



ISSN:1307-9972

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/duvetfd>

Araştırma Makalesi/Research Article

Dicle Üniv Vet Fak Derg 2020;13(2):149-156

DOI: 10.47027/duvetfd.815371

e-ISSN:1308-0679



Tavşanlarda Tarantula Cubensis Ekstraktı ve Düşük Enerjili Lazer Uygulanan Deneysel Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Osteonektin ve Osteokalsinin Etkilerinin Araştırılması

Semih ALTAN^{1,a,✉}, Hakan SAĞSÖZ^{2,b}

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

²Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0003-3158-3678; ^bORCID: 0000-0002-5456-697X

Geliş Tarihi/Received
23.10.2020

Kabul Tarihi/Accepted
16.12.2020

Yayın Tarihi/Published
31.12.2020

Öz

Kemik dokunun yeniden şekillenmesi, döngüsel ve uzun bir süreç olarak tanımlanır. Bu dinamiklerin sadece biyolojik bir süreç tarafından tetiklenmediği, aynı zamanda biyokimyasal, elektriksel ve mekanik uyarıların kemik dokusunun devamlılığının sağlanmasında anahtar faktörler olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmada, Düşük Enerjili Lazer (DEL) ve T. Cubensis Ekstraktı (TCE) uygulamalarının kemik onarımını destekleyebileceği hipotezinden yola çıkarak, kemik iyileşmesi ve mineralizasyonun belirteçlerinden olan Osteokalsin (OC) ve Osteonektin (ON) ekspresyon yoğunlukları üzerindeki etkilerinin ortaya koyulması amaçlandı. Çalışmada Dicle Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesinden temin edilen toplam 54 adet 6-8 aylık Yeni Zelanda ırkı erkek tavşan (2.5-3 kg) kullanıldı. Tavşanlar operasyon sonrası her bir grupta 18 adet olacak şekilde 3 ana uygulama grubuna ayrıldı. Operasyon sonrası DEL ve TCE kemik defekti oluşturulan bölgeye uygulandı. Tavşanlarda defekt oluşturulan kemik dokudan elde edilen kesitlerde OC ve ON'nin defekt bölgesindeki lokalizasyonlarını ve ekspresyonlarını belirlemek için immunohistokimyasal yöntem uygulandı. Kortikal ve spongiyöz kemiklerde sekonder kemik oluşumuna paralel olarak OC ve ON ekspresyonlarının değişkenlik gösterdiği belirlendi. OC ekspresyonunun DEL ve TCE gruplarında, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. Kontrol grubunda 7, 21 ve 28 günlerde ON ekspresyonlarının nispeten zayıf ve benzer olduğu, buna karşın DEL ve TCE gruplarında uygulamaların 7. ve 21. günlerde ON ekspresyonunun nispeten zayıf, 28. günde ise ON ekspresyonunun yüksek olduğu dikkati çekti. Sonuç olarak, tavşan kemik defekti modelinde düşük enerjili lazer ve t. cubensis uygulamalarının kemik iyileşmesi sırasında OC ve ON ekspresyonlarını artırdığı ve uygulama günlerine göre OC ve ON ekspresyonlarındaki kademeli artışın erken kemik iyileşmesinin desteklenmesinde önemli potansiyellere sahip olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik defekti, düşük enerjili lazer, tarantula cubensis ekstraktı, osteonektin, osteokalsin

Investigation of the Effects of Osteonectin and Osteocalcin on the Healing of Experimental Bone Defects Applied with Tarantula Cubensis Extract and Low Level Energy Laser in Rabbits

Abstract

The remodeling of bone tissue is characterized as a cyclic and lengthy process. It is accepted that these dynamics are not triggered by a biological process, but also that biochemical, electrical and mechanical stimuli are key factors in maintaining the continuity of bone tissue. In this study, we aimed to demonstrate the effects of low-level laser (DEL) and T. cubensis extract (TCE) applications on the expression intensities of Osteocalcin (OC) and Osteonectin (ON), which are markers of bone healing and mineralization, based on the hypothesis that they can support bone repair. A total of 54 6-8-month-old male rabbits (2.5-3 kg) obtained from Dicle University Experimental Animal Unit were used in the study. The rabbits were divided into 3 main treatment groups, 18 in each group after the operation. After the operation, DEL and TCE were applied to the area where the bone defect was created. An immunohistochemically method was applied to determine the localizations and expressions of OC and ON in the defect area in the sections obtained from the defected bone tissue in rabbits. It was determined that OC and ON expressions varied in parallel with secondary bone formation in cortical and cancellous bones. OC expression was found to be higher in DEL and TCE groups than control group. It was noticed that ON expressions were relatively weak and similar on days 7, 21 and 28 in the control group, whereas in DEL and TCE groups, ON expression was relatively weak on the 7th and 21st days and ON expression was high on the 28th day. In conclusion, it has been shown that low level laser and T. Cubensis application increase OC and ON expressions during bone healing in the rabbit bone defect model and gradual increase in OC and ON expressions according to the application days may have important potentials in supporting early bone healing.

Key Words: Bone defect, low level laser, tarantula cubensis extract, osteonectin, osteocalcin

GİRİŞ

Kemik doku, canlıda kaslar ve tendonlar için bir bağlantı noktası olması yanında iç organları koruma, destekleme ve

mineral kaynağı olarak da fonksiyon gösteren kompleks ve dinamik vasküler mineralize bir yapıdır (1). Metabolik olarak dinamik hücrelerden oluşan ve biyolojik yönden aktif olan kemik dokuda, defektlerin iyileşmesine çok sayıda

biyokimyasal, biyomekanik, hücrel, hormonal ve patolojik süreç etki eder. Bundan dolayı da, kemik dokudaki kırık veya defekt sonrası oluşan onarım, rezorpsiyon ve yeniden şekillenme süreçleri devamlılık arz eder (2).

Kemiğin içinde veya üzerinde bulunan ve yeni kemikle dolması gereken bölgeler olarak tanımlanan kemik defektleri, kemik dokusunun kendini rejenere etme ve yeniden şekillendirme özelliği ile iyileşmektedir (3). Bu defektlerin rejeneratif tedavisinde de genellikle kemik greftleri, alloplastik materyaller, büyüme faktörleri, LAZER uygulamaları ile çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Kemik greftleri, kemik iyileşmesinin hızlandırılmasında yaygın bir şekilde kullanılmasına karşın, kaynakların sınırlı olması ve donör bölge morbiditesi gibi komplikasyonlardan dolayı problem olmaktadır (4-7). Günümüzde kemik defektlerinin tedavisinde kemik greftlerine alternatif seçenekler üzerine yoğunlaşmıştır.

Son yıllarda lazerle biyostimulasyon uygulaması kemik defektlerinde iyileşmeyi uyarmak amacıyla tek başına ya da kombine olarak uygulanmaktadır (8-10). Birçok araştırmacı klinik ve deneysel çalışmalarında lazer uygulamasının kemik rejenerasyonuna pozitif etkisinden bahsetmiştir (11-13). Düşük enerjili lazer (DEL) uygulamalarının osteoblastik hücre sayı ve aktivitesine etki ederek kemik rejenerasyonunu uyardığı ortaya konulmuştur (13-16). Osteoblast hücre kültürlerinde, DEL uygulamasının çoğalma, farklılaşma ve kalsifikasyon sürecini etkilediği belirlenmiştir (16). Ayrıca, kemik kırık ve defektlerinin iyileşmesinde, kemik bütünlüğünün sağlanmasında ve alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinde pozitif etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir. Ancak, DEL uygulamasının kemik üzerindeki etki mekanizması tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Lazer uygulamalarının mRNA sentezini osteoblastik farklılaşma markerlarından osteopontin, osteokalsin, osteonektin ve kemik sialoproteinlerinin salgılanması yönünde uyardığı ve osteoblastlarda mineralize kemik oluşumunu artırdığı belirlenmiştir (11-13).

Benzerlik kanununa dayanan tıbbi bir yöntem olan homeopati, "benzer şeyler benzerleriyle tedavi edilebilir" savına dayanan vücudun kendi kendini tedavi edici yanıtlarının uyarılmasıyla iyileşmenin sağlandığı doğal bir tedavi şeklidir. Veteriner hekimlikte kemik kırıkları, alerjik olaylar, yumuşak doku yaralanmaları, eklem-kas yangıları ve ağrıları, düz kas spazmları, karaciğer yağlanması, kalp yetmezliği gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (17). Homeopatik ilaçlar, küçük tabletler ya da likit formlarda olduğu için uygulaması kolaydır (18). Özellikle, saha ortamında kullanılan homeopatik ilaçların akut travma olaylarında başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (17). Karakafes otu ekstraktının kırıkların iyileşmesini hızlandırdığı ve karakafes otundan ekstre edilen symphytumun kırık tedavisine iyi geldiği bildirilmiştir (19). Alkolde masere edildikten sonra Alman Homeopatik Farmakopesine göre potensiyasyonu yapılan ve enjektabl bir ilaç olan Tarantula cubensis ekstraktı (TCE), Tarantula cubensis örümceğinden elde edilen Tarantula cubensis özütünün alkolde çözdürülmüş formudur ve bu ekstrakt son yıllarda birçok çalışmada kullanılmaktadır. TCE'nin ineklerde doğumdan sonra deri altı yolla uygulamasının, postpartum dönemdeki ineklerde retensiyon sekondinarum insidansını azalttığı ve uterus involusyonunu hızlandırdığı saptanmıştır (20). Köpek meme

tümörlerinde, deri altı yolla enjekte edilen TCE'nin malign tümörlerde sertleşme, benign tümörlerde ise hem sertleşme hem de regresyon oluşturduğu ortaya konulmuştur (17). Ayrıca deri altı yolla enjekte edilen TCE'nin hücre proliferasyonunu azalttığı ve kanser hücrelerinde apoptozisi artırdığı tespit edilmiştir (21). Yapılan literatür taramalarında kemik kırık ya da defektlerinde TCE'nin kullanımına ilişkin sınırlı sayıda çalışmanın olduğu tespit edilmiştir (21-24).

Osteonektin (ON) ve osteokalsin (OC), çoğunlukla osteoblastlar tarafından sentezlenen ve osteoblast farklılaşması ve mineralizasyon sürecinde salgılanan kollajen olmayan hücre dışı matriks proteinleridir (25-28). ON, mineralize kemik matriksinde en bol bulunan kollajen olmayan asidik proteindir ve sistein (SPARC) ya da bazal membran proteini 40 (BM-40) açısından zengindir (27). ON'nin hem hidroksiapatite hem de kollajene seçici olarak bağlandığı ve kemikteki mineraller ile kollajen fazlarını birbirine bağladığı ve muhtemelen normal iskelet dokusunda aktif mineralizasyonu başlattığı ifade edilmiştir (25). OC ise, çoğunlukla hidroksiapatitlere bağlanarak kemik matriksine dahil olur ve serum konsantrasyonu, histomorfometrik indeksleri ile ilişkili olarak kemik oluşumu için hassas bir belirteçtir (25,26,28). OC, kolajen tabakasında bulunan osteositlerin kalsifikasyonu ile gerçekleştirilen kemik oluşumundaki mineralizasyon sürecini gösterir (25). OC, kolajen fibril organizasyonunu destekleyerek ve hidroksiapatite moleküllerini stabilize ederek yeni oluşan kemik yapılarının korunmasına katkıda bulunur (25, 26,28).

1960 yılından beri deney hayvanları birçok hayvan modeli çalışmaları için aktif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sosyal hayvan olmaları, grup halinde yaşayabilme özellikleri ve üretimindeki kolaylıklardan dolayı tavşanlar, biyomateriyal testleri, enfeksiyon veya gen terapisi çalışmaları dahil olmak üzere kas-iskelet araştırması gibi çeşitli biyomedikal araştırma uygulamaları için in vivo model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (29). Sunulan çalışmada, deneysel olarak tavşan tibiasının kortikal ve spongiyöz kemik bölgelelerinde oluşturulan defekt modeli sonrası bölgeye tek başına DEL ve TCE uygulamalarının yapılması sonrasında yeni kemik oluşumunun biyolojisini değerlendirmek için, kemik iyileşmesi ve mineralizasyonunun belirteçlerinden olan OC ve ON ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak gösterilmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Uygulamada Kullanılan Hayvanlar

Çalışmada Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen toplam 54 adet 6-8 aylık Yeni Zelanda erkek tavşan (2.5-3 kg) kullanıldı. Hayvanların çalışmaya dahil edilebilme kriteri olarak sağlıklı ve ergin olmaları yanında operasyon sonrasında olası patolojik kırıkların oluşmaması için tibiyal diafiz çaplarının (TDÇ) 5,5-6.8 mm olmasına dikkat edildi (30). Bu amaçla tavşanların operasyondan önce radyografileri alınarak tibial diafiz çapları belirlendi ve TDÇ'si 5,5-6.8 mm arasında olan tavşanlar çalışmaya dahil edildi. Tavşanlar, ortam koşullarına uyum sağlamak için 7 gün boyunca deney hayvanları ünitesinde bekletildikten sonra çalışmaya başlandı. Çalışma süresince, oda sıcaklığı ve nem oranı sırasıyla

20 ± 2 ° C ve %50 ± 20 olan, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda, bireysel kafeslerde tutuldu. Standart pellet yem ve musluk suyu şişelerden ad libitum olarak verildi. Deney süresince hayvanların gereksiz stres ve rahatsızlıklarını önlemek için özen gösterildi. Çalışma Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının 13.04.2016 tarih ve 8'nolu onayıyla yapıldı.

Deney Grupları

Tavşanlar operasyon sonrası her bir grupta 18 adet olacak şekilde 3 ana uygulama grubuna ayrıldı. Daha sonra her bir uygulama grubu da kendi içerisinde gözlem uzunluğu ve tedavi süreleri dikkate alınarak 7, 21 ve 28 günlük (n:6) olacak şekilde DEL, TCE ve Kontrol olarak üç alt gruba ayrıldı. Operasyondan sonra gruplara ayrılan her bir tavşana aşağıda belirtilen uygulamalar belirtilen süreler boyunca yapıldı.

DEL Grubu (n:18); DEL [Galium-aliminum-arsenide-(Ga-Al-As) laser 820 nm dalga boyunda ve 4 J/cm², 5dk/gün, Chattanooga Intellect-USA] postoperatif 4. günde başlayarak 4 hafta boyunca (31) her gün aynı saatlerde aynı kişi tarafından (S.A.) tavşanların tibial defekt oluşturulan bölgesini alacak şekilde probun 5 dk boyunca temas etmesi şeklinde uygulandı.

TCE Grubu (n:18); Tavşanlara tarantula cubensis ekstraktı (Theranekron, Richter-Pharma AG, Wels, Austria) 1µg/kg dozunda subkutan (SC) olarak postoperatif 3. günde başlamak üzere 7., 10. ve 15. günlerde uygulandı (32).

Kontrol Grubu (n: 18); Tavşanlara operasyondan sonra sadece bir defa SC serum fizyolojik uygulandı ve bu tavşanlar kontrol grubu olarak kullanıldı.

Anestezi ve Operasyon Prosedürü

Operasyon öncesi tavşanlar ksilazin (10 mg/kg, IM, Rompun, Bayer, İstanbul) ve butarfanol (0,3 mg/kg, İV, Butomidol, Sanoval, İstanbul) premedikasyonunu takiben ketamin (50 mg/kg, IM, Ketamol, İnterhas, İstanbul) ile genel anesteziye alındı. Her bir tavşanda; sağ tibia traş edildikten sonra opere edilecek ekstremitelere aşağıda kalacak şekilde sağ laterale doğru yatırıldı. Tibianın medial yüzünden 4 cm'lik bir deri enizyonunu takiben derialtı bağ dokusu ve kaslar küt olarak disseke edildikten sonra tibia açığa çıkarıldı. Tibia üzerinde 3,5 mm çapında bir drill ile biri tibianın orta diafizinde (kortikal) diğeri ise proksimal metafizinde (spongiyöz olmak üzere unikortikal kemik defekti oluşturuldu. Defekt oluşturma esnasında olası bir kemik nekrozuna yol açmamak için drill ile delme işlemi yavaş bir devirde ve serum fizyolojik irigasyonu eşliğinde yapıldı (33). Defekt oluşturulduktan sonra bölgedeki kemik kırıntıları serum fizyolojik ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Bunu takiben kaslar emilebilen, deri ise emilemeyen 3-0 dikiş iplikleri ile kapatıldı. Bütün tavşanlara olası enfeksiyonların önlenmesi amacıyla 5 gün süre ile 400.000 IU prokain penisilin (Procain Pen 400.000, Tümekep İlaç, İstanbul) ile postoperatif analjezik olarak da karprofen (1,5 mg/kg/gün, SC, Rimadyl, Zoetis, İstanbul) 2 gün boyunca uygulandı. Oluşturulan defektler tibia korteksinin sadece bir yüzünde olduğu için tavşanlarda yürüme ile ilgili herhangi bir problem oluşması beklenmediği için ilgili ekstremitelere herhangi bir destekli bandaj uygulanmadı. Tavşanlar günlük

kontrol ve pansumana tabi tutuldu ve 7-10. günlerde deri dikişleri uzaklaştırıldı.

Histolojik Analiz

Tavşanlar 7, 21 ve 28. günlerde yüksek doz anestezi (Pentotal sodyum, 50 mg/kg, Ekipental 0,5 g, Tümekep İlaç, İstanbul) ve muskülorelaksan (Pancuronium, 1 mg/kg, Pavulon, Organon, İstanbul) uygulanarak ötenazi edildikten sonra defekt oluşturulan tibiaları total olarak çıkarıldı. Bu tibialar makroskopik değerlendirmeler için fotoğraflandı ve ayrıca immunohistokimyasal değerlendirmeler için 48 saat boyunca %10'luk fosfat buffer formol solüsyonunda tespit edildi. Tespit işlemi takiben kemik doku etüvde 37C de %5'lik EDTA solüsyonunda 4 hafta süre ile dekalsifiye edildi. Dokularda dekalsifikasyonun tamamlanıp tamamlanmadığını doğrulamak için 5 % ammonium hydroxide ile 5 % ammonium oxalate (1:1 oranında) kullandı. Bu işlem sonrasında defekt bölgelerinden örnekler alındı. Alınan örnekler akarsuda yıkandı, dereceli alkollerden geçirildi, metil benzoat ve benzolde parlatıldı ve parafine bloklandı. Hazırlanan bloklardan immunohistokimyasal incelemeler için 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı.

İmmunohistokimyasal Boyama

Tavşanlarda defekt oluşturulan kemik dokudan elde edilen kesitlerde osteokalsin ve osteonektinin defekt bölgesindeki lokalizasyonlarını ve ekspresyonlarını belirlemek için strepavidin peroksidaz yöntemi uygulandı.

Parafin kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalandı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler metil alkolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 30 dakika muamele edildikten sonra 0.01M Fosfat Buffer Saline (PBS)'de 3X5 dk yıkandı. Nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler bloking serumunda (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) 15 dakika bekletildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanarak, osteokalsine (Santa Cruz Biotechnology, sc30044) ve osteonektine karşı tavşan poliklonal (Santa Cruz Biotechnology, sc-25574) primer antikoları ile +4°C'de 1 gece süresince inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 0.01M PBS'te 3X5 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder anti-kor (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) ile 20 dakika nem kamerasında, oda ısısında inkübe edilip tekrar 3X5 kez PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra kesitler enzim konjugatlı strepavidinde (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) 20 dakika muamele edildi. Kesitler, tekrar 3X5 kez PBS ile yıkandıktan sonra DAB kromojen solüsyonlarında 5-15 dakika bekletildi. Mayer's hematoksilende 2 dakika süreyle zıt boyama yapılan kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı. DAB kromojen solüsyonu kullanılan kesitler alkolden geçirilerek ksilolde parlatıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Negatif kontroller için, primer anti-kor yerine PBS kullanıldı. Tüm kesitler aynı protokole göre muamele gördü.

Boyamalar sonrası preparatlar, Nikon-Eclipse 400 DSRI Nikon dijital fotoğraf makinesi (NIS Elements Imaging Software-version 3.10) ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

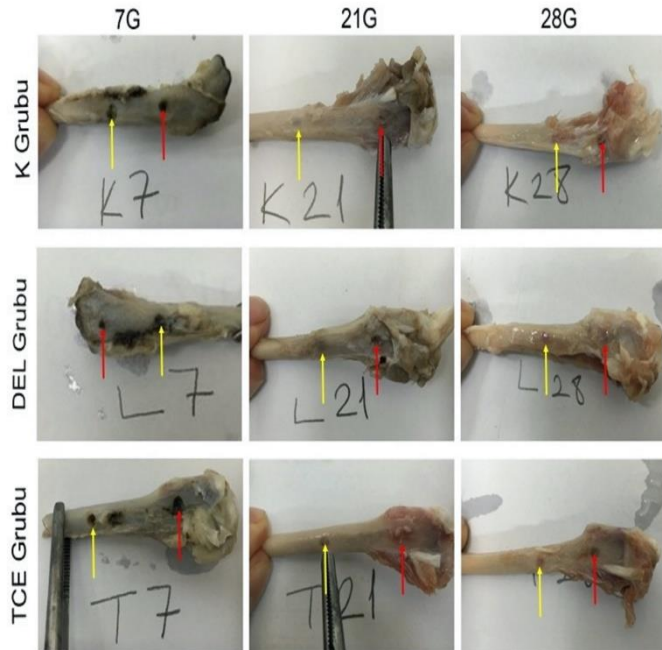
İmmunohistokimyasal Boyanma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kemik defektlerinin immunohistokimyasal bulgularının değerlendirilmesi, osteokalsin ve osteonektin ekspresyonları için pozitif reaksiyon gösteren hücrelerde yarı kantitatif olarak yapıldı. Pozitif hücreler boyanma yoğunluklarına göre dört seviyede skorlandı: boyanma yok (-), zayıf boyanma (+), orta düzeyde boyanma (++) ve güçlü boyanma (+++) (26). Pozitif boyanan hücrelerin değerlendirmeleri aynı iki kör araştırmacı (H.S. ve S.A.) tarafından yapıldı ve ortalama skorlar hesaplandı. Kemik kesitlerinde osteokalsin ve osteonektinin ekspresyonları X100, X200 ve X400 objektif büyütmede yapıldı. Şekillendirilen defektin her bir bölgesinde, her bir kesit için üç rastgele seçilmiş alan değerlendirildi. Sonuç olarak; bütün gruplarda kemik defektin bulunduğu bölgedeki osteoblastlar, fibrotik doku ve yeni şekillen kemik doku (osteoid) ayrı ayrı değerlendirildi ve sunuldu.

BULGULAR

Defekt Bölgesinin Makroskopik Bulguları

Hem kortikal hem de spongiyöz kemik dokuda, tüm gruplarda kemik defekti şekillendirildikten sonraki 7. günde defekt bölgesinde fibrotik doku formasyonu şekillenmemişti. Kontrol grubunda, 21. günde taşkın bir fibrotik doku formasyonu defekt bölgesini tamamen örtmüştü. 28. günde ise defekt bölgesinde onarım gerçekleşmişti ancak onarım bölgesi ve bağlandığı kemik doku arasında belirgin bir sınır hattı mevcuttu. Kontrol grubunun aksine, DEL ve TCE uygulanan gruplarda 21 ve 28. günlerde kemik oluşumu şekillenmişti ve defekt bölgesi ve bağlandığı kemik doku arasında sınır belirgin değildi (Şekil 1).



Şekil 1. Kompakt ve spongiyöz kemik kesitlerinin kontrol, DEL ve TCE gruplarında uygulamaların 7, 21 ve 28 günlerde fibrotik doku ve fibrotik kapsül ile yeni şekillenen kemik dokunun görünümü. Sarı ok; kortikal defekt bölgesi, Kırmızı ok; spongiyöz defekt bölgesi.

İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal olarak değerlendirilen parametrelere ait skorlama verileri Tablo 1'de sunulmuştur.

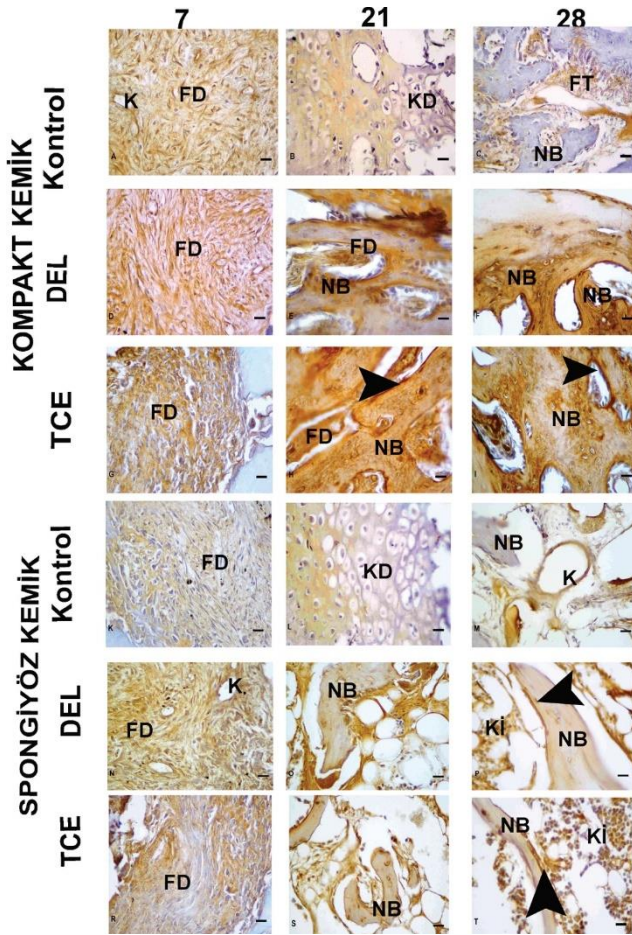
Tablo 1. Tavşan tibiasında oluşturulan defekt bölgesinde osteokalsin ve osteonektin ekspresyonlarının semikuantitatif değerlendirilmesi

Gruplar	Kemik Doku	Parametreler	7. gün		21. gün		28. gün	
			OB	FD	OB	NB	OB	NB
Kontrol	Kortikal	OC	+	++	+	+	+	+
		ON	+	+	+	+	+	+
	Spongiyöz	OC	+	++	+	+	+	+
		ON	+	+	+	+	+	+
DEL	Kortikal	OC	++	++	+++	+++	+++	+++
		ON	++	++	++	++	+++	+++
	Spongiyöz	OC	++	++	+++	+++	+++	+++
		ON	++	++	++	++	+++	+++
TCE	Kortikal	OC	++	++	+++	+++	+++	+++
		ON	++	++	++	++	+++	+++
	Spongiyöz	OC	++	++	+++	+++	+++	+++
		ON	++	++	++	++	+++	+++

Boyama yok (-), zayıf boyanma (+), orta düzeyde boyanma (++) ve güçlü boyanma (+++). **DEL**; Düşük enerjili lazer uygulanan grup, **TCE**; T. cubensis uygulanan grup, **OC**; osteokalsin, **ON**; osteonektin, **OB**; osteoblast, **FD**; fibrotik doku, **NB**; yeni şekillenen kemik doku (osteoid).

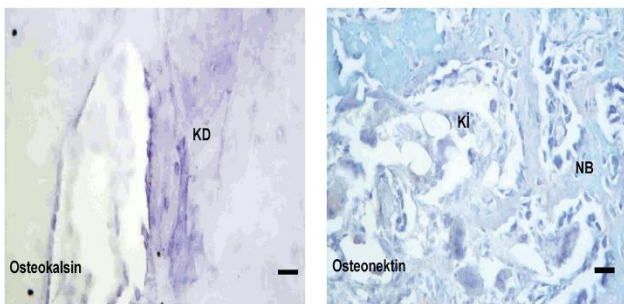
Osteokalsin; Kortikal ve spongiyöz kemiklerde sekonder kemik oluşumuna paralel olarak osteokalsin ekspresyonunun arttığı görüldü. Özellikle, kontrol, DEL ve TCE gruplarında osteokalsin ekspresyonlarının farklılıklar gösterdiği dikkati çekti. Osteokalsin ekspresyonunun DEL ve TCE gruplarında, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptandı. DEL ve TCE gruplarında uygulamanın 7. gününden itibaren osteokalsin ekspresyonun kademeli olarak arttığı, buna karşın kontrol grubunda ise uygulamanın her üç döneminde de ekspresyonların nisbeten benzer olduğu belirlendi. Hem kortikal hem de spongiyöz kemikte her üç grupta uygulamanın 7. gününde defekt bölgesinde bazı yangı hücrelerinin, kollajen ipliklerin ve fibroblastların osteokalsin ekspresyonu gösterdiği ortaya konuldu. Özellikle, defekt ve sağlam kemiğin sınırında lokalize olan osteoblastlarda ekspresyonun daha güçlü olduğu belirlendi. Osteokalsin ekspresyonu yoğunluğunun 21. ve 28. günlerde erişkin kemik dokudaki osteoblast ve osteositlerde devam ettiği dikkati çekti. Özellikle uygulamanın 7. gününde şekillenen fibrotik doku içindeki kan damarlarının endotel hücrelerinin osteokalsin pozitif olduğu belirlendi (Şekil 2).

Osteonektin; Kortikal ve spongiyöz kemiklerde sekonder kemik oluşumuna paralel olarak osteonektin ekspresyonunun arttığı görüldü. Kontrol grubunda 7, 21 ve 28 günlerde osteonektin ekspresyonlarının nisbeten zayıf ve benzer olduğu, buna karşın DEL ve TCE gruplarında uygulamaların 7. ve 21. günlerde osteonektin ekspresyonunun nisbeten zayıf, 28. günde ise osteonektin ekspresyonunun yüksek olduğu dikkati çekti. Her üç grupta da uygulamanın 7. gününde defekt bölgesindeki bazı yangı hücreleri, fibroblastların sitoplazmaları ile ince demetler halinde lokalize olan kollajen ipliklerde osteonektin ekspresyonu belirlendi. Osteonektin ekspresyon yoğunluğunun DEL ve TCE gruplarında 28. gün hem yeni şekillenen hem de erişkin kemik dokuda oldukça güçlü olduğu dikkati çekti (Şekil 3).



Şekil 2. Tavşan tibiasının kompakt (A-I) ve spongiyöz kemik (K-T) bölümlerindeki defekt bölgesinde osteokalsin lokalizasyonu. FD; Fibrotik doku, NB; yeni şekillenen kemik doku, KD; kıkırdak doku, Ki; kemik iliği, K; kan damarı, okbaşı; pozitif immunreaksiyon gösteren osteoblastlar. Bar: (A-T) 25 µm.

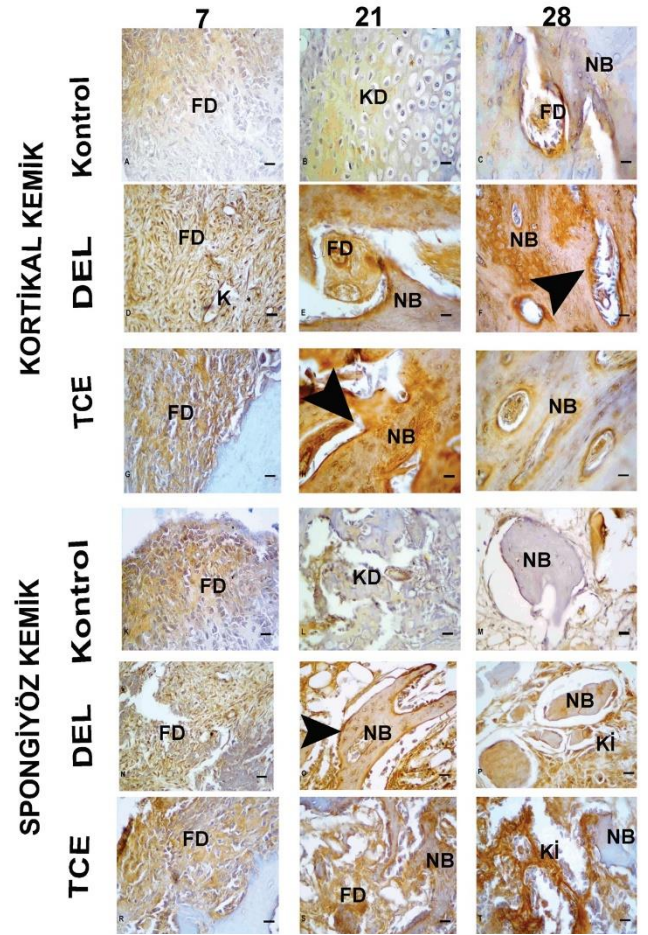
İmmunohistokimyasal reaksiyonların doğruluğunu kontrol etmek için kullanılan negatif kontrollerde osteokalsin ve osteonektin için herhangi bir immunreaksiyon görülmemiştir (Şekil 4).



Şekil 4. İmmunoreaksiyon görülmeyen negatif kontroller. Bar: 25 µm.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik dokusu yüksek iyileşme kapasitesine sahiptir, ancak büyük defektlerin olduğu durumlarda onarıma yardımcı olmak için kemik greftleri kullanılmıştır. Biyoteknolojinin ilerlemesiyle kemik oluşum sürecini etkilemek için yeni teknikler



Şekil 3. Tavşan tibiasının kompakt (A-I) ve spongiyöz kemik (K-T) bölümlerindeki defekt bölgesinde osteonektin lokalizasyonu. FD; Fibrotik doku, NB; yeni şekillenen kemik doku, KD; kıkırdak doku, Ki; kemik iliği, K; kan damarı, okbaşı; pozitif immunreaksiyon gösteren osteoblastlar. Bar: (A-T) 25 µm.

(lazer), ilaçlar ve alternatif biyomateryaller üzerine yoğunlaşmıştır (26). Bu çalışmada, tavşan modelinde DEL ve TCE uygulamalarının kortikal ve spongiyöz kemik defekt bölgesindeki iyileşme sürecinde, kemik dokunun önemli bileşenlerinden olan osteokalsin ve osteonektin ekspresyonları üzerindeki olası etkilerini değerlendirdik. Özellikle, defekt bölgesine tek başına ya da kombine olarak düşük enerjili lazer veya çeşitli ilaç uygulamalarının osteoblast ve osteoklast aktivitesini artırdığı (34) ve kemik matriksinin üretimini ve kemik kalınlı oluşumunu uyardığı (35), aynı zamanda hücre dışı çeşitli faktörlerin (osteokalsin, osteonektin, büyüme faktörleri v.s.) ekspresyonu değiştirerek kemik matriksinin rejenerasyonunda görev alan dinamikleri hızlandırdığı bildirilmiştir (11).

Pretel ve ark. (2007) kemik defektli oluşturdukları sıçan mandibulasında makroskopik bakıda kontrol grubunda kemik defekt bölgesinde 15. günde fibrotik bir dokunun, 45. günde fibrotik bir kapsülün şekillendiğini ve 60. günde ise defektin tamamıyla iyileştiğini ancak ana kemik doku ile iyileşen defekt bölgesi arasındaki sınırların belirgin olduğunu bildirmişlerdir. Lazer tedavisi uygulanan grupta, defekt bölgesinde uygulamanın 15. gününde lezyon bölgesi ile bağlantılı şişkin yumuşak bir dokunun oluştuğu, 45. günde kısmi olarak kemik dokunun şekillendiği ve 60. günün sonunda ise kemik dokunun

tamamiyle oluştuğu ve defekt bölgesi ile yeni şekillenen kemik dokunun eski kemik doku ile kaynaştığını göstermişlerdir (11). Sunulan çalışmada, kortikal ve spongiyöz kemikten elde edilen makroskopik bulguların yukarıda bahsedilen bulgular ile nisbeten benzer olduğu ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda, uygulama süreleri kısa olsa da tavşanlarda hem lazer hem T. kubensis uygulaması yapılan gruplarda kısa sürede kemik iyileşmesi görülmüştür. Bazı araştırmacılar, düşük enerjili lazer uygulamalarının kemik defekt bölgesindeki kemik metabolizmasını uyardığını ve yeni kemik oluşumunu ve kolajen birikimini hızlandırdığını göstermişlerdir (11,12). Buda, ilaç ya da lazer tedavisinin etkilerinin doza bağlı olduğunu, lazer uygulamalarında dalga boyu, güç, frekans, acı, doz ve enerji parametrelerinin iyi sonuçlara ulaşmak için büyük önem taşıdığını açıkça göstermiştir (11,12,36,37).

Sella ve ark. (2015) sıçanların femurunda oluşturmuş oldukları kemik defekti modelinde, kontrol grubunda 8. günde osteokalsin ekspresyonunun düşük, lazer uygulana grubunda ise yüksek olduğunu göstermişlerdir. Osteokalsin ekspresyonunun, kontrol grubunda 13. günde arttığını, lazer uygulan grupta yüksek ekspresyonun devam ettiğini bildirmişlerdir. 18. günden itibaren osteokalsin ekspresyonlarının benzer olduğunu ifade etmişlerdir. Lazer uygulanan grupta osteokalsin ekspresyonundaki kademeli bu artışında defekt bölgesinde kemiğin yeniden şekillenmesine olumlu katkılar sunduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, lazer uygulan ve kontrol gruplarında osteonektin ekspresyonlarının benzer olduğunu göstermişlerdir (38). Tavşan ve sıçanlarda kemik defekt bölgesinde lokalize olan kollajen ipliklerde osteokalsin ekspresyonunun pozitif olduğu, osteokalsinin defekt kenarındaki kemik dokudan da yoğun olarak eksprese olduğu bildirilmiştir. Bu durumda kemik matriksinin üretimi ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (26). Tavşanlarda defekt bölgesinde lokalize olan osteoblastlardan osteokalsin ve osteonektinin yüksek oranda eksprese olduğu bildirilmiştir ancak bu yoğunlukların hangi uygulama günlerinde olduğu hakkında bilgi verilmemiştir (25). Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi (25,26,38), bizim çalışmamızda da kontrol grubunda osteokalsin ekspresyonlarının tüm uygulama günlerinde kortikal ve spongiyöz kemikteki osteosit ve osteoblastlarda zayıf olduğu, lazer uygulan grupta ise 7. günden itibaren kademeli olarak arttığı belirlendi. Ayrıca, tavşan ve sıçanlarda bildirildiği gibi (26), sunulan çalışmada da defekt bölgesinde yer alan kollajen iplikler, fibrosit ve fibroblastlarda osteokalsinin lokalize olduğunu saptadık. Özdemir ve ark. (2016)'nın tavşanlarda bildirdiğinin aksine, bizim çalışmamızda kontrol grubunda uygulama günlerinin tamamında osteosit ve osteoblastlarda osteonektin ekspresyonlarının benzer olduğu, lazer uygulan grupta ise 7. ve 21. günlerde zayıf, 28. günde yükseldiği ortaya konulmuştur.

Homeopatik ilaçlardan olan theranekron, Tarantula cubensis örümceğinden elde edilen Tarantula cubensis özütünün alkolde çözdürülmüş formudur (23). Sığır deri papillomatosis, köpek meme adenokarsinomları, sıçanlarda travmatik tendon yaralanmaları ve birçok inflamatuvar lezyonda ve yara iyileşmesi gibi yumuşak doku hasarlarının tedavisinde faydalı etkilerini olduğu bildirilmiştir (23,39,40). Kemik kırık ya da defekt iyileşmesinde rolü ile ilişkili birkaç çalışma mevcut

olup (21,23, 24), kemik defekt bölgesinden osteokalsin ve osteonektin ekspresyonlarında etkili olup olmadığına dair çalışmalar bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada, tavşanlarda kortikal ve spongiyöz kemikte defekt bölgesine T. cubensis uygulanan TCE grubunda osteosit ve osteoblastlarda osteokalsin ekspresyonunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, 7. günden itibaren arttığı, 21 ve 28 günlerde devam ettiği ortaya konuldu. Yine, osteonektin ekspresyonunun TCE grubunda uygulamaların 7. ve 21. günlerde zayıf, 28. günde yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca hem kortikal hem de spongiyöz kemikte defekt bölgesinde lokalize olan yangı hücreleri, kollajen iplikler ve fibroblastların osteokalsin ve osteonektin ekspresyonu gösterdiği saptandı.

Kemik kırıkları ya da defektlerinde osteokalsinin ekstraselüler matriks oluşumu ve osteoblast aktivitesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (38). Bu faktörler kemik matriksinin büyümesine, şekline ve boyutuna katkıda bulunduğundan ve üretilen matrisin kalitesini etkilediğinden çok önemlidir (38,41). Osteonektin ise, kemik oluşumunun devamlılığında önemlidir. Çünkü kemiğin gerilme mukavemetinin elde edilmesi için gerekli olan kolajen proteinini içermektedir (27). Bir kırığın mineralizasyonu ve ardından onarım sürecinin tamamlanması, kalsiyum (osteokalsin ve osteopontin gibi) ve kollajen için afinitesi olan proteinler (osteonektin gibi) aracılığı ile sağlanabilir (27,38). Düşük enerjili lazer uygulamaları, kemik dokudaki hücrelerin proliferasyonunda, farklılaşmasında ve hücrelerde canlılığın devam ettirilmesinde, kemik matriksinin oluşumuna katkı sunan çeşitli faktörlerin salgılanmasının uyarılmasında, rejeneratif tıpta doku kayıplarının giderilmesinde ve dokularda onarımların artırılması gibi birçok biyomedikal kaynağa önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (38,41). "in vivo" kemik deneylerinde lazer uygulamalarının hücre-matriks adezyonu ve matris-matris modellemesini başlatarak kemik oluşum sürecine dâhil olduğunu göstermektedir (41,42). Homeopati, birbirine benzer olan tedavi sistemine dayanan tıbbi bir yöntemdir (21,23). Vücudun kendi kendini tedavi edici yanıtının uyarılmasıyla kendini iyileştirmesinin sağladığı önemli yan etkileri bulunmayan doğal bir tedavi şeklidir (21, 23, 24). Bu amaçla da çok çeşitli bitkisel, hayvansal ya da mineral kökenli maddeler kullanılmaktadır. T. Cubensis de (teranekron) hayvansal kökenli olan ve çeşitli tedavilerde kullanılan bir maddedir (kırık-homeopati). Yararlı etkisi ile ilişkili mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamış olsa da bazı araştırmalar, teranekronun katabolik enzimler üzerinde anti-enflamatuvar ve inhibe edici bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (23). Yukarıda bahsedilen bilgiler ışığında, tavşanlarda oluşturulan kemik defektleri sonrasında yapılan lazer ve t. cubensis uygulamalarında kemik matriksinin şekillendirilmesinde büyük öneme sahip olan osteokalsin ve osteonektin ekspresyonunun uygulama günlerine göre kademeli olarak artması, bu faktörlerin ekspresyonlarının lazer ve t. cubensis uygulamasından artış yönünde etkilenerek defekt bölgesinde kemik oluşumunda pozitif yönde katkı sunduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, tavşan kemik defekti modelinde düşük enerjili lazer ve t. cubensis uygulamalarının kemik iyileşmesi sırasında osteokalsin ve osteonektin ekspresyonlarını artırdığını göstermiştir. Osteokalsin ve osteonektin

ekspresyonlarının uygulama günlerine göre kademeli olarak artması erken kemik iyileşmesinin desteklenmesinde önemli potansiyellere sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğünün TÜBİTAK Teşvik Projeleri kapsamında TÜBİTAK.18.001 (1160717) numaralı projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. (2012). In Search of an Osteoblast Cell Model for in Vitro Research. *Eur Cell Mater.* 9(24): 1-17.
2. Irie K, Alpaslan C, Takahashi K, et al. (2003). Osteoclast Differentiation in Ectopic Bone Formation Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2). *J Bone Miner.* 21(6): 363-369.
3. Çilbir Ö, Karaca İ, Sabuncuoğlu B, Akbay C. (1999). Demineralize Kemik Tozunun Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Deneyisel Olarak İncelenmesi. *CÜ Dış Hekimliği Fak Derg.* 2 (2): 117-121.
4. Bernard GW. (1991). Healing and Repair of Osseous Defects. *Dent Clin North Am.* 35 (3): 469-477.
5. Block MS, Kent JN, Ardoin RC, Davenport W. (1987). Mandibular Augmentation in Dogs with Hydroxylapatite Combined with Demineralized Bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 45 (5): 414-420.
6. Chesmel KD, Branger J, Wertheim H, Scarborough N. (1998). Healing Response to Various Forms of Human Demineralized Bone Matrix in Athymic Rat Cranial Defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 56 (7): 857-863.
7. Constantino PD, Friedman CD. (1994). Soft Tissue Augmentation and Replacement in the Head and Neck. *Otolaryngol Clin North Am* 27(1): 1-12.
8. AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, et al. (2009). Effect of Soft Laser and Bioactive Glass on Bone Regeneration in the Treatment of Bone Defects (An Experimental Study). *Lasers Med Sci.* 24(4): 527-533.
9. Obradovic RR, Kesic LG, Pesevska S. (2009). Influence of Low-Level Laser Therapy on Biomaterial Osseointegration: A Mini-Review. *Lasers Med Sci.* 24(3): 447-451.
10. Batista JD, Sargenti-Neto S, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. (2015). Low-level Laser Therapy on Bone Repair: Is There Any Effect Outside the Irradiated Field? *Lasers Med Sci.* 30:1569-1574.
11. Pretel H, Lizarelli RFZ, Ramalho LTO. (2007). Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats. *Lasers Surg Med.* 39: 788-796.
12. Bossini PS, Rennó ACM, Ribeiro DA, Fangel R, Ribeiro AC, de Assis Lahoz M, Parizotto NA. (2012). Low Level Laser Therapy (830 nm) Improves Bone Repair in Osteoporotic Rats: Similar Outcomes at Two Different Dosages. *Exp Gerontol.* 47: 136-142.
13. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. (2003). Low-Power Laser Irradiation Improves Histomorphometrical Parameters and Bone Matrix Organization during Tibia Wound Healing in Rats. *J Photochem Photobiol B.* 70 (2): 81-89.
14. Lirani-Galvao AP, Jorgetti V, da Silva OL. (2006). Comparative Study of How Low-Level Laser Therapy and Low-Intensity Pulsed Ultrasound Affect Bone Repair in Rats. *Photomed Laser Surg.* 24 (6): 735-740.
15. Cerqueira A, Silveira RL, Oliveira MG, Sant'ana Filho M, Heitz C. (2007). Bone Tissue Microscopic Findings Related to the use of

- Diode Laser (830 Nm) in Ovine Mandible Submitted to Distraction Osteogenesis. *Acta Cir Bras.* 22 (2): 92-97.
16. Blaya DS, Guimaraes MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. (2008). Histologic Study of the Effect of Laser Therapy on Bone Repair. *J Contemp Dent Pract.* 9 (6): 41-48.
 17. Kızıl Ö, Atam S. (2016). Homeopati ve Veteriner Hekimlikte Homeopatik Tedavi Uygulamaları. *FÜ Sağ Bil Vet Derg.* 30 (3): 243-246.
 18. Özyurtlu N, Alaçam E. (2005). Effectiveness of Homeopathy for the Treatment of Pseudopregnancy in Bitches. *Turk J Vet Anim Sci.* 29: 903-907.
 - 19- Kaya S. (2007). Homeopati ve Tıbbi Bitkiler. *Veteriner Farmakoloji*, 4. Baskı, Ankara: Medisan.
 20. Duval J. (2012). "Treating mastitis without antibiotics. AGRO-BIO-370-11E, Ecological Agriculture Projects". <http://eap.mcgill.ca/agrobio/ab370-11e.htm/> 25.12.2012.
 21. Bigham-Sadegh A, Karimi I, Hoseini F, Moradi H. (2017). Concurrent Use of Theranekron with Hydroxyapatite on Bone Healing in Rabbit Model: Radiographic and Histologic Evaluation. *Iranian J Ortho Surg* 15 (2): 56-64.
 22. Sharifi S, Bigham-Sadegh A, Oryan A, Alavi Y. (2020). The Effect of Theranekron and Autograft Bone on Bone Defect Healing in Rabbit Model. Preprint from Research Square DOI: 10.21203/rs.2.18822/v2 PPR: PPR121344.
 23. Kızılay Z, Aktaş S, Kahraman Çetin N, Kılıç MA, Öztürk H. (2019). Effect of Tarantula Cubensis Extract (Theranekron) on Peripheral Nerve Healing in an Experimental Sciatic Nerve Injury Model in Rats. *Turk Neurosurg.* 29 (5): 743-749.
 24. Bigham-Sadegh A, Oryan A. (2015). Selection of Animal Models for Pre-Clinical Strategies in Evaluating the Fracture Healing, Bone Graft Substitutes and Bone Tissue Regeneration and Engineering. *Connect Tissue Res.* 56(3): 175-194.
 25. Özdemir B, Kurtiş B, Tüter G, Şengüven B, Yıldırım B, Özcan G. (2016). Osteocalcin and Osteonectin Expression after Double Application of Platelet-Rich Plasma in Rabbits. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 50 (2): 1-9.
 26. Verbicaro T, Giovanini AF, Zielak JC, Filho FB, de Araujo MR, Deliberador TM. (2013). Osteocalcin Immunohistochemical Expression During Repair of Critical- Sized Bone Defects Treated with Subcutaneous Adipose Tissue in Rat and Rabbit Animal Model. *Braz Dent J.* 4 (6): 559-564.
 27. Ishigaki R, Takagi M, Igarashi M, Ito K. (2002). Gene Expression and Immunohistochemical Localization of Osteonectin in Association with Early Bone Formation in the Developing Mandible. *Histochem J.* 34: 57-66.
 28. Ribeiro TP, Nascimento SB, Cardoso CA, Hage R, Almeida JD, Arisawa EAL. (2012). Low-Level Laser Therapy and Calcitonin in Bone Repair: Densitometric Analysis. *Int J Photoenergy.* Article ID 829587, 1-5.
 29. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. (2007). Animal Models for Implant Biomaterial Research in Bone: A Review. *Eur Cell Mater.* DOI: 10.22203/eCM.v013a01.
 30. Ajayi IE, Shawulu JC, Zachariya TS, Ahmed S, Adah BM. (2012). Osteomorphometry of the Bones of the Thigh, Crus and Foot in the New Zealand White Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*). *Italy J Anat Embryol.* 117: 125-134.
 31. Shakouri SK, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. (2010). Effect of Low-Level Laser Therapy on the Fracture Healing Process. *Lasers Med Sci.* 25: 73-77.
 32. Oryan A, Moshiri A, Meimandi-Parizi AA. (2012). Alcoholic Extract of Tarantula Cubensis Improves Sharp Ruptured Tendon Healing after Primary Repair in Rabbits. *Am J Orthop.* 41: 554-560.

33. Mota FC, Belo MA, Beletti ME, Okubo R, Prado EJ, Casale RV. (2013). Low-power Laser Therapy for Repairing Acute and Chronic-Phase Bone Lesions. *Res Vet Sci.* 94: 105–110.
34. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. (1988). Healing of Bone Defects by Guided Tissue Regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 81(5): 672–676.
35. Markel MD, Wikenheiser MA, Chao EY. (1991). Formation of Bone in Tibial Defects in A Canine Model. *Histomorphometric and Biomechanical Studies. J Bone Joint Surg Am.* 73 (6): 914–923.
36. Takeda Y. (1988). Irradiation Effect of Low-Energy Laser on Alveolar Bone after Tooth Extraction. *Experimental Study in Rats. Int J Oral Maxillofac Surg.* 17 (6): 388–391.
37. Bortoletto R, Silva NS, Zangaro RA, Pacheco MT, Da Matta RA, Pacheco-Soares C. (2004). Mitochondrial Membrane Potential after Low-Power Laser Irradiation. *Lasers Med Sci.* 18 (4): 204–206.
38. Sella VRG, do Bomfim FRC, Machado PCD, da Silva Morsoleto MJM, Chohfi M, Plapler H. (2015). Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: A Randomized Controlled Experimental Study. *Lasers Med Sci.* 30: 1061–1068.

39. Gul Satar NY, Cangul IT, Topal A, Kurt H, Ipek V, Onel GI. (2017). The effects of Tarantula Cubensis Venom on Open Wound Healing in rats. *J Wound Care.* 26 (2): 66-71.
40. Gultekin N, Guvenc T, Kaya D, et al. (2015). Tarantula Cubensis Extract Alters the Degree of Apoptosis and Mitosis in Canine Mammary Adenocarcinomas. *J Vet Sci.* 16 (2): 213- 219.
41. Thurner PJ, Chen CG, et al. (2010). Osteopontin Deficiency Increases Bone Fragility but Preserves Bone Mass. *Bone.* 46: 1564–1573.
42. Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. (1998). Morphological and Immunocytochemical Characterization of Primary Osteogenic Cell Cultures Derived from Fetal Rat Cranial Tissue. *Anat Rec.* 252 (4): 554–567.

✉ **Sorumlu Yazar:**

Semih ALTAN

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim

Dalı, 21280, Diyarbakır, TÜRKİYE

E-mail: semih.altan@dicle.edu.tr