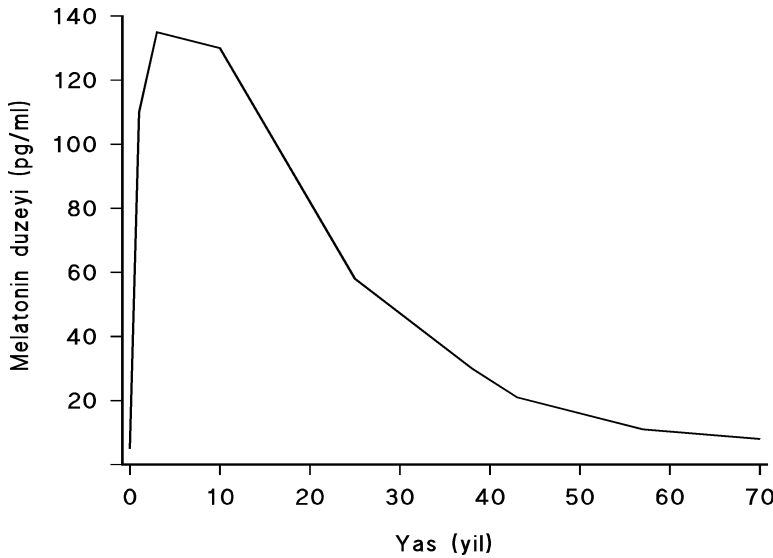
Karanlık başladığında melatonin seviyesi yükselmeye başlar. Geceyarısından sonra (2-4) pik seviyesine ulaşır ve sonra giderek düşer (Şekil 2).



**Şekil 2:** Serum melatonin düzeyinin gün-içi değişimi

Serotonin melatonin dönüşümünü sağlayan NAT ve HOMT aktivitelerinin geceleri daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Gündüz karanlıkta bulunması melatonin salgılanmasında bir artışa neden olmamıştır. Bu pineal bezin günün belli döneminde karanlığın melatonin sentezini etkilemediği bir refraktör periyoda sahip plabileceğini düşündürmektedir (27).

Serum melatonin konsantrasyonu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir (Şekil 3).



**Şekil 3:** Serum melatonin düzeyinin yaşlara göre değişimi

Üç aydan daha küçüklerde çok azdır. 1-3 yaş arası pik seviyesine ulaşır. Bu esnada, geceleri melatoninin serum pik seviyeleri, 325 pg/ml (1400 pmol/l) gibi

yüksek değerlere kadar ulaşır. Cinsel olgunlaşma sürecinde giderek azalan plazma melatonin düzeyi, 500 pmol/l'nin altına düştüğünde, GnRH salgılanması artar ve puberte başlar. Yetişkin gençlerdeki değeri 40-260 pmol/l'dir (34,26,27).

### **2. 3. 2. Dozları, Formülasyonları ve Farmakokinetiği:**

Melatonin, insanlarda yapılan çalışmalarda, 0.1 mg'dan 2000 mg'a kadar değişen çok geniş bir doz aralığında uygulanmıştır. Hayvan çalışmaları ile uyumlu olan bu geniş doz aralığı düşük toksisitenin göstergesidir. 0.5 mg'ın üzerindeki dozlar, farmakolojik doz olarak kabul edilir ve endojen pik seviyelerinin üzerinde bir serum konsantrasyonuna neden olur (35).

Jelatin kapsül veya tablet şeklindeki oral melatonin preparatları, 30 dak. içinde absorbe edildikten sonra, karaciğerde hızla metabolize edilerek, suda çözünebilen hidroksi türevine dönüşür. Plazmadaki yarılanma ömrü yaklaşık 10-45 dakikadır (27,29,36,37). Bireysel farklılıklar çoktur. ABD'de tipik olarak kullanılan 3 mg'lık melatonin tabletleri, fizyolojik plazma konsantrasyonunun 50 katından daha yüksek değerlere ulaşabilir. Bu dozun vücuttan tamamen uzaklaştırılması yaklaşık 10 saat kadar sürer (35). Oral uygulamada biyoyararlanım bireyler arasında çok fazla değişkenlik gösterir. Oral yoldan alınan 80 mg'lık jelatin kaplı bir melatonin kapsülü, gece pikinde 350-10000 kez daha yüksek bir serum konsantrasyonu sağlar (38). Gece boyunca oluşan plazma melatonin profilini taklit etmek amacıyla, yavaş-salıveren oral melatonin preparatları da geliştirilmiştir. Tablet ya da kapsül formu ile uykuya dalma problemi olanlarda; melatoninin ağız mukozasından emilerek, sistemik dolaşıma direkt olarak geçmesine olanak veren, pastil formu (2.5 ve 5 mg melatonin içeren preparatları mevcuttur) denenebilir. Ayrıca, melatoninin transdermal uygulanmasına yönelik çalışmalar da mevcuttur (35).

### **2. 3. 3. Etki Mekanizması:**

Melatonin'in farmakolojik olarak tanımlanmış iki membran reseptörü bulunmaktadır. ML1, yüksek afiniteli (pikomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yeri olup, a ve b alttipleri gösterilmiştir. ML2 ise, düşük afiniteli (nanomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri olarak tanımlanmıştır. ML1 reseptörlerinin aktivasyonu, G proteini üzerinden, adenilat siklaz'ı inhibe ederek, hedef hücrelerde sAMP düzeyini düşürür (38). Bir çok ikinci haberciyi (cAMP, DAG) regüle edebileceği bildirilmiştir.(32) Bu etkiler genelde inhibitördür ve bir önceki stimülatör ajan tarafından hücrenin aktivasyonunu gerektirir. Melatonin ve analoglarının reseptör aktiviteleri sırasıyla; 2-iodomelatonin > 6-chloromelatonin > melatonin > 6

hiydroxymelatonin > 6-mehhoxymelatonin > N-acetyltryptamine > 5-methoxymelatonin > 5-hydroxymelatonin (32). Bu reseptörler, muhtemelen, retinal fonksiyonların, sirkadiyen ritmlerin ve üremenin regülasyonunda rol oynamaktadır. ML2 reseptörlerinin aktivasyonu, dağılımı henüz tanımlanmamıştır. Melatonin hücre içine kolayca geçerek, buradaki yapısal proteinlerle de etkileşebilir; direkt olarak sitosolik kalmodüline bağlanarak, kalsiyum sinyalini bu yolla da etkileyebilir. Ayrıca, melatoninin nükleer retinoid Z reseptörlerinin (alfa ve beta) de bir ligandı olduğu gösterilmiştir. Bu bağlanma, düşük nanomolar konsantrasyonlarda olup, nükleusa hormon tarafından gönderilen sinyale aracılık edebilir (38).

#### **2.3. 4. Serbest Radikaller ve Melatonin:**

Hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda, melatoninin güçlü bir serbest radikal yakalayıcı ajan olduğu gösterilmiştir. Oldukça toksik olan hidroksil radikalleri başta olmak üzere, diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan makromolekülleri (özelikle de DNA'yı) koruyabilir. Bu etkisini, reseptörden bağımsız bir şekilde, direkt olarak oluşturur. Serbest radikal yakalayıcı etkisi bakımından, bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon ve vitamin E gibi) daha potenttir. Dahası, melatonin, antioksidanların büyük çoğunluğunun aksine; hem suda, hem de yağda çözünebildiğinden; hücrenin tüm komponentlerine etki eder. Ayrıca, indirekt olarak, spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile, antioksidan enzim seviyelerini artırarak da, doku koruyucu etki gösterir (39). Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitelerini artırırken; prooksidatif bir enzim olan nitrik oksit sentetaz (NOS)'ı inhibe eder (27)38. Ancak, melatoninin antioksidan etkisinin gözlenebilmesi için gereken konsantrasyonların, gece pik serum konsantrasyonlarına göre, oldukça yüksek olduğu iddia edilmektedir (29). Fizyolojik konsantrasyonlarda bu etkinin olabileceği ile ilgili çalışmalar henüz netlik kazanmamıştır.

Reaktif oksijen ürünlerinin (süperoksid, peroksinitrit, hidroksil radikal ve hidrojen peroksid), DNA strand breakage ile reaksiyona girip nükleer enzim poly (ADP-riboz) sentetazı (PARS) aktive ederek enerji tüketimine ve nekrotik tip hücre ölümüne yol açtığı belirtilmiştir (40). Melatoninin PARS aktivitesini inhibe ederek, şok, inflamasyon ve iskemi reperfüzyonda organ hasarını önleyebileceği bildirilmektedir (41).

Fonksiyonel olarak melatonin üreten hücreler organizmanın savunmasında radikal giderici olarak rol oynayabilir. Serbest radikaller bir çok doku ve organda bulunmaktadır. Büyük miktarda NO içeren barsak, beyin, retina ve akciğerlerde bol

miktarda melatonin taşıyan hücrelerin bulunması bu hipotezi desteklemektedir. Örneğin harderyan bezde çok miktarda melatonin bulunmaktadır. Yine bezde radikal üretimini ve oksidatif hasarı uyaran porfirin üretilmektedir.

Melatonin direkt radikal gidererek, indirek spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzimleri aktive ederek yada prooksidatif enzimleri inhibe ederek doku koruyucu özellik gösterir.

Direkt süperoksid giderici etkisi azdır. İntrasellüler konsantrasyonunu azaltır. Melatonin hidroksil radikaline  $e^-$  verdiğiinde oluşan indolil katyonu sekonder olarak süperoksid radikalini gidermektedir. En önemli etki süperoksidin dizmutasyonunda en büyük rol oynayan SOD'ın mRNA sını artırmasıdır.

Hidrojen peroksid hücrelerde katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) ile toksik olmayan ürünlere dönüştürülür. GPx aktivitesi melatonin ile uyarılmaktadır (Tablo 1). Melatonin hidrojen peroksid'in intrasellüler konsantrasyonunu azaltır. İndirgenmiş glutatyon oksitlenerek okside glutatyona oda diğer antioksidan enzim glutatyon redüktaz (GRd) ile tekrar indirgenmiş glutatyona, dönüşür. GRd aktivitesinde melatonin ile uyarılır. GRd aktivitesinde ko-faktör olan NADPH, G6PD ile oluşturulur. G6PD aktivitesi de melatonin ile uyarılır. Bu üç enzim direkt ve indirekt hidrojen peroksit'i toksik olmayan metabolitlere çevrilmesinde rol oynarlar.

Glutatyon ve mannitoldan çok daha etkilidir. İndol nükleusun yan zincirindeki metoksi ve asetil grupları  $OH^-$  radikalinin giderilmesinde rol oynar. Melatonin bir  $e^-$  vererek hidroksili nötralize eder ve non-toksik indolil katyon radikaline (melatonil) dönüşür. Bu nitrogen merkezli melatonil radikalinin de superoksid anyon radikali ile etkileşip 5-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine (5-MAFK) oluştururken bu radikali de süpürdüğüne inanılır (42).

Melatonin singlet oksijeni direk olarak nötralize etmektedir.

Melatoninin Vit E, C ve GsH mannitol dan çok daha güçlü lipid peroksidasyonunu engelleyici etki göstermesi peroksil radikalini gidermesi ile ilgilidir. İndirek olarak melatonin hidroksil radikalini azaltması da peroksil oluşumuna engel olabilmektedir.

NO tek başına değil  $O_2$  varlığında peroksinitrite dönüşerek toksik etkilere aracılık eder. Bu nedenle, NO sentezini gerçekleştiren NOS prooksidatif bir enzimdir. Melatoninin NOS aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir. NO inhibisyonunun peroksinitrit oluşumunu engelleyeceği ve kardiyak performansı artırabileceği gösterilmiştir (43).



**TABLO 1;** Melatoninin radikaller ve antioksidan enzimlere etkileri (44).

ETKİLENEN MOLEKÜL	MELATONİN'İN ETKİSİ
Hidroksil Radikali	Süpürür
Peroksil Radikali	Süpürür
Süperoksid Anyon Radikali	Süpürür
Singled Oksijen	Süpürür
Peroksinitrit Anyonu	Süpürür
Süperoksid Dismutaz	mRNA'sını sitimule eder
Glutasyon Peroksidaz	Aktivasyonunu uyarır
Glutasyon Redüktaz	Aktivasyonunu uyarır
Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	Aktivasyonunu uyarır
Nitrik Oksit Sentaz	Aktivasyonunu inhibe eder

### 2. 3. 5. Yaşlanma ve melatonin:

Vücudun antioksidan savunma kapasitesi azalırken, yaşlanma ile ilgili olaylar hızlanmakta, immün sistem zayıflamaktadır. Pineal bezin, bir çeşit iç saatimiz olduğunu düşünürsek (26), bez daha düşük düzeylerde melatonin üretmeye başlayacaktır (Şekil 3). Bu sinyal, diğer sistemlere de zamanın geldiğini bildirecek ve yaşlanma ile ilgili süreçler hızlanacaktır.

Serbest radikal hasarının, zaman içinde üst üste eklenerek, yaşlanmanın bazı dejenerasyon bulgularına katkıda bulunabileceği fikri, ilk kez 1956'da Harman (39) tarafından ortaya atıldı. Daha sonraki çalışmalarda, vücutta oluşan serbest radikallerin, yaşlanma ve yaşlanma ile ilgili birçok patolojide rolü olduğuna dair önemli bulgular elde edildi (45,46).

Pineal bezin, güçlü serbest radikal yakalayıcı ve antioksidan bir ajan olan melatoninini sentez etmesi ve yaşlanma ile birlikte fonksiyonlarının azalması (45,47); yaşlanma ile uğraşan araştırmacıların bu beze ilgisinin artmasına neden olmuştur.

Farelerde yapılan bir çalışmada; melatonin tedavisinin, farelerin yaşam süresinde %25'lik bir artışa neden olduğunu ve dahası bu farelerin, daha genç, sağlıklı ve güçlü görünümünün yanısıra, seksüel aktivitelerini de daha uzun süre devam ettirdiği bildirilmiştir (48).

Pierpaoli ve arkadaşları (49), genç ve yaşlı farelerin pinealleri ile çapraz-transplantasyon yaptıklarında; 18 aylık farelerin pineallerinin transplante edildiği 4 aylık farelerde yaşlanmanın hızlandığını; bunun tersi durumda ise, yaşlı farelerin sağlık durumlarında iyileşme ve yaşam sürelerinde artma olduğunu gözlemlediler.

Yaşlı hayvanlarda, melatonin reseptörleri azalmıştır (50) ve yaşlı kadınlarda, melatonin uygulamasının vücut ısısı üzerine etkisi tutarsız ve azalmış olarak izlenmektedir

## 2. 4. MELATONİN VE OSTEOPOROZ

Menopozal period, neuroendokrin değişikliklerle birlikte pineal bezin sekretuar aktivitesindeki azalmayla birlikte (4)3. Menopoz pineal bezdeki değişiklikler ile birlikte pineal bezin gonadotropin salınımı üzerindeki düzenleyici etkisine bağımlıdır (4).

Postmenopozal osteoporoz; en sık görülen metabolik kemik hastalığı ve heterojen kemik kırılabilirliğinin artması ile kemik kırık riskinde artışa yol açan bir durumdur. Östrojen eksikliği en önemli faktör olmasına rağmen kalıtsal durum, hormonal durum, yaş, çevresel faktörler de osteoporozun patojenezinde önemlidir (12).

Erken menopoza giren kadınlar menopozdan 5-10 yıl sonra hızlı bir kemik kaybına girerken tam aksine hem yaşlanmayla birlikte ve hemde erkekler yavaş devamlı kemik kaybına sahiptirler. Kadınlarda bu etki östrojenin çekilmesi ile oluşmaktadır. Bunun tam aksine yavaş kemik kaybı ca dengesindeki değişiklikler ile ca atılması ve ikincil olarak hiperparatiroidizm ile ilişkilidir (2). Östrojen ve testestoren düzeyleri yaşlı erkeklerde düşüktür, son yapılan çalışmalar östrojenin erkeklerde de major kemik düzenleyici hormon olduğunu göstermiştir. Bundan dolayıda östrojen eksikliği erkeklerde de kemik kaybının temel nedeni olabilir (50). Son zamanlarda androjen eksikliğine bağlı andropoz, hormonal sistemlerdeki (GH, IGF1, melatonin ve leptin) sorunlara bağlanmaktadır. Kemik kaybı hem östrojen ve testestorendeki azalmaya hem de GH, IGF1 üretimindeki azalmaya bağlıdır.

Diğer yaşa bağımlı hastalık osteoporozdan sorumlu tutulan hormon melatoninidir. Menopoz; melatonin üretiminde azalmayla birlikte (52) ve bu düşme belki de postmenopozal osteoporozun oluşmasına katkıda bulunmaktadır (Tablo 3).

Pineal bezdeki kalsifikasyon insidansı ki buda pineal bezin sekretuar aktivitesini yansıtmakta, menopozda artmıştır (5). İlginçtirki kadınlarda 30 lu

yaşlardan sonra pineal kalsifikasyon insidansı sabit kalmakla birlikte menopozda kalsifikasyon artmaktadır (3). Dahada fazlası menopozda melatonin idrar metaboliti 6-hirboxymelatonin miktarı azalmaktadır. Bununla birlikte idrar metaboliti 6-hirboxymelatonin miktarı aynı yaştaki erkeklerde değişmemiş bulunmuştur (52). Bu sonuçları toparlayacak olursak menopoz pineal bezdeki değişiklikler ile alakalıdır ve postmenopozal osteoporozdaki artış pineal bezin melatonin salınımı ile ilişkili olabilir.

### **TABLO 3**

#### **PİNEAL BEZİ POSTMENOPOZAL OSTEOPOROZA BAĞLAYAN OLAYLAR**

1. Melatonin yaşlanmayı geciktirir
2. Pineal kalsifikasyon menopoz sırasında artar
3. Melatonin salınımı menopoz sırasında azalır
4. Melatonin PTH ve calcitonin salınımını regüle eder
5. Melatonin Kortikosteroidlerin osteoporotik etkilerini antogonize eder
6. Melatonin PG sentezini inhibe eder
7. Melatonin hareketsizlikle azalır
8. Melatonin salınımı egzersiz ile artar
9. Osteoporoz kronik güneş ışığına maruz kalmakla gecikir
10. Osteoporoz kış aylarında artar
11. Osteoporoz ve pineal kalsifikasyon zencilerde sık değildir.

## BÖLÜM 3

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneysel Hayvanları

Bu deneysel çalışma İnönü üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Deneysel hayvanlar Wistar-albino cinsi, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 49 adet matür dişi rat kullanıldı. Ratlara standart şartlarda (12 saat gün ışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı odalarda ve özel kafeslerde) bakıldı. Beslenmeleri kendi istedikleri zaman 8 mm'lik standart sıçan pellet yemi ile sağlandı. Su verimi yine aynı şekilde kendi istedikleri zaman su içimi şeklinde sağlandı. Operasyon, tüm hayvanlarda aynı cerrah ve yardımcısı tarafından gerçekleştirildi.

#### 3.2. İlaç Uygulaması

Melatonin (Sigma Chemical Company., St. Louis, MO, USA) %96 etanolde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stoklar 5 günlük dozlarda hazırlandı. 20 mg/lık melatonin 1cc %96 lık etanolde çözüldü. Günlük olarak 0.1 cc stok 0.9 cc %0.9 NaCl ile dilüe edildikten sonra, 1cc çözelti 2 rata ip. Olarak uygulandı. Az miktarda hazırlanan stoklar deneylerin yapıldığı süre boyunca ışık almayacak şekilde -20 C'de saklandı. Melatonin ve çözücü intraperitoneal yoldan 21 gün boyunca saat 17.00'de enjeksiyonlar yapılarak verildi. Ratlara melatonin; pinealektomi yapıldıktan 2 ay , ooferektomi yapıldıktan 35 gün sonra 21 gün süre ile verildi.

#### 3.3 Cerrahi Uygulama

##### 3.3.1. Sıçanda Pinealektomi

Pinealektomi Kuszack ve Rodin'in belirlediği metoda uygun bir şekilde yapıldı. Anestezik olarak deneyler sırasında periton içi ketamin Hidroklorid 75 mg/kg (ketalar, parke -davis ) + Xylazine 8 mg/kg (Rompun, Bayer) kombinasyonu kullanıldı. Sıçanların kafa derisi traş edildikten sonra longitudinal olarak oksipital çıkıntıya uzanacak şekilde medialde 1.75 cm'lik bir insizyon yapıldı. Sagittal ve

lambdoid sturların bulunduğu kemiklerin periostları temporal kaslara ulaşıncaya kadar kazıldı. Daha sonra dişçi turu ile rostrokaudal olarak kafatası kemiği ortalama 1.25 cm rektangular ve 0.75 cm mediolateral olacak şekilde kesildi. Superior sagital ven ve transvers sinüsler üzerindeki kemik parçası rostral açıdan tutularak kaldırıldı. Transvers sinüsün mediorostral kenarından sagital venin lateral kenarı boyunca dura kesildi. Superior sagital ven 6-0 atravmatik iplikle 1 mm'lik aralıkla iki defa ligatüre edildi. İki ligatr arasından sagital sinüs kesildi ve posterior kısmı duranın diseksiyonunu izleyerek pineal bez açığa çıkıncaya kadar geriye çekildi. Anterior tarafından ince uçlu penset ile pineal bez sap kısmından tutularak alındı. Daha sonra superior sagital venin her iki ucu birbirine bağlandı ve kafatası derisi, 3-0 ipekle dikildi. Sıçanlar 2 aylık dinlenme perioduna bırakıldılar (Resim 4a-e).

### **3.3.2. Sıçanda ooferektomi**

Bütün deneklere anestezi amaçlı periton içi ketamin Hidroklorid 75 mg/kg (ketalar, parke –davis ) + Xylazine 8 mg/kg (Rompun, Bayer) kombinasyonu uygulandıktan sonra tüm hayvanlar standart bir ameliyat masasında supin pozisyonda tespit edildi. Orta hat laparotomi öncesi traşlanıp povidon iodinle temizlendi. Ardından laparotomi yapılarak bilateral ooferektomi uygulandı. Ooferektomi için önce bir penset yardımı ile bilateral uterin hornlar visualize edildi. Ardından uterin hornlar üzerindeki overler evre dokulardan disseke edildi. İşlem overlerin tutulup bağlanıp kesilmesinden sonra, overlerin çıkartılması ile tamamlandı. Abdominal kaslar ve deri 5/0 ipek sütürle dikildi. 35 günlük dinlenme perioduna bırakıldılar.

### **3.4 DENEY PLANI**

Hayvanlar rastgele örnekleme metoduyla seçilerek toplam 7 grup oluřturuldu:

Grup 1. Sağlam grup (sham; sadece 1 kez hiçbir işlem yapılmadan batin ve kranium açılıp kapatıldı)

Grup 2. Pinealektomi + Melatonin (PX + MLT)

(5 mg/kg/gün melatonin verilen grup)

Grup 3. Pinealektomi + Ooferektomi (PX + OVX)

Grup 4. Ooferektomi (OVX)

Grup 5. pinealektomi (PX)

Grup 6. Pinealektomi + Ooferektomi + Melatonin (PX + OVX + MLT)

(5 mg/kg/gün melatonin verilen grup)

Grup 7. Ooferektomi + Melatonin (OVX + MLT)

(5 mg/kg/gün melatonin verilen grup)



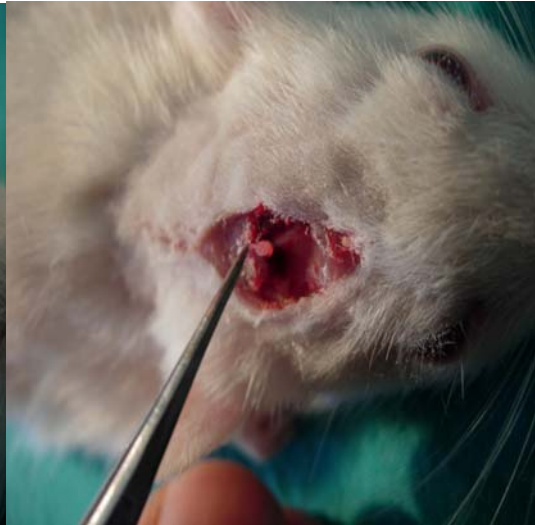
a



b



c



d

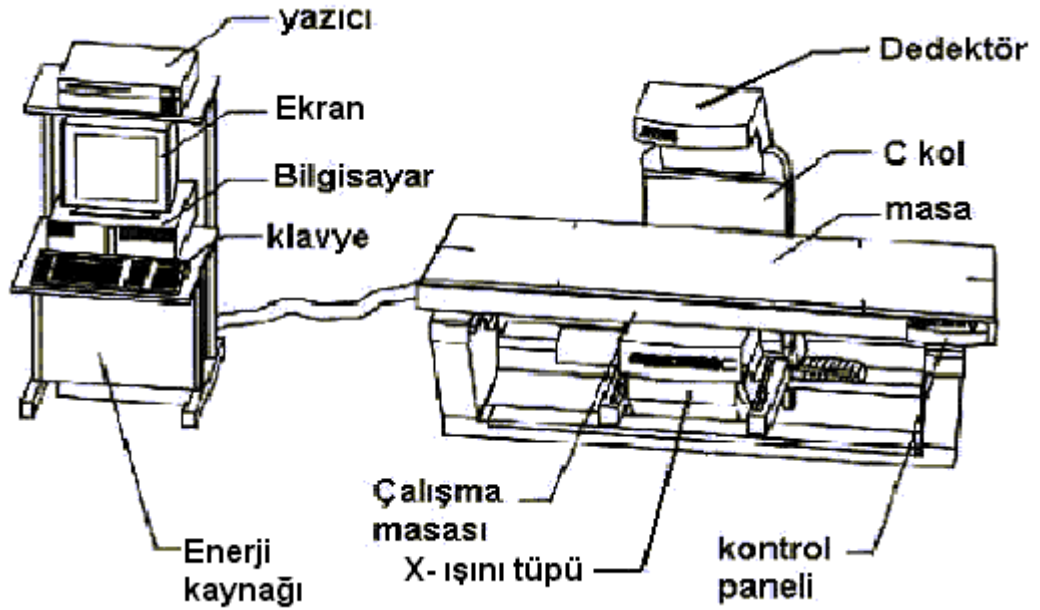


e

**Resim 4-** Kuszack ve Rodin'e göre pinealektomi işlemi. Anestezi uygulanmış rat (a) saçlı deri insizyonu (b) kraniotomi (c) pineal bezin çıkartılması (d) pineal bez (e).

### 3.5 KEMİK MİNERAL DENSİTESİ ÖLÇÜMÜ

Tüm ratların femurlarının kemik mineral dansitesi (KMD) Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) ile ölçüldü (QDR 4500/W, Hologic Inc., Bedford, MA, USA) (Şekil 4). DEXA aleti şalterli sabit 70 kV and 140 kV. Dual enerji yayarak ölçüm yapmaktadır.KMD g/cm<sup>2</sup> cinsinden femur ölçümü yapmakta ve femur 3mm kalınlıkta çizilmiştir (Resim 2). Tablo 4, Resim 2 ve Resim 3 farklı grupların femoral kemik mineral dansitesini göstermektedir. Resim 2 de femoral kemiğin orta kısmı (R1), proximali (R2), distali (R3), total kemik (R4) olarak tanımlanmıştır . Ratların KMD'si pinealektomiden 81 gün sonra , ooferektomiden 56 gün sonra ve tüm grupların aynı gün sakrifiye edildikten sonra ölçülmüştür.



Şekil 4 : KMY değerlendirilmesinin yapıldığı DEXA cihazı.

### 3.6. İSTATİSTİK

İstatistiksel analiz için "The Statistical Package for Social Sciences" (Version 10.0) programı kullanıldı. Sonuçlar means  $\pm$  STD olarak verildi. Grup içi anlamlılığı saptamak için Kruskal-Wallis analizi, R1, R2, R3 ve R4 değerleri açısından gruplar arası farklılığı saptamak için de one-way ANOVA and post-hoc multiple comparisons testi kullanıldı. P < 0.05 bütün karşılaştırmalar için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

Çalışmamız rat osteoporoz (OVX yapılarak) ve yaşlanma modelinde (PX + OVX yapılarak ) melatonin uygulananın kemik mineral dansitometrisi üzerine olan etkisini incelemeyi amaçlamaktadır.

PX+MLT verilen grup sham grubu ile karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken, R1 , R2, R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX + OVX grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında R1, R2, R3, R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. OVX yapılan grup Sham grubu ile karşılaştırıldığında R1, R2, R3, R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX yapılan grup sham grubu ile karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken; R1, R2 ve R4 bölgelerinde anlamlı bir değişim bulunmamıştır. PX+OVX+MLT verilen grup sham grubu ile karşılaştırıldığında melatonin verilen grupta R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken; R1, R2 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. OVX + MLT verilen grup sham grubu ile karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde ooferektomi yapılan grupta grupta KMD'de istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunmuştur. PX + MLT verilen grup PX + OVX ile karşılaştırıldığında ooferektomi yapılan grupta R3 ve R4 bölgelerinde KMD'de istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunurken; R1 ve R2 bölgelerinde anlamlı ilişki saptanmamıştır. PX + MLT ile OVX karşılaştırıldığında R1 bölgesinde KMD'de ooferektomi yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlı azalma bulunurken; R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki saptanmamıştır. PX+MLT ile PX karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+MLT ile PX+OVX+MLT karşılaştırıldığında R1,



R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+MLT ile OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R1, R3 ve R4 bölgesinde KMD'de istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken; R2 bölgesinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+OVX ile OVX grubu karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+OVX ile PX karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+OVX ile PX+OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+OVX ile OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında Pinealektomi yapılan grupta R3 ve R4 bölgelerinde KMD'de istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken; R1 ve R2 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. OVX ile PX karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX ile PX+OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. OVX ile OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında melatonin verilen grupta R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı azalma bulunurken R1 ve R2 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX ile PX+OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX ile OVX+MLT karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. PX+OVX+MLT ile OVX+MLT karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R1, R3 ve R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunurken R2 bölgesinde anlamlı ilişki bulunmamıştır.

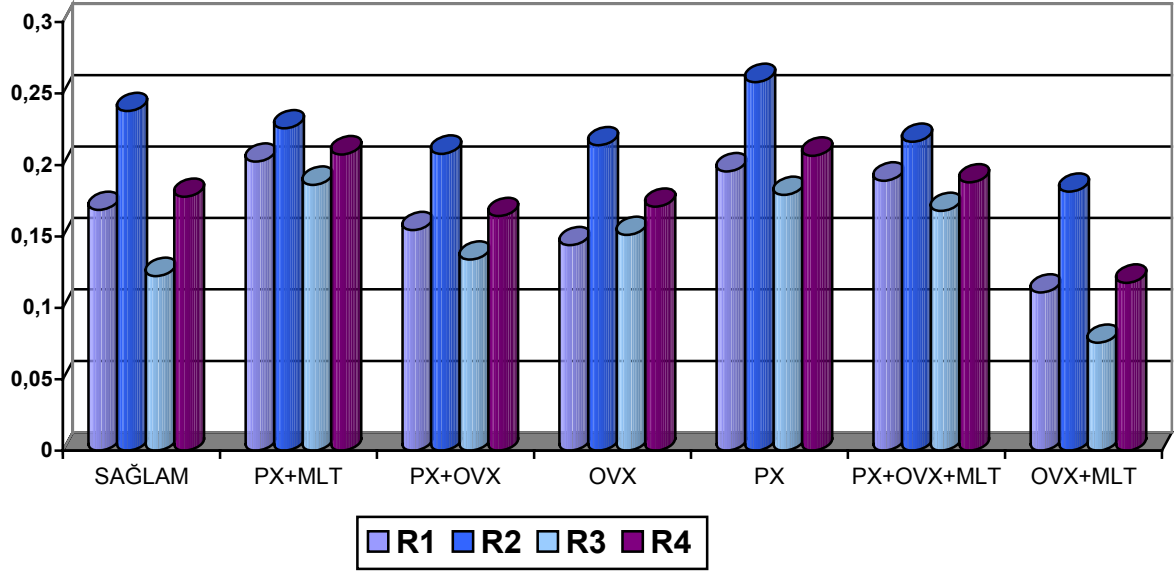
#### Özet olarak;

1. OVX yapılan grup sham grubu ile karşılaştırıldığında tüm bölgelerde KMD'de istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmamıştır.
2. Pinealektomize ratlar sham grubu ile karşılaştırıldığında R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır.
3. Pinealektomize ratlara melatonin eklenmesi ile sham grubu karşılaştırıldığında R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır.
4. Pinealektomiye ooferektomi eklenmesi ile R3 bölgesindeki pinealektomi tarafından sağlanan artış korunamamıştır.
5. PX + OVX ile PX+OVX+MLT eklenen grup karşılaştırıldığında bütün bölgelerde anlamlı ilişki saptanmamıştır.
6. OVX ile OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında melatonin verilen grupta anlamlı artış saptanmamıştır.

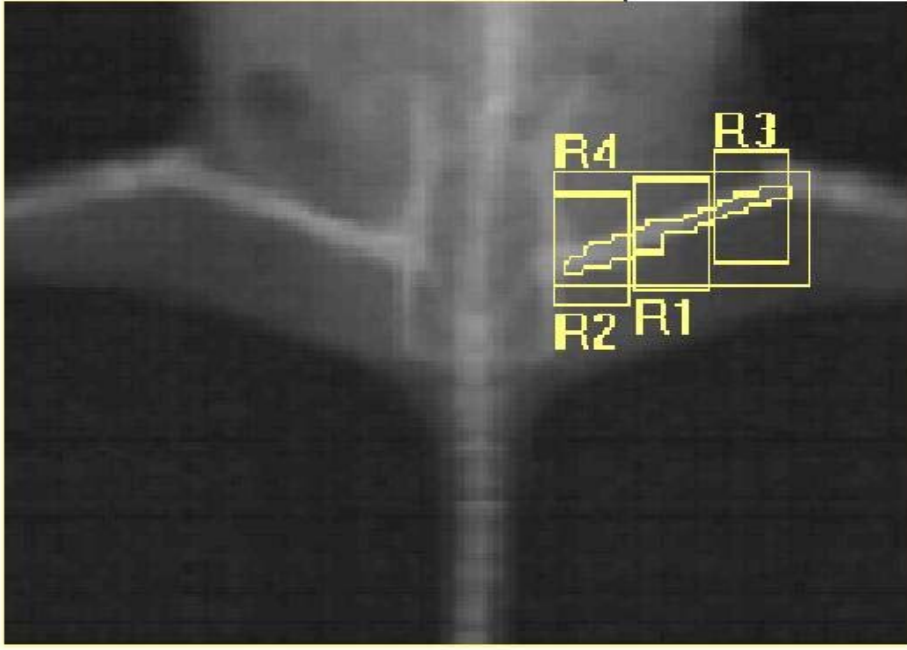
**Tablo 4.** Tüm rat gruplarının femoral kemik mineral dansite değerleri

Gruplar ve P değerleri	Kemik Mineral Dansitesi (gm/cm <sup>3</sup> )			
	R1	R2	R3	R4
I. SAĞLAM	.1685±0.02	.2377±0.01	.1222±0.01	.1777±0.02
II. PX + MLT	.2023±0.02	.2256±0.02	.1861±0.01	.2074±0.02
III.PX+OVX	.1543±0.01	.2078±0.01	.1337±0.05	.1642±0.03
IV. OVX	.1438±0.01	.2138±0.02	.1510±0.01	.1708±0.02
V. PX	.1955±0.02	.2580±0.02	.1790±0.02	.2065±0.03
VI.PX+OVX+MLT	.1890±0.02	.2162±0.01	.1678±0.01	.1878±0.02
VII. OVX+MLT	.1107±0.03	.1813±0.02	.0755±0.01	.1175±0.02
P* value				
I-II	.209	.606	.003	.141
I-III	.608	.224	.581	.514
I-IV	.395	.352	.191	.751
I-V	.383	.455	.019	.217
I-VI	.459	.378	.034	.623
I-VII	.042	.026	.030	.006
II-III	.078	.450	.012	.036
II-IV	.043	.633	.102	.087
II-V	.821	.224	.752	.967
II-VI	.617	.688	.363	.328
II-VII	.001	.065	.000	.000
III-IV	.716	.815	.428	.759
III-V	.187	.071	.058	.074
III-VI	.214	.732	.107	.256
III-VII	.120	.279	.008	.029
IV-V	.113	.124	.251	.143
IV-VI	.124	.926	.442	.434
IV-VII	.256	.208	.001	.018
V-VI	.833	.130	.631	.421
V-VII	.009	.008	.000	.000
VI-VII	.007	.157	.000	.002

P < .05 level. İstatiksel olarak anlamlı Kabul edilmiştir. Değerler mean ± SD olarak verilmiştir. OVX grup, n = 7 (ooferektomi yapılan); PX grup, n = 7 (Pinealektomi yapılan grup); PX+OVX grup, n = 7 (Pinealektomi ve ooferektomi yapılan grup); SAĞLAM grup, n = 7; PX+OVX+MLT grup, n = 7 (Pinealektomi ve ooferektomi yapıp mg/kg melatonin verilen grup); OVX+MLT grup, n = 7 (Ooferektomi yapıp mg/kg melatonin verilen grup) PX+MLT grup, n = 7 (Pinealektomi yapıp mg/kg melatonin verilen grup)



**RESİM 3.** Sağlam, PX+MLT, PX+OVX, OVX, PX, PX+OVX+MLT, OVX+MLT gruplarının KMD değerlerini  $gr/cm^2$  cinsinden gösteren histogram. PX+MLT 'pinelektomi yapıp melatonin verilen, PX 'pinelektomi yapılan', OVX 'Ooferektomi yapılan', PX+OVX 'pinelektomi+ooferektomi yapılan, PX+OVX+MLT 'pinelektomi+ooferektomi yapıp melatonin verilen, OVX+MLT 'ooferektomi yapıp melatonin verilen' grupları ifade etmektedir. R1 Femurun orta 1/3, R2 Proximal 1/3, R3 Distal 1/3, R4 Total kısmın ölçümünü göstermektedir.



**RESİM 2.** KMD ölçümü için femur üzerine işaretlenmiş alt bölgeler  
(R1 Orta 1/3, R2 Proximal 1/3, R3 Distal 1/3, R4 Total )

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Biz bu çalışmada, pineal bezden melatonin salınımı ve fonksiyonlarının menopoz boyunca osteoporoz gelişimi için ilave bir faktör olabileceğini göstermeyi amaçladık. Bu amaçla pinealektomi ve ooferektomi yaparak deneysel yaşlanma ve menopoz benzeri bir durum oluşturmayı amaçladık. Sonuçta da deneysel olarak menopoz oluşturulan ratlara melatonin verdik.

Pineal bezin, güçlü serbest radikal yakalayıcı ve antioksidan bir ajan olan melatonin sentez etmesi ve yaşlanma ile birlikte fonksiyonlarının azalması (18)30; yaşlanma ile uğraşan araştırmacıların bu beze ilgisinin artmasına neden olmuştur.

Menopozal period, nöroendokrin değişikliklerle birlikte pineal bezin sekretuar aktivitesindeki azalmayla birlikte (3). Menopoz pineal bezdeki değişiklikler ile birlikte pineal bezin gonadotropin salınımı üzerindeki düzenleyici etkisine bağlıdır (5). Pineal bezdeki kalsifikasyon insidansı ki bu da pineal bezin sekretuar aktivitesini yansıtmakta , menopozda artmıştır (5). İlginçtir ki kadınlarda 30'lu yaşlardan sonra pineal kalsifikasyon insidansı sabit kalmakla birlikte menopozda kalsifikasyon artmaktadır (3). Daha da fazlası menopozda melatoninin idrar metaboliti olan 6-Hidroksimelatonin miktarı azalmaktadır. Bununla birlikte idrar metaboliti 6-Hidroksimelatonin miktarı aynı yaştaki erkeklerde değişmemiş bulunmuştur (52).

Bu sonuçları toparlayacak olursak menopoz pineal bezdeki değişiklikler ile alakalıdır ve postmenopozal osteoporozdaki artış pineal bezin melatonin salınımı ile ilişkili olabilir.

Melatoninin antigonadotropik etkileri mevcuttur ve seksüel maturasyonu geciktirmektedir. Bu etkisini GNRH'ya olan cevabı azaltarak göstermektedir.

Bununla birlikte yaşlı ratlara melatonin verildiğinde GNRH-mRNA reseptörlerinde %18 artış olmaktadır (54).

Pineal bez ile osteoporoz arasındaki ilişki aşağıdaki gözlemler ile desteklenmiştir:

**A)** Osteoporoz insidansı yaşla arttığı gibi yaşlanmayla birlikte nokturnal melatonin plazma düzeyleri yaşla azalır (52).

**B)** Osteoporoz insidansı gecikmiş kronik güneş ışığına maruz kalma ile artmakta (1) ve dolayısıyla kış aylarında hızlanmaktadır. Bu belki de güneş ışığının ya da karanlığın D vitamini üzerindeki etkilerine bağlıyken belki de; güneş ışığının pineal bez üzerindeki stimülatör etkilerine bağlıdır. Benzer şekilde kış aylarındaki azalmış melatonin salınımı osteoporozun kış aylarında artmasından sorumlu olabilir.

**C)** Osteoporoz prevalansı beyaz ırkta zencilere göre daha fazladır (12). Pineal bezdeki kalsifikasyon ki bu da pineal bezin sekretuar aktivitesini yansıtmakta olup amerikan beyaz popülasyona göre afrikalı ve amerikan zenci popülasyonunda daha düşüktür (3).

Bu bağlamda; osteoporozdaki farklılıklar pineal fizyoloji ve kalsifikasyonların ırklar arasındaki farklılıklarına dayandırılabilir.

Melatoninin kemik üzerinde yararlı etkileri olduğuna dair kesin kanıtlar mevcuttur. Bu etkiyi nasıl gerçekleştirdiği konusunda birçok çalışmalar yapılmış ve değişik görüşler öne sürülmüştür.

Hayvanlarda yapılan çalışmalar, pineal bezin Ca metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (55). Melatoninin kemik üzerine olan etkisini kalsitonin ve paratiroid hormon aracılığı ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir (59)55. Gerçekten de pinealektomi sonrası paratiroid bezde fonksiyonel değişiklikler görülmektedir (57). Bu görüşü destekleyen diğer bir çalışma da yenidoğan ratlarda hiperbilirubinemi tedavisinde fototerapi uygulanması ile melatonin salınımının baskılandığı ve sonuçta serum Ca düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür (58). Oksipital kemiğin örtülmesi ya da melatonin uygulanımı ile serum Ca düzeylerinin azalması önlenmektedir. Başka bir çalışmada B adrenoreseptör bloker; propranolol uygulanımı ile melatonin sentezinin inhibisyon ratlarda hipokalsemiye neden olduğu, bu etkinin de melatonin uygulanımı ile engellendiği gösterilmiştir (59).

Diğer bir görüş; melatoninin kemik hücrelerinde otokoid gibi görev yaptığı yolundadır. Ratlarda ve insanlarda kemik iliği hücreleri melatonin sentezleme yeteneğine sahiptir (10) ve kemik iliğinde yüksek düzeylerde melatonin konsantrasyonları bulunmaktadır. Haldar ve arkadaşları tarafından in vitro şartlarda

melatoninin kemik iliği hücreleri prekürsörleri üzerindeki etkisi kemik iliğinde gösterilmiştir (60). Melatoninin kemik üzerindeki etkisi, pinealektomize tavuklarda skolyoz oluşturma deneylerinde gözlemlenmiştir (64)60. İlginçtir ki, idiopatik skolyozu olanlarda serum melatonin düzeyleri anlamlı olarak kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur (62). Konti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (10), kemik iliği hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda melatonin ve serotonin N-asetil transferaz aktivitesi ve Hidroksi-O-metyl transferaz ( melatonin biosentezinde rol alan son enzim) mRNA ekspresyonu mevcuttur. Daha da fazlası kemik iliği hücreleri uzun süreli kültüre edildiğinde yüksek düzeyde melatonin konsantrasyonuna rastlanılmaktadır(10). Gerçekten de kemik iliği hücrelerinde , intraselüler olarak pozitif melatonin reaksiyonuna rastlanılmıştır (63). Bu olay melatonin en azından kemik iliği hücrelerinde direkt etkisini göstermektedir.

Osteoklastlar kemik yıkımını sağlamak için birçok kimyasal ajan kullanırlar. Bu işlemin en önemli komponenti serbest radikallerdir. Osteoklastlar yıkım sırasında yüksek konsantrasyonlarda süperoksit radikalleri oluşturarak yıkıma katkıda bulunurlar. Bunların ortadan kaldırılması için bir yöntem süperoksit koruyucu ya da yakalayıcı enzim SOD'dir (8). Melatonin, hem fizyolojik hem de farmakolojik dozlarda serbest radikal yakalayıcı ajan ve antioksidandır (8). Bunun yanısıra, birçok serbest radikali ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin nötralize edilmesini sağlar. Melatonin birçok antioksidatif enzimi stimüle eder. Melatonin, hücre yapısındaki tüm makromolekülleri oksidatif hasara karşı yüksek lipid çözünürlüğü ile onları oksidatif saldırıya karşı korur. Bu yüzden melatonin osteoklastik aktiviteyi engellemesi onların serbest radikalleri toplayıcı etkisine dayandırılabilir.

Koyama ve arkadaşları, melatoninin ratlarda kemik kütlesini artırıp artırmadığını incelemişler (69). Melatonin uygulanımı kemik mineral dansitesini %36 oranında ve kemik kütlesini %49 oranında artırmıştır. Bu tedavi ile kemik yıkım parametreleri %74 oranında azalmış (örneğin osteoklast yüzeyi) ve osteoklast sayısı %76 oranında azalmıştır. Fakat histomorfometrik kemik yapım parametrelerinde artış gözlenmemiştir. Buna dayanarak melatonin kemik kütlesini kemik yıkım parametrelerini süprese ederek artırdığını söylemişlerdir (69). Tam aksine çok az çalışmada melatoninin osteoblast proliferasyonun artırdığı ve farklılaşmayı sağladığı görülmüştür.

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan da anlaşılacağı gibi melatoninin normal kemik üzerindeki etkisi çok fazla çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen, menopozda melatonin salınımının azalmasının osteoporoz üzerine olan etkisi ve

menopozdaki kemik üzerine melatonin uygulananının etkisi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

Ooferektomize ratlarda melatoninin kemik kaybında etkili olduğu ilk defa Ladiezski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (70). İdrar deoksiprodinilin (kemik yıkım markerı) ve Ca atılımı, dolaşımdaki Ca düzeyleri, fosfor ve kemik alkalin fosfataz aktivitesi (kemik yapım parametresi), kemik mineral dansitesi ve içeriği, tüm iskelet sistemindeki kemik alanı yetişkin ratlarda ooferektomi sonrası ölçülmüştür. İdrar deoksiprodinidin düzeyleri ooferektomi sonrası anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur. Ooferektomi sonrası melatonin verilen grupta idrarda deoxyprodinilin düzeylerindeki artış gözlenmemiştir. Cerrahiden sonra serum fosfor ve kemik alkalin fosfataz düzeylerinde melatonin verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı artış bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları ooferektomi sonrası melatoninin farmakolojik dozları kemik yapımını düzenlemekte bunun içinde yeterli miktarda östradiol ihtiyacı olduğu yolundadır (54).

Postmenopozal osteoporozlu ve obez kadınlardaki 24 saatlik serum melatonin düzeylerindeki değişikliklerle birlikte tip 1 kollajen metabolizması arasındaki ilişki incelenmiştir. Kollajen metabolizmasını gösteren belirteçler ile melatonin düzeyleri arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. Azalmış melatonin belki de postmenopozal osteoporozda kemik kaybını ağırlaştır eden faktör olarak düşünülmüştür (71). Benzer şekilde ooferektomize ratlarda yapılan deneysel çalışmada serum melatonin düzeyleri ile kemik yıkım parametreleri; tip 1 kollajen, hidroksprolin ve total idrar Ca arasında negatif ilişki kemik yapım parametreleri, alkalin fosfataz, kaboksiterminal-propeptid ve karboksi-terminal telopeptid tip 1 prokollajen arasında ise bu negatif ilişki bulunmamıştır.

Pinealektomize ratlarda melatonin azaldığı için GnRH serbest kalmakta bu da FSH ve LH'nin flare up'ına yolaçmaktadır. Estrojen sentezindeki bu artış sadece pinealektomi yapılan grupta R3 değerlerinde KMD'de anlamlı bir yükselmeye yol açmıştır. Ancak sadece Pinealektomi yapılan grup R1, R2 ve R4 değerlerinde belirgin bir artış saptanmamıştır. Pinealektomi yapıp sonrasında tedaviye egzojen melatonin eklenen grup ile sham grubu karşılaştırıldığı zaman R3 değerlerinde pinealektomi yapılan grupta belirgin bir artış saptanırken diğer R bölgelerinde belirgin bir değişiklik olmamıştır. Akut dönemde östrojen düzey artışına rağmen melatonin depleasyonu kronik süreçte apoptotik hücre ölümünü artırmakta buda KMD değerlerinde değişik R bölgelerinde farklı değerlere yol açmaktadır.



Pinealektomi sonrası hücre ölümünün artmasının nedeni pineal bezin antioksidatif etkisinin ortadan kalkmasına bağlıdır. Son çalışmalar reaktif oksijen türlerinin hücre ölümünün başlamasında önemli rolü olduğunu göstermektedir (72,73). Eğer pinealektomi sonrası oluşan oksidatif strese osteoblastlar yeterli cevap veremezse KMD değerleri korunamamaktadır.

Sadece PX yapılan gruba egzogen melatonin ekleyince R3 değerlerinde PX tarafından oluşturulan olumlu artış engellenememiştir. Egzogen melatonin uygulamanın KMD değerlerindeki artışı olumsuz etkilememesi, osteoblastlar üzerinde endojen melatonin varlığının daha önemli olduğunu ve postreseptör modülasyonu sağladığını düşündürmektedir.

Pinealektomiye ooferektomi eklenmesi durumunda, R3 değerlerinde PX tarafından sağlanan artış korunamamıştır. Yani PX+OVX grubunda R3 değerleri PX grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu da PX'nin KMD değerleri üzerine olumlu etkisinin östrojenin bulunduğu ortamda gerçekleştiği hipotezini düşündürmektedir. Bu hayvanlara egzogen melatonin verilmesi ile KMD değerlerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgu da bize melatoninin etkisini gösterebilmesi için ortamdaki östrojen varlığının ne kadar önemli olduğunu düşündürmektedir. Son yapılan çalışmalarda, ooferektomize ratlarda östradiol alan ve almayan grupta melatoninin kemik metabolizması üzerine olan etkisi incelenmiş (74). İdrarda kemik yıkım parametresi deoksiprinodilin ve kemik yapım parametreleri ölçülmüş. Ooferektomi idrar deoksipridinolin düzeylerini artırırken, östradiol ve melatonin azaltmıştır. Melatonin ve östradiolün etkisi başlıca ooferektomize ratlarda görülmüştür. Melatonin ya da östradiol, serum kemik alkalin fosfataz aktivitesini azaltmıştır. Serum fosfor düzeyleri melatonin uygulananından sonra azalmış ve östradiol uygulananı ile artırılmıştır. Ooferektomi yapılan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında serum Ca ooferektomi yapılan grupta azalmış östradiol ise artmıştır. Cerrahi sonrası kemik mineral dansitesi, ooferektomi yapılanlarda azalmış ve östradiol uygulananı ile artmıştır. Melatonin ise kemik mineral dansitesini artırmıştır. En yüksek değerler melatonin ve östradiol birlikte uygulananlarda gözlenmiştir. Bu yüzden ooferektomi sonrası kemik remodelingi için hem melatonin hem de östradiole ihtiyaç olduğu ve daha da ötesi östradiolün etkinliği melatoninle birlikte arttığını göstermişlerdir (74). Bizim çalışmamızda da melatoninin etkisi incelendiğinde overleri korunan grupta kemik mineral dansitesi, ooferektomi yapılan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu da melatoninin etkisini gösterebilmesi için dolaşımda yeterli düzeylerde östrojen bulunması gerektiği fikrini desteklemektedir.

Çalışmamızda pinealektomize ratlara exogen melatonin uygulanması ile kemik mineral dansitometrisi artmamaktadır. Ostrawski ve arkadaşları ooferektomi sonrası osteoporoz gelişen dişi ratlarda pinealektomi ve melatonin uygulananının etkisini incelemiş (75). Alkalen fosfataz aktivitesi, karboksiterminal tip 1 propeptid kollajen ve karboksiterminal tip 1 telopeptid düzeyleri ve idrardaki Ca atılımı ve idrar hirroksiprolin düzeyleri ölçülmüş. Çalışma pinealektomi kemik remodeling parametrelerini hızlandırırken melatonin bu etkiyi azaltmıştır.

Bizim çalışmamız pinealektomi sonrası melatoninin KMD üzerine olan etkisini inceleyen ilk çalışmadır. Pinealektomi sonrası dolaşımdaki östrojen miktarları artmaktadır (76). Hatta Texiara pinealektomi yapılmış ratlarda endometrial hiperplazi geliştiğini göstermiş ve bu da melatonin uygulananını ile tersine döndürülmüştür (76). Biz de kendi çalışmamızda pinealektomize ratlarda KMD'nin anlamlı olarak artmış olduğunu gördük. Bu pinealektomi sonrası melatoninin antigonadotropik etkisinin ortadan kalkması ile birlikte dolaşımdaki östrojen seviyelerinin artmasına bağlı olabilir. Ostrawski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pineal bezi korunanlarda melatonin etkisi daha az görülmüş. Biz de benzer şekilde pineal bezi korunanlarda melatoninin etkisini daha az bulduk. Bu gözlemler Ladiezski ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile hemfikirdir.

Sonuç olarak yaşlanmayla birlikte pineal bezin fonksiyonlarının azalması osteoporoz için bir risk faktörü olabilir. Menopozdaki melatonin azalması ya da ritmin bozulmasının osteoporozu artırdığı hipotezi sadece teorik olarak önemli değil ayrıca tedavi içinde kullanılması açısından önemlidir. Fakat menopozda melatonin kullanımı ile ilgili daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## BÖLÜM 6

### ÖZET

#### OOFEREKTOMİZE VE PİNEALEKTOMİZE RATLARA EGZOJEN MELATONİN UYGULANIMININ KEMİK MİNERAL DENSİTOMETRİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

**Amaç:** Postmenopozal osteoporoz en sık görülen metabolik kemik hastalıklarından bir tanesidir. Son zamanlarda postmenopozal osteoporozun patogeneziye yönelik artmış bir ilgi mevcuttur. Osteoporoz patogeneziinde östrojen eksikliğinin katkısı olduğuna dair kanıtlar bulunmasına rağmen osteoporoz multifaktöriyel olarak düşünölmektedir ve patogenezi daha tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Menopozla pineal kalsifikasyonun arttığı, melatonin salınımının yaşla azaldığı ve melatoninin anti-aging hormonu olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Biz bu çalışmamızda menopozda melatoninin azalımının postmenopozal osteoporoz gelişiminde etkili faktörlerden biri olabileceğini göstermeyi amaçladık.

**Materyal ve Metod:** Wistar-Albino cinsi 49 adet sıçan çalışmaya dahil edildi. Seçilen gruptan bir kısmına xylasin ve ketamin ile anestezi uygulandıktan sonra dorsal yolla ooferektomi ve Kuszack ve Rodin methodu ile pinealektomi yapıldı. Pinealektomiden 8 hafta ooferektomiden 35 gün sonra seçilen grupta 5 mg /kg/gün melatonin uygulandı. Sonrasında sıçanların femur kemik mineral dansitrometrisi Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DXA; 4500W, Hologic, USA) kullanılarak ölçüldü. Ölçümler aynı kişi tarafından yapıldı. Femur dan 4 bölgede: proximal 1/3 (R2), middle 1/3 (R1), distal1/3 (R3), total (R4)' te ölçümler yapıldı.

**Bulgular:** PX + MLT verilen grup sham grubu ile karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. PX +

OVX grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında R1, R2, R3, R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. OVX yapılan grup sham grubu ile karşılaştırıldığında R1, R2, R3, R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX yapılan grup sham grubu ile karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. PX+MLT ile PX karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+OVX ile PX+OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında R1, R2, R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı ilişki bulunmamıştır. PX+OVX+MLT ile OVX+MLT karşılaştırıldığında pinealektomi yapılan grupta R1, R3 ve R4 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. OVX ile OVX+MLT verilen grup karşılaştırıldığında melatonin verilen grupta R3 ve R4 bölgelerinde anlamlı azalma bulunmuştur.

**Sonuç ve Tartışma:** Pinealektomi KMD değerlerinde R3 bölgesinde belirgin artışa yol açmış olup bu artış egzogen melatonin uygulanarak geri döndürülemediği. PX'e OVX eklenince KMD değerlerinde PX tarafından sağlanan artış engellenmiştir. Pinealektomize ve ooforektomize gruba egzogen melatonin uygulanımı KMD değerlerinde anlamlı bir artışa yol açmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ooforektomi, Pinealektomi, Melatonin, DEXA, Kemik Mineral Dansitesi, Rats

## SUMMARY

### EFFECTS OF EXOGENOUS MELATONIN ADMINISTRATION ON BONE MINERAL DENSITY IN OVARECTOMIZED AND PINEALECTOMIZED RATS

**Objective:** Postmenopausal osteoporosis is the most common metabolic bone disease. There is currently considerable interest in pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. Although there is evidence that estrogen deficiency is an important contributory factor, the pathogenesis of osteoporosis multifactorial and not well understood. There is evidence that pineal melatonin is an anti-aging hormone and that the menopause is associated with a substantial decline in melatonin secretion and increased rate of pineal calcification. Hence, the pineal gland may function as a “fine tuner” of calcium homeostasis. In our study we proposed the pinealectomy induced melatonin deprivation in menopause may be contributory factor in the development of postmenopausal osteoporosis.

**Material and Method:** A total of 49 young Wistar-albino rats were submitted to the study. Chosen groups submitted to bilateral ovariectomy by the dorsal route, and pinealectomized with Kuszack ve Rodin method. All surgical procedures were performed while the rats were under intraperitoneal ketamine and xylazine HCl anesthesia. After pinealectomy and ovariectomy, chosen groups, dose of 5 mg /kg/gün was administered intraperitoneally (daily between 17.00 and 18.00 h for a 3-week period). We measured bone mineral density of the femur by using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA; 4500W, Hologic, USA) and results were evaluated. The BMD of femur named as proximal 1/3 (R2); middle 1/3 (R1); distal1/3 (R3); total (R4).

**Results:** Compared with the sham group, PX + MLT group had significantly higher BMD values at R3 subregion. There is no statistically significant relationship between PX + OVX group and sham group at subregions. Also there is no statistically significant relationship between OVX group and sham group at subregions. Compared with the sham group, PX group had significantly

higher BMD value at R3 subregion. There is no statistically significant relationship between PX group and PX+MLT group at subregions. There is no statistically significant relationship between PX + OVX group and PX + OVX+MLT group at subregions. Compared with the OVX + MLT group, PX+OVX+MLT group had significantly higher BMD values at R1, R3, R4 subregions. Compared with the OVX group, OVX + MLT group had significantly lower BMD values at R3, R4 subregions.

**Conclusion:** Pinealectomy significantly increases BMD at R3 subregion, but its not reversed by exogen melatonin administration. Ovariectomy canceled the effects of pinealectomy with respect to increases in the levels of reached bone mass. Exogen melatonin administration to ovariectomized and pinealectomized group did not increase BMD values.

**Key Words:** Ovariectomy, Pinealectomy, Melatonin, DEXA, Bone Mineral Density, Rats

## KAYNAKLAR

1. Sandyk R. Anastasiadis P. Is postmenopausal osteoporosis Related to pineal gland function? *Inren. J. Neuroscience* . 1992;62:215-225
2. Cardinali Dp. Pevet P. Basic aspects of melatonin action *sleep Med. rev* 1998;2:175-190.-3-BARTSCH C. Bartsch H. Blask DE. Cardinali Dp. Hreushesky W. Mecke D. *The Pineal Gland and Cancer neuroendocrine mechanisms in malignancy*. Berlin. Springer 2000
3. Tirentini, G .P., De Gaetani , S.F. , Criscuola (1987) .Pineal Calcification in different physiopatological conditions in humans *Fundamentals and clinics in pineal research* .New York :rawen Pres.(pp.291-304).
4. Wurtman R.J. , Axelrod ,J .& Kelly ,D.E. (1968) .*The Pineal* .New York :Academic Press et al ,
5. Macperson ,P.& Matheson, M.S. (1979). Comparison of calcification of pineal , habenular commissure , and choroid plexus on plain films and computed tomography. *Neuroradiology* ,18,67-72
6. Manolagas Sc. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrin rev.* 2000;21:115-137
7. Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L et al. Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system. *J Bone Miner Res* 1998; 13:67–78.

8. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogenspecies: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001;34:237–256
9. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 2002; 23:639–644.
10. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in Mouse and human bone marrow cells. *J. pineal res.* 2000;28:193-202
11. Tan DX, Manchester LC, Reitter RJ. Et al. identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. biophys Acta* 1999;1472:206-214
12. Arnoud C.D., Kolb, F.O. (1986) The calciotropic hormones and metabolic bone diseases, *Basic and clinical endocrinology*, (pp. 202-271). Los Altos California; Lange medical publications
13. Hahn BH. Osteopenic bone diseases. Mc Carty D, Kopman Wj, ed. *Arthritis and allied conditions*. Philadelphia-London: Lea Febiger, 1993:1927-55
14. Kanis JA. Osteoporosis. Blackwell science Ltd. Cambridge 1994; 1-22, 108-14.
15. Nordin CBE, Chatterton BE, Need AG, Horowitz M. The definition, diagnosis and classification of osteoporosis. *Phys Med and Rehab Clinics of North America* 1995;6:399-414.
16. Dilşen G. Osteoporoz konsensus konferansı, tanı, korunma şekli ve tedavi. *Romatoloji bülteni* 1993;1:73-7.
17. World health organization : Assesment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report services, Geneva, 1994
18. Nas K ve ark, Osteoporozda risk faktörleri, Göksoy T(ed.) : Osteoporozda tanı ve tedavi, Merajans, İstanbul 2000,: 69-94
19. Tüzün F ve ark., Osteoporozun epidemiyolojisi, Kemik ve eklemlerde kadında osteoporoz, Aventis, İstanbul 2002: 14-23
20. Wolker K et al, Epidemiology of osteoporosis, *Rheum Dis Clin North Am* 2001: 27 :1-18
21. Eryavuz-Sarıdoğan M., Osteoporozun tanımı ve sınıflandırması. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon dergisi*, Osteoporoz özel sayısı. 2002;1: 1-10



22. Düzova A. Ve Bakkaloğlu A. Romatizmal hastalıklarda osteoporoz. *Katkı Pediatri Dergisi*, 1999, 20(6), 811-819
23. Ayers, J., Gidvani, G. & Schmidt, I. (1984). Osteopenia in hypoestrogenic young women with anorexia nervosa, *Fertility and sterility*, 41, 224-228.
24. Rigotti, N.A., Nusbaum, S.R., Herzog (1984). Osteoporosis in women with anorexia nervosa. *New England Journal of Medicine*, 311, 1601-1606.
25. Klatz R, Goldman R. *Stopping the clock*. 2<sup>nd</sup> Ed, New York: Bantam Books. 1997: 27-47.
26. Ölmez E, Sahna E, Ağkadir M, Acet A. Melatonin: Emeklilik Yaşı 80 olurmu? *Turgut Özal Tıp M Derg* 2000 7(2):177-187.
27. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniv Sağlık Bil Ens Derg* 1996 10(1):141-147.
28. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
29. Brzezinski A. Mechanisms of disease: Melatonin in humans. *N England J Med* 1997; 336 (3): 186-95.
30. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: Structure and function. *Am J Anat* 1981; 162: 287-313.
31. Binkley S. *The pineal: Endocrine and neuroendocrine function* 1988. Prentice Hall, New Jersey
32. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 1998 Jul;78(3):687-721. Review.
33. Waldhauser F, Dietzel M. Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 453: 205-14.
34. Oxenkrug G, Requintina P, Bachurin S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Jun;939:190-199.
35. Sack RL, Lewy AJ, Hughes RJ. Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. *Ann Med* 1998; 30 (1): 115-21.
36. Vakkuri O, Rintamaki H, Leppaluoto J. Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J Endocrinol* 1985 May;105(2):263-268
37. Yellon SM. Daily melatonin treatments regulate the circadian melatonin rhythm in the adult Djungarian hamster. *J Biol Rhythms*. 1996 Mar;11(1):4-13.

38. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269: 28531-4.
39. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41: 229-36.
40. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001 Mar;53(1):135-159
41. Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 1988 Sep;2(12):2765-73. Review.
42. Reiter RJ. Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition.* 1998 Sep;14(9):691-6. Review.
43. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1995 Sep;30(3):432-9.
44. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41: 229-36.
45. Harman D. Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Jun 30;717:1-15. Review.
46. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Castroviejo DA. Reactive oxygen intermediates molecular damage and aging: Relation to melatonin. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854:410-24.
47. Binkley S. *The pineal: Endocrine and norendocrine function* 1988. Pirentice Hall, New Jersey
48. Klatz R, Goldman R. *Stopping the clock.* 2<sup>nd</sup> Ed, New York: Bantam Books. 1997: 27-47.
49. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 787-801.
50. Laitinen JT, Viswanathan M, Vakkuri O, SaavedraJM. Differential regulation of the rat melatonin receptors: Selective age associated decline and lack of melatonin induced-changes. *Endocrinol* 1992; 130: 2139-44.
51. Inzerillo AM, Zaidi M. Osteoporosis: Trends and intervention. *Mt Sinai J Med* 2002; 69:220–231.53- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM,

- Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy:Scientific review. JAMA 2002; 288:872–881.
52. Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM. Human melatonin production decreases with age. J Pineal Res 1986; 3:379–388.
  53. Hahn T.J. (1986) . Metabolic bone diseases .In N.Lavin (ed) ,Manuel endokrinology and metabolism (pp.303-318) .Boston :Little Brown and Company.
  54. Grumbach, M .M. & Conte, F.A (1985) .Disorders of sexual differentiation .In J.D Wilson & D. Textbook of endokrinology (pp.312-401) .Philadelphia : W.B Saunders company .
  55. Krstic. R.(1967) .On changes in the parathyroid glands after epiphysectomy. Zeitschrift fuer Zellforschung. 77.8-24.
  56. Shomura S. CHEN H, Emura S et al. An in vitro study on the effects of melatonin on the ultrastructure of the hamster paratiroid gland. Histol histopatol. 1990; 7:715-718
  57. Kiss j, Banhegyi D, Csaba G. Endocrineregulation of bloodcalcium level, H. Relationship between the pineal body and the parathyroid glands. Acta Med. Acad Sci HUNG 1969; 2:363-370,
  58. Hakanson DO Bergstrom WH phototerapy induced hypocalcemia in newborn rats; prevention by melatonin .Science 1981; 214:807-809
  59. Hakanson .DO. Bergstrom wh. calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin. Pediatr. res. 1987; 22:414-416
  60. Haldar C, Haussler D, Gupta D ,effect of pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell culteres .j.pineal Res. 1992 ;12 :79-83
  61. Machida M., Miyashita Y. Murai I., Dubgusset J , Yamada T, Kimura I. Role of serotonin for scoliotic deformity in pinealectomized chicken .spine 1997; 22:1297-1301 -21 inoh H. Kawakami N, Matsuyama Y et al. Correlation between the age of pinealectomy and the development of scoliosis in chickens. spine 2001; 26:1014-1021
  62. Sadat-Alı M, Al Habdan I, At .Othman A Adolescent idipatic scoliosis. Is low melatonin a cause? Joint Bone Spine 2000; 67 :62 -64
  63. Tan Dx, Manchester Lc, Reitter Rj. Et al. identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. Biochim. biophys Acta 1999; 1472:206-214

64. Roth Ja, Kim Bg, Lin WI, Cho Mi. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 22041-22047
65. Nakade O, Koyama H, Arih H, Yahma A, Kaku T, Melatonin stimulates proliferation and type 1 collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J. Pineal Res.* 1999; 27: 106-110
66. Krane SM, Genetic control of bone remodelling insights from a rare disease. *New Engl. J. Med.* 2002; 347: 210-212
67. Suzuki N, Attori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the goldfish scale. *J Pineal Res* 2002; 33: 253–258.
68. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev* 2000; 21: 115–137.
69. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1219–1229.
70. Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, Somoza J, Centrella JM, Mautalen C, Cardinali DP. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci* 2001; 70: 557–565.
71. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Swietochowska E, Gorski J. Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. *Neuroendocrinol Lett* 2001; 22: 121-127
72. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology.* 1994; 134: 245-52.
73. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.
74. Ladizesky MG, Boggio V, Albornoz LE, Castrillo'n P, Mautalen CA, Cardinali DP. Melatonin increases estradiol induced bone formation in ovariectomized rats. *J Pineal Res* 2002; 34: 143–151.
75. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Staszewicz P, Szapska B, Strzelczyk J. The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism

inexperimental osteoporosis in the rat. *Neuroendocrinol Lett* 2002; 23 (Suppl 1):104–109.

76. Teixeira AAC (1998). Pinelectomized rats endometrial morphologic aspects. Sao Paulo, SP, Brazil , 185-227