

## ÖZGÜN ARAŞ TIRMA ORIGINAL RESEARCH

Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg u 2019;26(1):96-103 doi: 10.17343/sdutfd.511364

# DOES SHILAJIT HAVE AN EFFECT ON NEW BONE REMODELLING IN THE RAPID MAXILLARY EXPANSION TREATMENT? A BIOCHEMICAL, HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY SHİLAJİT'İN HIZLI MAKSİLLER GENİŞ LETME TEDAVİSİNDE YENİ KEMİK Ş EKİLLENMESİ ÜZERİNE ETKİSİ VAR MI? BİYOKİMYASAL, HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞ MA

Mine GEÇGELEN CESUR1 , Gözde ÖRENİM1 , Kanat GÜLLE2, Fevziye Burcu Ş İRİN3, Meryem AKPOLAT4, Gökhan CESUR5

<sup>1</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.

<sup>3</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.

<sup>4</sup> Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye.

<sup>5</sup> Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

Bu makaleyi ş u ş ekilde alıntı yapın: Geç gelen Cesur M, Örenim G, Gülle K, Ş irin FB, Akpolat M, Cesur G. Ş ilajitin hızlı üst ç ene geniş letme tedavisinde yeni kemik yeniden ş ekillenmesi üzerinde etkisi var mı? Biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal bir çalış ma. Med J SDU 2019; 26(1): 96-103.

Sıç anlar

### Amaç

Bu çalış manın amacı sıç anlarda hızlı maksiller geniş letme (RME) sonrası shilajit'in yeni kemik ş ekillenmesine etkilerini histopatolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal teknikler kullanarak göstermektir.

### Gereç ve Yöntem

Wistar Albino türü sıç anlar (12 haftalık) 3 farklı gruba ayrılmış tır (n = 8): üst ç enede geniş letme yapılmamış (NE), üst ç enede sadece geniş letme yapılmış (OE), üst ç enede geniş letmeye ilave olarak shilajit uygulanmış (Shilajit). Sıç anlara 5 günlük geniş letme ve 12 günlük retansiyon periyodu süresince shilajit uygulandı. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra gerekli numuneler alınıp histopatolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizler yapıldı.

### Bulgular

Shilajit grubundaki glutasyon peroksidaz, süperoksit

dismutaz ve katalaz düzeyleri OE grubundan daha yüksek bulundu (p <0.05). C telopeptid tip I kollajen ve kemik alkalin fosfataz seviyeleri gruplar arasında anlamlı farklılıklar gösterdi (p <0.001). İmmünohistokimyasal bulgular, OE grubunun shilajit grubundan anlamlı olarak daha fazla IL-1 ve TNF-α H skorları na sahip olduğunu gösterdi (p <0.05). Tüm gruplar kılcal damar yoğunluğu, inflammatuar hücre infiltrasyonu ve yeni kemik oluş umu açısından karşı laştırıldığında gruplar arasında belirgin farklılıklar bulundu (p <0.05).

### Sonuç

Shilajit'in sistemik kullanımı, midpalatal suturda yeni kemik ş ekillenmesini hızlandırarak, RME tedavisinden sonra nüksün önlenmesinde ve retansiyon süresini kısaltmada faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Hızlı maksiller geniş letme, shilajit, kemik oluş umu

İletiş im kurulacak yazar/Corresponding author: minegecgelen@hotmail.com Müracaat tarihi/

Application Date: 10.01.2019 • Kabul tarihi/Accepted Date: 12.02.2019 ©Copyright 2018 by Med J SDU -

Available online at <http://dergipark.gov.tr/sdutfd> ©Telif Hakkı 2018 SDÜ Tıp Fak Derg - Makaleye <http://dergipark.gov.tr/sdutfd> web sayfasından ulaş ılabilir.

## Soyut

### Amaç Bu

çalışmanın amacı, histopatolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal teknikleri kullanarak farelerde hızlı maksiller geniş leme (RME) sonrasında yeni kemiğin yeniden şekillenmesi üzerine shilajitin etkilerini göstermektir.

### Gereç ve Yöntem Sıçanlar

(12 haftalık) 3 gruba ayrıldı (n=8): maksiller geniş leme yok (NE), sadece maksiller geniş leme (OE), maksiller geniş leme + shilajit (Shilajit).

Sıçanlar, 5 günlük geniş letme ve 12 günlük bakım süresi boyunca shilajite alındı. Tüm ratlar aynı anda sakrifiye edildi. Hayvanlar kurban edildikten sonra gerekli dokular alınarak histopatolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizler yapıldı.

### Sonuçlar

Glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve

shilajit (shilajit + ekspansiyon) grubundaki katalaz seviyeleri OE grubundan ölçülebilir derecede yüksekti ( $p<0.05$ ). C-telopeptid tip I kollajen ve kemik alfa line fosfataz seviyeleri tüm gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ( $p<0.001$ ). İmmünohistokimyasal kanıtlar, OE grubunun, shilajit grubuna göre esasen daha fazla IL-1 ve TNF- $\alpha$  H skoruna sahip olduğunu gösterdi ( $p<0.05$ ). Kapiller yoğunluk, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yeni kemik oluşumu açısından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ( $p<0.05$ ).

### Sonuç Shilajitin

sistemik kullanımını midpalatal sütürde yeni kemik yeniden şekillenmesini hızlandırabilir, bu da RME tedavisinden sonra retansiyon süresini kısaltmak ve önlemek için faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Hızlı maksiller geniş leme, shilajit, kemik oluşumu

## Giriş

Hızlı maksiller geniş letme (RME), ortodontistler tarafından rutin olarak uygulanan etkili bir ortodontik tedavidir. Aktif evre ve pasif evre olmak üzere iki farklı evresi vardır. Aktif aşamada midpalatal sütür, maksiller kemiğin iki parçasını ayırmak için geniş leme kuvvetleriyle genişletir. Pasif aşamada sütür dokuları kemik remodasyonuna uğrar, rezorpsiyon ve yeni bir stabilizeye kadar liflerin yeniden düzenlenmesi sağlanır (1,2). Genişletilmiş maksiller diş arka, retansiyon süresinden sonra tedavi öncesi genişliklerine dönme eğilimindedir. Literatürler relaps sıklığının %45'e kadar çikabileceğini bildirmektedir (2,3).

Çok sayıda araştırıcı, bisfosfonatlar (3), vitaminler (4), lazer uyarımı (5-8), kök hücreler (9), düşük yoğunluklu darbeli ultrason (10) gibi midpalatal sütürde kemiğin yeniden şekillenmesini geliştirmek için belirli yöntemleri denediler. , seks steroidleri (11), hyaluronik asit (12) ve antioksidanlar (13-15). Antioksidan tedaviler günümüzde osteoklastik aktiviteyi engelleyerek ve osteoblastik aktiviteyi teşvik ederek kemik metabolizması üzerine etkileri nedeniyle araştırılmaktadır (14,15).

Shilajit, geleneksel tıpta terapötik bir ajan olarak bilinmekte ve kullanılmaktadır. Shilajit, yağ asitleri, benzoik asit ve B1 ve B12 gibi vitaminler ve diğer farklı antioksidan bileşikleri içerir (16,17).

Shilajitin antioksidan özelliklerine hem dibenzo- $\alpha$ -pironlar hem de fulvik asit neden olabilir (18). Şilajit

jit iyi araştırılmış ve güvenilir bir malzeme olarak kabul edilmektedir (16,19). Bu bilgilere göre, genişletilmiş midpalatal sütürde kemik rejenerasyonunu uyararak için organik ve ucuz bir madde olan shilajit kullanılması avantajlı olabilir.

## Malzemeler ve yöntemler

### Hayvanlar ve Gruplar Bu

çalışma için 12 haftalık 24 erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarından alındı. Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik izin alınmış tır (64583101/2014/064).

Sıçanlar rastgele üç gruba ayrıldı (n=8): maksiller geniş leme yok (NE), sadece maksiller geniş leme (OE) ve maksiller geniş leme + shilajit (Shilajit). Shilajit grubu içinde, 100 mg/kg/gün Shilajit, geniş letme ve tutma fazları boyunca oro gastrik kateter yoluyla sistemik olarak uygulandı.

### Alet Yerleş tirme 0.012 inç lik

paslanmaz çelik tellerden imal edilen sarmal yaylardan oluşan geniş letme aparatları tüm sıçanların üst kesici dişlerine takıldı. Genleşme kuvveti 30 g'a ayarlandı ve 5 günlük genişletme periyodu boyunca tekrar aktif hale getirilmedi. Kompozit ile üst kesici dişlere yay tespit edildi (Şekil 1). 5 günlük geniş letme periyodunun ardından sarmal

yaylar, 12 gün (20) tutma fazı için kısa uzunluklarda dikdörtgen tel ile değişik tirildi.



Şekil 1. Genleşme yayının yerleştirilmesi

#### Histopatolojik Analiz Deneyi

Süresinin sonunda tüm hayvanlar hayvan etiği kurallarına uygun olarak kurban edildi. Tüm hayvanların premaksillaları disseke edildi. Pre maksilla dokuları nötral formalin ile fiksasyon edildi. Fiksasyon sonrası numuneler %10 EDTA eriyiğinde dekalfiyasyon edildi. Kireç gidermeden yaklaşık 30 gün sonra, premaksilla blok halinde kesildi, bir kesik alveolar krestte kesici kronlardan geçerek ve uzunlamasına düzleme dik, ikinci kesik birinci kesik 4 mm apikalindeydi. Tüm numuneler daha sonra kurutuldu ve sıcak eriyen parafin mumuna gömüldü. Parafin bloklar elde edildi. Tüm parafin blokları kesitlere ayrıldı (5 µm kalınlığında) ve rutin ışık mikroskopik analizi için Hema-toksin-Eozin ile boyandı.

Histopatolojik analiz, bölümlerin kimliğini bilmeyen bir çift araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Tüm gruplar, yeni kemik oluşumu, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve kılcal damar yoğunluğunu belirlemek için karşılaştırıldı. Şiddetler hafif (+, skor=1), orta (++, skor=2) veya güçlü (+++, skor=3) olarak derecelendirildi (20).

#### İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal çalışmalarında TNF-α, IL-1 ve IL-6 ekspresyonunu araştırmak için Avidin-Biyotin Kompleksi (ABC) ve İmmünoizole Streptavidin-Biotin (LSAB) boyama yöntemleri kullanıldı. Poli lizin slaytları ile premaksilla dokularında 4 µm kalınlığında kesitler.

Tüm kesitler rutin histolojik işlemlerden geçirildi. Reseptör bölgelerinin formaldehit tarafından bloke edilen dokuya belirli aralıklarla maruz bırakılması amacıyla, mikrodalgaya sitrat tamponu (pH 6.0) (Lab Vision, Fremont, ABD) uygulandı. Tüm slaytlar oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

antijen alma işlemi. 15-20 dakika yıkama aşamasından sonra %3 hidrojen peroksit uygulandı.

Spesifik olmayan bağlanmayı durdurmak için beş dakika süreyle Ultra V bloğu uygulandı (Lab Vision, Fremont, ABD). Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan oda sıcaklığında kırk beş dakika bekletildi ve anti IL-1 proteini (ab9722, abcam, UK), anti IL-6 proteinine (ab6672, abcam, UK) maruz bırakıldı. , anti TNF-α proteini (NB600-587, novus biyolojik, ABD) ve 1/100 oranında hazır olan primer antikorlar. Tüm birincil antikorlar, oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikor (Thermo Scientific, ABD) 30 dakika uygulandı, PBS ile durulandı ve 15 dakika streptavidin peroksidaz enzim (Thermo Scientific, ABD) kompleksine maruz bırakıldı. Son olarak DAB substrat kiti (ab64238) uygulanmış ve immün reaksiyonun sağlanması için yaklaşık 5-10 dakika beklenmiş tir. Mayer hematoksilin ile zıt boyama yapıldı. Tüm slaytlar entellan ile monte edildi. Daha sonra tüm kesitler Axio Scope A1 Imager Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile incelendi.

İmmünohistokimyasal elde edilen sonuçlar, aktifleştirilmiş TNF-α, IL-1 ve IL-6 (%0 - %100 hücre) içeren hücre sayısının boyama yoğunluğuyla (1=düşük, 2) çarpımından elde edilen H-skorunda özetlendi. =orta ve 3=yüksek). Tüm slaytlar, çift kör protokol (20) kullanılarak analiz edildi ve puanlandı.

#### Biyokimyasal Analiz Sıcak

serum CTX-I (C-telopeptid tip I kolajen) ve BALP (kemik alkalik fosfataz) seviyeleri, sıcak CTX-I enzim bağlantılı immüno-sorbent test kiti ve BALP enzim bağlantılı immüno-sorbent test kiti (Cusabio) kullanılarak sağlandı. Biotech Co, Ltd, Wuhan, Çin). Malondialdehit (MDA), Drapper ve Hadley'in (21) yöntemiyle belirlendi. Süperoksit dismutazın (SOD) ölçümü, ksantin ksantin oksidaz ile reaksiyona girerek 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (İÇ). SOD aktivitesi daha sonra bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçüldü (22). Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin tayini Paglia ve Valentine'in (23) metoduna göre yapılmış tir. Katalaz (CAT) aktivitesi Aebi'nin (24) yöntemine göre ölçüldü.

#### İstatistiksel Analiz BALP,

CTX-I, IL-1 H-skoru gibi sürekli değişkenlerin dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılan sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma (ortalama±sd) olarak gösterildi, normal olmayanlar için ayrıca medyan (min-maks) verildi.

histopatolojik skorlar hem sayı (n) hem de medyan (min-maks) olarak ifade edilirken, sürekli değişkenleri dağıttı.

Gruplar normal dağılım değişkenleri açısından sırasıyla tek yönlü ANOVA ve Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Heterojen varyanslara sahip değişkenler için Welch istatistiği verildi. Homojen varyanslı ve homojen varyanssız değişkenler için ikili karşılaştırılmalarında sırasıyla Bonferroni ve Games-Howel testleri kullanıldı. Grupların histopatolojik skorları post-hoc olarak ki-kare testi (lineer-lineer ilişki kontrolü) ve Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Tüm analizler sonucunda test istatistikleri ve p değerleri verildi. İstatistiksel anlamlılık olarak  $p < 0.05$  kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) tarafından yapılmıştır.

## Sonuçlar

### Biyokimyasal Bulgular

Serum BALP ve CTX-I değerleri shilajit grubunda NE grubuna göre dramatik olarak yüksekti ( $p < 0.05$ ).

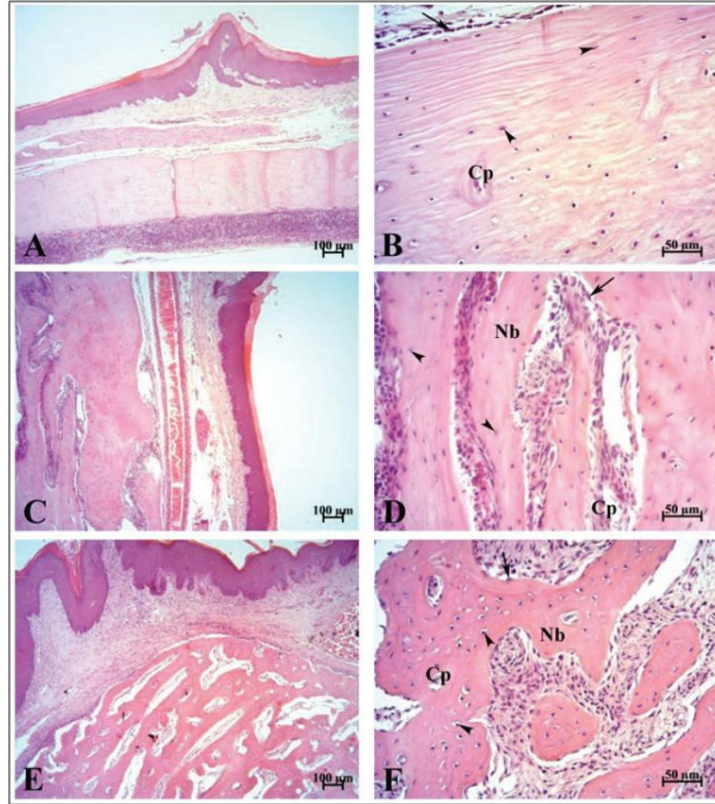
OE grubu, NE grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek CTX-I değerlerine sahipti ( $p < 0.05$ ). Shilajit grubu SOD, GSH-Px ve CAT değerlerinde OE grubuna göre artış gösterdi ( $p < 0.05$ ) MDA değerleri NE grubunda OE grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ ) (Tablo 1).

### Histopatolojik Bulgular

İnflamatuar hücre infiltrasyonu açısından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ( $p = 0.221$ ). OE grubu, NE grubuna göre anlamlı derecede daha fazla kapiller yoğunluğa sahipti ( $p = 0.049$ ) (Tablo 2 ve 3).

Gruplar yeni kemik oluşumu açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasında önemli farklılıklar bulundu ( $p = 0.001$ ). NE grubuna göre OE ve shilajit gruplarında artan yeni kemik oluşumu bulundu (Tablo 2 ve 3; Şekil 2).

Kapiller yoğunluk açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı ( $p < 0.001$ ). Sonuçlar, shilajit ve OE gruplarında kapiller yoğunlukta NE grubuna göre bir artış olduğunu gösterdi (Tablo 2 ve 3; Şekil 2).

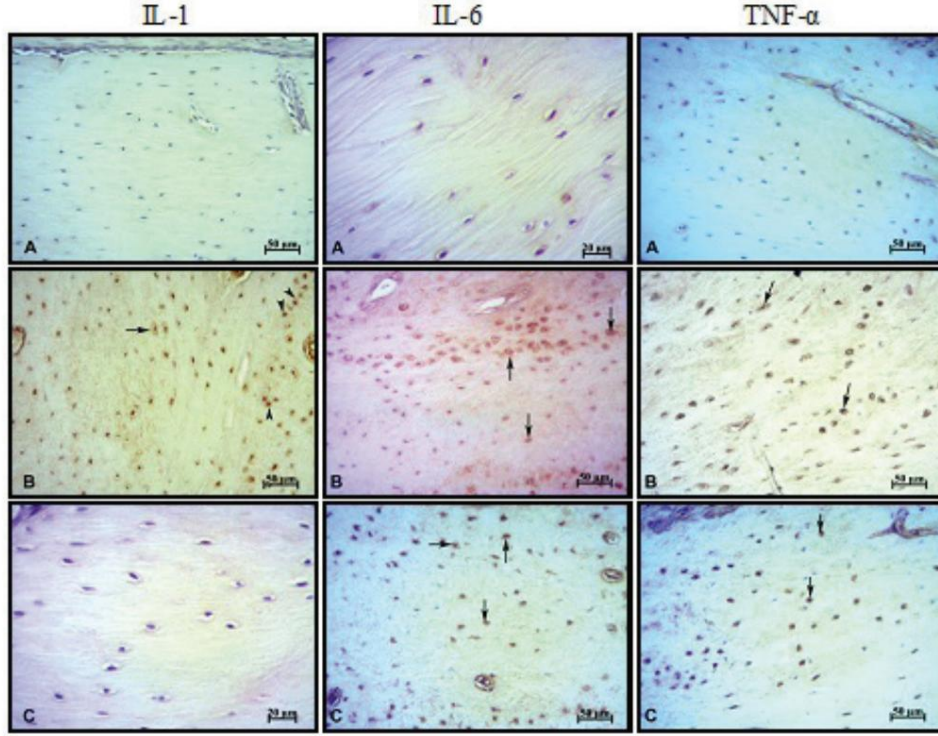


Şekil 2. Çalışma gruplarından hematoxilen ve eozin boyama fotomikrografları. AB: NE grubu, CD: OE grubu, EF: Shilajit grubu. Tedavi gruplarında artmış osteoblastik aktivite, yeni kemik ve kılcal damar oluşumu gözlemlendi.

Nb: Yeni kemik, Cp: kılcal, ok: osteoblast, ok ucu: osteosit. Öçek çubuğu; A,C,E,G,I 100 mikron, B,D,F,H,J 50 mikron.

İmmünohistokimyasal Bulgular  
İmmünohistokimyasal inceleme sonuç ları IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  skorlarının gruplar arasında önemli farklılıklar gösterdiğini gösterdi ( $p<0.001$ ).

TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 H-skorları OE grubunda diğer gruplara göre oldukça yüksek bulundu ( $p<0,05$ ) (Tablo 4; Ş ekil 3).



Ş ekil 3. Çalış ma gruplarından immünohistokimyasal boyama fotomikrograf ları.

A: NE grubu, B: OE grubu, C: Shilajit grubu. OE grubundaki yeni kemik oluş um bölgelerindeki osteositlerde hem membranöz (ok baş ları) hem de çekirdeklerde (ok baş ları) güçlü pozitif IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  immünoreaktivitesi gözlemlendi. Shilajit grubunda boyanma yoğunluğu azaldı, özellikle IL-1 (Öç ek ç ubuğu=50 $\mu$ m) aç ısından NE grubu ve shilajit grubu arasında benzerlik vardı.

Tablo 1

Shilajit'in deney süresi sonunda BALP, CTX-I, SOD, GSH-Px, CAT ve MDA seviyelerine etkisi.

	NE Grubu	OE Grubu	Shilajit Grubu	f, x2	p
BALP* (U/L)	27,73 $\pm$ 3,97* 29,65 (20,8 - 30,8)** $\pm$ 1	40,06 $\pm$ 4,55 39,20 (35,6 - 49,3)	55,39 $\pm$ 2,99 54,85 (51,1 - 59,5) $\pm$ 1	x2 =20.480	<0,001
CTX-I* (pg/mL)	261,69 $\pm$ 36,331,2	359,05 $\pm$ 23,191	372,38 $\pm$ 49,852	F $\ddagger$ =21.687	<0,001
SOD* (U/g Hb)	2616,20 $\pm$ 237,831,2	2281,59 $\pm$ 233,702,3	2961,82 $\pm$ 277,0121,3	F=14.775	<0,001
GSH-Px* (U/g Hb)	31,62 $\pm$ 1,93 31,32 (28,64 - 34,49)	26,91 $\pm$ 2,94 25,57 (24,31 - 31,33) $\pm$ 1	34,44 $\pm$ 1,50 34,44 (32,54 - 36,35) $\pm$ 1	x2 = 15.680	<0,001
KEDİ* (kU/g Hb)	10,56 $\pm$ 1,231	9,79 $\pm$ 2,082	15,39 $\pm$ 3,091,2	F $\ddagger$ =9.407	0,003
MDA* (nmol/g Hb)	182,13 $\pm$ 12,521	212,64 $\pm$ 9,641	196,29 $\pm$ 29,65	F $\ddagger$ =14.268	0,001

\* ortalama $\pm$ ss;\*\* medyan (min-maks);1,2,3p<0,05;  $\ddagger$  Welch istatistikleri

Tablo 2

Shilajit'in deneysel süresinin sonunda enflamatuar hücre infiltrasyonu, yeni kemik oluşumu ve kılcal damar yoğunluğu üzerindeki etkileri. Skorlar, o skoru temsil eden denek hayvanlarının sayısını gösterir.

	NE Grubu	OE Grubu	Shilajit Grubu	x <sup>2</sup>	p
Enflamatuar hücre infiltrasyonu				1.500	0,221
Puan 1	6	2	3		
Puan 2	0	2	3		
Puan 3	0	2	0		
Yeni kemik oluşumu				11.822	0,001
Puan 1	6	3	0		
Puan 2	0	2	1		
Puan 3	0	1	5		
kılcal yoğunluk				12.201	<0,001
Puan 1	6	3	0		
Puan 2	0	3	2		
Puan 3	0	0	4		

Tablo 3

Gruplar arasında enflamatuar hücre infiltrasyonu, yeni kemik oluşumu ve kapiller yoğunluk skorlarının ikili karşılaştırmaları.

	NE Grubu	OE Grubu	Shilajit Grubu	x <sup>2</sup>	p
Enflamatuar hücre infiltrasyonu*	1 (1-1)1	1,5 (1-3) 3 (2-3)1	1,5 (1-2) 3 (2-3)1	6.025	0,049
Yeni kemik oluşumu*	1 (1-1)1			12,183	0,002
Kılcal yoğunluk*	1 (1-1)1			12,828	0,002

\*medyan (min-maks); 1,2p<0,05

Tablo 4

Shilajit'in deney süresinin sonunda IL-1, IL-6 ve TNF-α H skor analizi üzerindeki etkileri.

	NE Grubu	OE Grubu	Shilajit Grubu	f, x <sup>2</sup>	p
IL-1 H Puanı*	108,00±3,581	270,00±6,931,2	112,50±4,282	F=1936.394	<0,001
IL-6 H Puanı*	109,17±1,83 109 (107 - 112)1	286,33±6,38 287 (278 - 294)1	131,83±6,21 134,5 (120 - 136)	x <sup>2</sup> =15.205	<0,001
TNF-α H Puanı*	106,50±1,761,2	251,67±9,992,3	124,00±4.731,3	F‡ =583.411	<0,001

\* ortalama±ss;\*\* medyan (min-maks);1,2,3p<0,05; ‡Welch istatistikleri

## Tartışma

RME maksilla ve mandibula arasındaki enine uyumsuzlukları düzeltmek için kullanılır. Midpalatal sütür yeniden şekillenmesi, geniş leme sürecinde aktif bir rol oynar, ancak geniş leme kuvveti altındaki ilgili moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Ortodontistler kemik oluşumunu artırmak ve retansiyon süresini kısaltmak için RME sırasında veya sonrasında farklı maddeler kullanmışlardır (11).

Bu tarihe kadar sıçanlarda geniş letilmiş midpalatal sütür sırasında kemiğin yeniden şekillenmesini arttırmak için farklı maddeler üzerinde çalışıldı. Öztürk ve ark. (3) geniş letilmiş midpalatal sütürde zoledronik asidin etkisini araştırmışlar ve sütür bölgesinde osteoblast sayısında ve immünreaktivitede önemli artışlar olduğunu göstermişlerdir. Rosa ve ark. (8), maksiller geniş lemeden sonra lazer veya LED fototerapinin etkinliğini incelemeyi amaçlamış ve daha yüksek kollajen ve osteoblastik jenerasyon ve daha az osteoklastik aktivite bildirmişlerdir.

Uysal ve ark. (13) inter-premaksiller sütüre lokal resveratrol enjeksiyonunu değerlendirmişler ve kemik histomorfometrik ölçümlerinin resveratrol uygulanan ratlarda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Cesur ve ark. (20) sıçan çalışması modelinde kurkumin ve melatonin kullanmışlar ve bu ajanların sistemik uygulamasının kemiğin yeniden şekillenmesini tetiklediğini ve retansiyon süresini kısaltabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışma, sıçan midpalatal sütürünün genişlemesine yanıt olarak sistemik olarak uygulanan shilajit'in kemiğin yeniden şekillenmesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Literatür bilgilerine göre çalışmamız shilajit kullanımının kemiğin yeniden modellenmesi üzerindeki etkilerini araştırmanın ilk çalışmasıdır.

Daha önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışma da deneysel maksiller geniş leme için rat modelini tercih ettik (1-15). Altan ve ark. (14), kuvvetler altında midpalatal sütürdeki değişiklikleri göstermek için sıçan ve tavşanların iyi bilinen hayvan modelleri olduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli çalışmalar oksidatif stres ile kemik metabolizması arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretiminin neden olduğu oksidatif stres, kemik metabolizması üzerinde olumsuz biyolojik etkiler gösterebilir. ROS, osteoklastları, osteoblastları, osteositleri önemli ölçüde etkiler ve kemik rezorpsiyonunda rol oynar. Ayrıca osteoblastlar, ROS'a karşı koruma sağlamak için glutatyon peroksidaz gibi antioksidanlar üretirler (11,15,25).

Shilajit, antioksidan, immün modüle edici ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle son zamanlarda ilgi gören çok bileşenli doğal bir mineral maddedir (16,18). Wilson ve ark. (18) bildirildi

intraperitoneal shilajit uygulamasının SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde bir artışa neden olduğu. Bu çalışmada, GSH-Px, SOD ve CAT seviyeleri, OE grubuna göre shilajit grubunda birlikte önemli ölçüde yükseldi.

Jung ve ark. (26), shilajitin mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasının güçlü bir uyarıcısı ve osteoklastogenezin inhibitörü olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmaları, ALP aktivitesi gibi osteoblastik belirteçlerin seviyelerinin, shilajitin osteoblastik farklılaşma üzerindeki etkisinin, osteojenik orta uyarıcı etkinin %35 ila %90'ı arasında değiştiğini göstermişlerdir. CTX, osteoklastik aktivitenin biyokimyasal bir göstergesidir ve kemik rezorpsiyon düzeyini değerlendirmek için kullanılır (27).

Bu çalışma, artmış CTX-1 seviyeleri, kemik döngüsünün hızlanması ile ilişkili olabilir. Shilajit grubundaki yüksek BALP seviyeleri, mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını ve kemik oluşumunu artırdığını gösterdi.

Proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNF-α gibi) osteoklast prekürsörlerinin farklılaşmasına ve osteoklast aktivitesinin farklılaşmasına yol açarak kemik erimesine yol açar (28). Çalışmamızda OE grubuna göre IL-1, IL-6 ve TNF-α H skorları shilajit grubunda azalmıştır. Shilajit, reaktif oksijen türleri üretimini ve bu sitokinlerin seviyesini azaltmıştır.

Shilajit'in inflamatuvar hücre infiltratı, yeni kemik oluşumu ve kılcal damar yoğunluğu üzerindeki etkisi histopatolojik olarak incelenmiştir. Shilajit grubunda OE grubuna göre yeni kemik oluşumu miktarı ve kılcal damar yoğunluğu arttı. Bu sonuçlar, antioksidanların kullanıldığı ve kemik oluşumunda artış olduğunu saptayan başka araştırmalarla da uyumludur (1,14,15,25). Önceki çalışmaların aksine (14,15) çalışmamızda gruplar arasında inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından anlamlı bir fark yoktu. Sonuçlardaki bu fark, shilajitin, ROS tarafından ortaya çıkan bir osteoblast farklılaşma belirteci olan nükleer faktör (NF)-kappaB'yi önlemekten ve dolayısıyla enflamasyonu azaltmaktan sorumlu olabileceği gerçeğiyle açıklanabilir.

Çalışmamız, ortopedik olarak geniş letilmiş midpalatal sütür sırasında shilajit uygulamasının kemik rejenerasyonunu uyardığını, inflamasyonu azalttığını ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını ortaya koydu. Ayrıca RME tedavilerinden sonra retansiyon süresinin kısaltılması ve nüksün önlenmesinde faydalı olabilir. İnsanlar üzerindeki etkilerini netleştirmek ve ayrıca profilaktik olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç vardır.

Finansman kaynağı, finansal açıklamalar: Yoktur.  
Çıkar çatışması: Yazarlar bu çalışmada mayla ilgili herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemiş tir.

## Referanslar

- Ozan F, Çorekçi B, Toptaş O, Halicioğlu K, İrgin C, Yılmaz F, et al. Sıçanlarda hızlı maksiller geniş lemede yeni kemik oluşumuna Arı Sütü'nün etkisi. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2015;20:651-6.
- Zhao S, Wang X, Li N, Chen Y, Su Y, Zhang J. Hızlı maksiller geniş lemeden sonra orta damak dikiş inde stronsiyum ranelatin kemik oluşumu üzerindeki etkileri. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:2725-34.
- Öztürk F, Babacan H, İnan S, Gümüş C. Effects of bisphosphonates on sutural boneformation and relaps: A histological and immunohistochemical study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;140:31-41.
- Farhadian N, Miresmaeili AR, Zargaran M, Moghimbeigi A, Soheilifar S. Diyet askorbik asidin farelerde genişleyen midpalatal sütür osteogenezisi üzerindeki etkisi. *J Dent (Tehran)* 2015;12:39-48.
- Da Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Stuani AS, Rosa AL, et al. Hızlı maksiller geniş lemeden sonra düşük seviyeli lazer tedavisinin osteoblastik hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması üzerine etkisi. *Lasers Med Sci* 2012;27:777-83.
- Aras MH, Bozdağ Z, Demir T, Oksayan R, Yanık S, Sökücü O. Düşük seviyeli lazer tedavisinin, ovariektomi uygulanmış bir sıçan modelinde genişletilmiş premaxiller sütürdeki enflamasyondaki ve osteoblastların aktivitesindeki değişimlikler üzerindeki etkileri. *Fotomed Laser Cerrahi* 2015;33:136-44.
- Amini F, Najaf Abadi MP, Mollaei M. Sıçanlarda hızlı damak genişlemesiyle eş zamanlı olarak midpalatal sütürde lazer ışınlamasının kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. *J Orthod Sci* 2015;4:65-71.
- Rosa CB, Habib FA, de Araújo TM, Dos Santos JN, Cangussu MC, Barbosa AF, et al. Hızlı maksilla genişlemesinden sonra midpalatal sütürde lazer ve LED fototerapi: Raman ve histolojik analiz. *Lasers Med Sci* 2017;32:263-74.
- Ekizer A, Yalvaç ME, Uysal T, Sönmez MF, Şahin F. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, sıçanlarda ortodontik olarak genişletilmiş üst çenede kemik oluşumunu artırır. *Açık Ortodonti* 2015;85:394-9.
- Toy E, Öztürk F, Altındiş S, Kozacioğlu S, Toy H. Effects of low-intensity pulsed ultrason on the boneformation after the expansion of inter-premaxiller sutur in rats: a histological and immunohistochemical study. *Aust Orthod J*, 2014;30:176-83.
- Birlik M, Babacan H, Cevit R, Gürler B. Sıçanlarda ortopedik olarak genişletilmiş sütürde seks steroidlerinin kemik oluşumuna etkisi: İmmünohistokimyasal ve bilgisayarlı tomografi çalışması. *J Orafac Orthop* 2016;77:94-103.
- Sadıkoglu TB, Nalbantgil D, Ulkur F, Ulaş N. Sıçanlarda genişletilmiş interpremaxiller sütürde hyaluronik asidin kemik oluşumuna etkisi. *Ortod Craniofac Res* 2016;1:154-61.
- Uysal T, Görgülü S, Yağcı A, Karslıoğlu Y, Günhan O, Sağdıç D. Resveratrol'ün genişletilmiş ter-premaxiller sütürde kemik oluşumu üzerindeki etkisi: erken kemik gelişimlikleri. *Orthod Craniofac Res* 2011;14:80-7.
- Altan BA, Kara İM, Nalçacı R, Ozan F, Erdoğan SM, Özkut MM, et al. Sistemik propolis, genişletilmiş sütürde yeni kemik oluşumunu uyarır: histomorfometrik bir çalışma. *Açık Ortodonti* 2013;83:286-91.
- Kara Mİ, Altan AB, Sezer U, Erdoğan MŞ, İnan S, Özkut M, et al. Ginkgo biloba'nın deneysel hızlı maksiller genişleme modeli üzerindeki etkileri: histomorfometrik bir çalışma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114:712-8.
- Keçeci M, Akpolat M, Güllü K, Gencer E, Şahbaz A. Şilajit'in yumurtalıklarda radyasyona bağlı apoptosis üzerindeki önleyici etkisinin değerlendirilmesi. *Arch Gynecol Obstet* 2016;293:1255-62.
- Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shi lajiti: bir inceleme. *Fitother Res* 2007;21:401-5.
- Wilson E, Rajamanickam GV, Dubey GP, Klose P, Musial F, Saha FJ, et al. Geleneksel Hint yemeklerinde kullanılan shilajit hakkında bir inceleme. *J Ethnopharmacol* 2011;136:1-9.
- Stohs SJ. Shilajit'in (mumie, moomiyo) güvenliği ve etkinliği. *Fitoter Res* 2014;28:475-9.
- Cesur MG, Güllü K, Şirin FB, Akpolat M, Ögrenim M, Alkan A, et al. Sıçanlarda ortopedik olarak genişletilmiş sütürde kurkumin ve melatoninin kemik oluşumu üzerindeki etkileri: Biyokimyasal, histolojik ve immünohistokimyasal bir çalışmadır. *Ortod Craniofac Res* 2018;21:160-7.
- Draper HH, Hadley M. Lipid peroksidasyon indeksi olarak malondialdehit tayini. *Yöntemler Enzymol* 1996;186:421-31.
- Wooliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Çeşitli koyun melezlerinde kandaki glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde ve bakır konsantrasyonunda değişimlik. *Res Vet Sci* 1983;34:69-77.
- Paglia DE, Valentine WN. Eritrosit glutatyon peroksidazın kantitatif ve kalitatif karakterizasyonu üzerine çalışmalar. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
- Aebi H. İn vitro katalaz. *Yöntemler Enzymol* 1984;105:121-6.
- İrgin C, Çorekçi B, Ozan F, Halicioğlu K, Toptaş O, Birinci Yıldırım A, et al. İsrırgan otu (*Urtica dioica*) genişletilmiş inter-premaxiller sütürde kemik oluşumuna etkisi var mı? *Arch Oral Biol* 2016;69:13-8.
- Jung CR, Schepetkin IA, Woo SB, Khlebnikov AI, Kwon BS. Mezenkimal kök hücrelerin muhtemelen osteoblastik farklılaşması. *Drug Dev Res* 2002;57:122-33.
- Lee CY, Suzuki JB. Kemik metabolizmasının CTX biyokimyasal belirteci. Ameliyattan sonra çenelerin bisfosfonatla ilişkili osteonekrozunun güvenilir bir göstergesi midir? Bölüm II: prospektif bir klinik çalışmadır. *Diş İmplantı* 2010;19:29-38.
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oksijenden türetilen serbest radikaller, in vitro ve in vivo olarak kemirgen kemiğinde osteoklastik kemik rezorpsiyonunu uyarır. *J Clin Invest* 1990;85:632-9.