

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOSARKOMDA IN VİVO
KSENOGRAFT MODELDE LOKAL
REKÜRRENSİ ÖNLEME**

NIHAT DEMİRHAN DEMİRKIRAN

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970050

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOSARKOMDA IN VİVO
KSENOGRAFT MODELDE LOKAL
REKÜRRENSİ ÖNLEME**

NİHAT DEMİRHAN DEMİRKİRAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-20159700

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, **Temel Onkoloji** Doktora programı öğrencisi **Nihat Demirhan Demirkıran**, “**Osteosarkomda In Vivo Ksenograft Modelde Lokal Rekürrensi Önleme**” konulu Doktora Tezini 17.07.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
BAŞKAN

Prof. Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN
ÜYE

Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU
ÜYE

Doç. Dr. Nüket ELİYATKIN
ÜYE

Doç. Dr. Ayşe Gülden DİNİZ ÜNLÜ
ÜYE

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Danışman, Oy Kullanmıyor

Prof. Dr. Kemal ERGİN
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET.....	1
İNGİLİZCE ÖZET	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Problemin Tanımı.....	3
1.2. Araştırmanın Amacı	6
1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri.....	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Osteosarkoma Tanımı.....	7
2.2. Osteosarkom Epidemiyolojisi	8
2.3. Osteosarkom Tipleri	8
2.4. Osteosarkom Tanısı	9
2.5. Osteosarkom Evrelemesi	10
2.6. Osteosarkom Tedavisi	11
2.6.1. Cerrahi tedavi.....	11
2.6.2. Kemoterapi tedavisi	11
2.6.3. Radyoterapi.....	12
2.7. Kadmiyum	12
2.8. Kemik Çimentosu.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Araştırmanın Tipi	15

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	15
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	15
3.4. Çalışma Materyali	16
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	18
3.6. Veri Toplama Araçları.....	18
3.6.1. Hücre kültürü ve Kadmiyum emdirilmiş kemik çimentosunun in vitro değerlendirilmesi	18
3.6.2. Fare ksenograft modelinin oluşturulması	20
3.6.3. Kimyasallar	21
3.6.4. Farelerin araştırmadan çıkarılma kriterleri	21
3.6.5. Farelerin sakrifikasyonu, organ ve dokuların disseke edilmesi.....	21
3.6.6. Parafin Kesitte Tunel İle Apoptoz Analizi	21
3.6.7. Değerlendirme yöntemleri	22
3.6.8. Anneksin V- propidyum iyodür boyama protokolü ile akım sitometrik apoptoz değerlendirilmesi.....	23
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	23
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	23
3.9. Etik Kurul Onayı	24
4. BULGULAR	25
4.1. Apoptoz Bulguları	25
4.2. Histomorfolojik Değerlendirme Bulguları	33
4.3. Fare Ksenograft Modelinde Tümör Oluşum Bulguları:	35
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7. KAYNAKLAR	46
8. EKLER.....	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Osteosarkom tipleri.....5

Tablo 2. Osteosarkom evreleri.....7

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Tüm gruplardaki canlılık yüzdelerinin ilk ve nüks tümörlerde ortalama dağılımları.....	22
Şekil 2. Kontrol grubunun <i>dot plot</i> analizi.....	23
Şekil 3. Total eksizyon grubunun <i>dot plot</i> analizi.....	25
Şekil 4. Totale yakın eksizyon grubu <i>dot plot</i> analizi.....	27
Şekil 5. Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruba ait <i>dot plot</i> analizi.....	28
Şekil 6. Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruba ait <i>dot plot</i> analizi.....	29
Şekil 7. Tümör dokusu mikroskopik kesitler.....	30
Şekil 8. Kemik çimentosu + kadmiyum uygulanan grupta organların mikroskopik kesitleri.....	31
Şekil 9. Totale yakın eksizyon sonrası SF ‘li kemik çimentosu uygulanan farede tümör gelişimi.....	32
Şekil 10. Totale yakın eksizyon sonrası SF ‘li kemik çimentosu uygulanan farede tümör gelişimi.....	33

KISALTMALAR

CT : Bilgisayarlı Tomografi

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

DEÜTFDHAL: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı

ECI : Ekstracorporeal Işınlama

MRG : Manyetik Rezonans Görüntüleme

OS : Osteosarkom

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında değerli bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Safiye AKTAŞ hocama çok teşekkür ederim.

Gerek Ortopedi uzmanlık eğitimim, gerekse Temel Onkoloji doktora sürecimde her zaman destek olan ve bana bu imkanı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji doktora eğitimimde katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof.Dr. Zekiye Sultan ALTUN ve Prof.Dr.Nur OLGUN'a; tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr.Pınar Erçetin ÖZDEMİR, Dr.Ali İhsan KILIÇ, Ömer BEKÇİOĞLU ve Melek AYDIN'a teşekkür ederim. Bu çalışmanın gerçekleşmesinde 2016.KB.SAG.027 no'lu BAP projesi kapsamında maddi desteklerinden ötürü Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen ve bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili annem ve babam Zehra-Kemal DEMİRKİRAN' a, kardeşim E. Denizhan DEMİRKİRAN' a ve sevgili teyzem Semra SÜRÜCÜ' ye,

Öğrencilik hayatımın ilk yıllarından itibaren yanımda olan ve desteğini her zaman hissettiğim hayat arkadaşım Derya DEMİRKİRAN ve mutluluk kaynağımız oğlum M. Deniz DEMİRKİRAN' a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nihat Demirhan DEMİRKİRAN

OSTEOSARKOMDA IN VIVO KSENOGRAFT MODELDE LOKAL REKÜRRENSİ ÖNLEME

Nihat Demirhan DEMİRKIRAN, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İnciraltı Mahallesi DEÜ
Sağlık Yerleşkesi, İZMİR

ÖZET

Amaç: Osteosarkomlar genelde çocukluk ve genç erişkin yaşlarda görülmekte ve çok agresif seyretmektedir. Bu tümörlerin tedavisinde ekstremitte koruyucu cerrahi ile büyük başarılar sağlanmıştır. Ancak mikroskopik düzeyde kalabilen rezidü tümörler rekürrens olasılığını arttırmaktadır. Cerrahi dışında osteosarkom tedavisinde kullanılan yüksek doz metotreksat, sisplatin kemoterapi rejimlerine rağmen de rezidü tümör görülmektedir. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada cerrahi rezeksiyon sonrası lokal olarak bu bölgeye konulacak kemik çimentosu içindeki kadmiyum ile rezidü tümör ve rekürrens olasılığı önlenmesi üzerine etkinliği in vivo hayvan modelinde test edilmiştir.

Yöntem: K7M2 tümörjenik osteosarkom hücre hattı in vitro hücre kültürü ile çoğaltılmıştır. Daha sonra atimik nude farelere tümör hücre hattından in vitro üretilen tümör hücreleri subkutan verilerek atimik nude farede ksenograft tümör modeli oluşturulmuştur. Tümör oluştuktan sonra, kontrol tümör, total rezeksiyon, totale yakın rezeksiyon, totale yakın rezeksiyon sonrası serum fizyolojik içeren kemik çimentosu uygulanan grup ve totale yakın rezeksiyon sonrası kadmiyum içeren kemik çimentosu uygulanan grup; her grupta 7 fare olacak şekilde rastgele eşleştirilmiştir. Fareler tümör bölgesinde rekürrens takibi için 15 gün takip edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası her grupta rezidü tümör histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Subkutan enjeksiyon sonrası bir ay içinde tümör oluşmuştur. Total rezeksiyon, totale yakın rezeksiyon, totale yakın rezeksiyon ve serum fizyolojik içeren kemik çimentosu uygulanan grupların tümünde rekürrent tümör gözlenmiştir. Totale yakın rezeksiyon ve kadmiyum içeren kemik çimentosu uygulanan grupta hiç ya da küçük tümör oluşumu saptanmıştır. Sistemik toksisite bulgusu gözlenmemiştir.

Sonuç: Bulgularımız, kemik çimentosu içinde lokal kadmiyum uygulamasının cerrahi sonrası osteosarkomun lokal tedavisine katkıda bulunabileceğini desteklemektedir. Postoperatif ortopedik biyomekanik malzemeler içinde lokal tedavi, osteosarkomda rekürrens önlemede katkı tedavi seçeneği olabilir.

Anahtar Kelimeler: Osteosarkom, kadmiyum, lokal tedavi

PREVENTION OF LOCAL RECURRENCES OF OSTEOSARCOMA IN XSENOGRAFT IN VIVO MODEL

Nihat Demirhan DEMİRKİRAN, Institute of Health Sciences, İnciraltı Mahallesi
DEÜ Sağlık Yerleşkesi, İZMİR

İNGİLİZCE ÖZET

Aim: Osteosarcoma which is very aggressive, usually occurs in childhood and young adulthood. Limb salvage surgery has provided successful results in the treatment of these tumors. However, residual tumor which may remain at the microscopic level, increases the likelihood of recurrence. Apart from surgery, the residual tumor is observed despite the high-dose methotrexate, cisplatin chemotherapy regimens. Therefore, new approaches are needed for the treatment of osteosarcoma. The aim of the study was to evaluate the preventive efficacy of cadmium in cement was placed locally after surgical resection on residual tumor and recurrence in an in-vivo animal model.

Method: K7M2 tumorigenic osteosarcoma cell line was cultivated in vitro. Then, the xenograft tumor model was formed by giving the tumor cells subcutaneously to athymic nude mice. After tumor growth; control tumor, total resected tumor group, subtotal resected tumor group, subtotal resected group with saline in cement and subtotal resected group with cadmium in cement groups were formed randomly with 7 animals in each group. Animals were observed for 15 days for recurrences in tumor site. After sacrifice, the presence of residual tumor was checked histopathologically in each group.

Results: Tumor was formed within one month after subcutaneous injection. Recurrent tumor was formed in all animals in subtotal resected group, subtotal resected group with saline in cement. No or small tumor formation was observed in cadmium group. No systemic toxic effect was observed.

Conclusion: Our data suggest that local application of cadmium in cement might help local therapy of osteosarcoma after surgery. Postoperative local treatment with agents within orthopedic biomechanic substances might be an option of additive treatment to overcome the recurrences in osteosarcoma.

Keywords: Osteosarcoma, cadmium, local therapy

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı

Osteosarkom (OS) malign osteoblastların proliferasyonu ile karakterizedir. Diferansiyasyon derecesine göre osteoid üretimi gösterebilir (1, 2).

Hematolojik olmayan primer malign kemik tümörlerinin ikinci en sık görülenidir (%20-22). Kemikte görülen tüm maligniteler gözönüne alınırsa, metastatik lezyonlar ve miyelomlardan sonra gelir. Osteosarkomların çoğu primerdir; önceden bilinen herhangi bir kolaylaştırıcı faktör olmaksızın, kendiliğinden ortaya çıkar. Sekonder osteosarkomlar ise Paget hastalığı, radyasyon görmüş kemik, kemoterapi, travma, yabancı cisim (ortopedik implant) zemininde görülürler. Herediter retinoblastom, Li- Fraumeni sendromu ve Rothmund-Thomson sendromu genetik yatkınlık oluşturmaları (3-5).

Bin dokuz yüz yetmişlerden önce OS amputasyon yöntemi ile tedavisi gerçekleşen, kısa sağkalımlı, ve metastatik hastalığa bağlı olarak % 80 oranında hastanın öldüğü malign bir hastalıktı. Kemoterapi (indüksiyon ve adjuvant) protokollerinin gelişmesi, cerrahi yöntemler ve radyolojik evreleme çalışmalarındaki ilerlemeler ile birlikte günümüzde hastaların %90 ile %95 oranındaki kesimi ekstremitte koruyucu rezeksiyon ve rekonstrüksiyon yaklaşımları ile tedavi görmektedir. Bu yaklaşımlar ile tedavi gören hastaların uzun dönem yaşama şansı ve kür oranı, lokalize (metastaz olmayan) hastalıklarda, %60-80 düzeyine yükselmiştir (6-8).

Osteosarkoma tedavisinde kullanılan neo-adjuvan kemoterapilerin uygulanması sonucunda klinik sonuçlarda belirgin bir iyileşme görülmüştür. Buna karşın post-operatif gelişen rekürrensler ortak bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bu rekürrens durumu genellikle ameliyat sonrası ilk iki yıl içerisinde ortaya çıkmakta ve bu takip süresinin uzamasıyla birlikte rekürrens olasılığı azalmaktadır. Nadir olmakla beraber beş yıl içinde de görülebilmekte ve bu durum osteosarkomun geç rekürrensi olarak tanımlanmaktadır (9, 10). Bu nedenle post-operatif hastalarda rekürrensi önleyecek yeni yaklaşım arayışları önem taşımaktadır. Bu nedenle in vivo deney hayvanı çalışmaları gereklidir.

Kadmiyum (Cd) endüstride uzun süredir kullanılan ve toksik etkileri iyi bilinen bir geçiş metalidir. Gümüş beyaz renkli, seramik, pil, elektrik ve akü sanayisinde kullanılan bir element olan kadmiyum, çinko bileşikleriyle beraber doğada kadmiyum sülfür olarak bulunur. Japonya’da kadmiyuma aşırı maruziyet sonrası osteomalazi ve osteoporotik lezyonlara eşlik eden ağır renal yetmezlik ile karakterize “itai-itai hastalığı” tanımlanmıştır. Yüksek seviyede Cd maruziyeti kalsiyum metabolizmasını bozar ve böbrek taşı oluşmasına sebep olur. Osteoporoz ve kemiklerin yumuşaması Cd ile kontamine olmuş bölgelerde çalışan yada yaşayan insanlarda yaygın olarak görülür. Japonya’da Çinko ve kurşun madenlerinden kaynaklanan Cd ‘un çevredeki toprakları kontamine etmesi sonucunda “itai-itai hastalığı” meydana geldiği bildirilmiştir. Bu hastalık hala o yörelerde 50 yaş üstü kadınlarda yaygındır. Kemiklerde ağrı, osteoporoz ve böbrek yetmezliği ile karakterize olmaktadır. Kadmiyum aslında kronik maruziyette karsinojenik olarak bilinen bir ajandır. Ancak birçok antikanserojen ajanın toksik ve uzun vadede karsinogenezi tetikleyici olabileceği de bilinmektedir. Kadmiyum; böbrek, iskelet sistemi ve solunum sistemi üzerine toksiktir. Genelde doğada düşük konsantrasyonlarda bulunur ancak insan aktiviteleri bu toksik metalin çevredeki konsantrasyonunu arttırmaktadır. Kadmiyum, Cd⁺⁺ olarak bulunur ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına uğramaz. Cd toksisitesinin mekanizması tamamen anlaşılmış değildir. Cd, lipit peroksidasyonu ve glutatyon tüketimi ile sonuçlanan ROS oluşumunu indükler. Cd gastrointestinal yolla iyi absorblanmaz (% 1.5-5) ancak inhalasyon yolu ile çok daha iyi absorblanır (~ %10). Cd birincil olarak karaciğere daha sonra da böbreklere dağılır. Bu iki organ absorbe olan dozun yaklaşık yarısına karşılık gelir. Cd kan-beyin bariyerini veya plasentayı çok az miktarda aşabilir. Cd birincil olarak idrar ile elimine olur ve yarılanma ömrü (t_{1/2}) 10 ile 30 yıl arasında değişmektedir. Kadmiyumun osteoblastlar da dahil olmak üzere birçok hücrede hem invivo hem invitro olarak apoptozu tetiklediği bilinmektedir.

Akut Cd toksisitesi temel olarak lokal iritasyon sebebiyle oluşur. İnhal edilen Cd, solunum yolu iritasyonu ile birlikte göğüs ağrısının eşlik ettiği ağır pnömoni, mide bulantısı, baş dönmesi ve ishale sebep olur. Toksikite ölümcül olan pulmoner ödeme doğru ilerleyebilir. Mideye ulaşan Cd bulantı, kusma, salivasyon, ishal ve abdominal krampları indükler. Kadmiyumun böbreklerdeki ilk toksik etkisi,

düşük-molekül-ağırlıklı proteinlerin atılımının artmasıdır. Cd aynı zamanda glomerüler hasar ve filtrasyonun azalmasına sebep olur. Kadmiyuma uzun süreli inhalasyon yolu ile maruz kalan işçiler akciğer fonksiyonunda azalma göstermektedir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kadmiyuma maruz kalan işçilerdeki ölüm oranını artırır. Vitamin D eksikliğinin eşliğinde kadmiyuma maruz kalınması kırık ve osteoporoz riskini artırır. Bu durum muhtemelen böbreklerdeki Ca^{2+} ve fosfatın regülasyonunu olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklanmaktadır.

Kadmiyuma maruz bırakılan MG-63 osteosarkom hücrelerinde apoptoz olduğu gözlemlenmiş ve kadmiyumun oksijen radikallerini arttırması sonucu, p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağını aktive edip, ekstraselüler sinyal regule kinaz (ERK) 1/2 yolaklarını baskılaması sonucu apoptoza yol açtığını ortaya koyulmuştur. Kadmiyumun kemik metabolizmasını sıçan Osteosarkom modelinde, kalsiyum metabolizmasını kollajen sentezinin bozarak ve istenmeyen protein kinaz C aktivasyonu yoluyla da etkilediği bildirilmiştir. Daha önce kadmiyumla ilgili yapılmış olan deney hayvanı çalışmalarına bakıldığında 1991 yılında Waalkes ve arkadaşlarının Fischer türü sıçanlarda kadmiyumum subkutan uygulamasının kronik karsinojenik ve toksik etkilerini değerlendirdiği görülmektedir (11). Bunun haricinde kadmiyumun kemik çimentosu içine absorbe edilerek yapılmış bir kanser çalışması da literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmada kadmiyumum DNA hasarı oluşturarak lokal olarak ameliyat sonrası bölgede kalmış olabilecek tümör hücrelerini öldürücü ya da proliferasyonlarını azaltıcı etkisinin olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu amaçla ön çalışmalar yapılmıştır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada kadmiyumun DNA hasarı oluşturarak lokal olarak ameliyat sonrası bölgede kalmış olabilecek tümör hücrelerini öldürücü ya da proliferasyonlarını azaltıcı etkisinin olup olmadığı değerlendirilmiştir.

1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri

Bu araştırmanın ana hipotezi, kadmiyumun ameliyat bölgesine lokalize uygulanmasının sonucunda osteosarkom nüksünü önlediği şeklinedir. Buna dayanarak araştırmada řu soruların yanıtları aranmıştır:

1. Tümöre karşı kadmiyumun apoptoz ve nekroz üzerindeki etkisi sadece kemik imentosu uygulanmasından farklı mıdır?
2. Lokal uygulanan kadmiyumun etkisi kemik imentosu ile azalmakta mıdır?
3. Kemik imentosu içinde uygulanan kadmiyum sistemik olarak yan etki oluştırmakta mıdır?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteosarkoma Tanımı

Osteosarkom (OS) atipik, malign osteoblastların osteoid yapımı ile karakterizedir. Herhangi bir tümörün içinde ufak bir sahada dahi atipik osteoblastların osteoid yaptığı görülürse bu tümörün tamamı osteosarkom olarak adlandırılır (1, 2).

Hematolojik olmayan primer malign kemik tümörlerinin ikinci en sık görülenidir (%20-22). Kemikte görülen tüm maligniteler gözönüne alınırsa, metastatik lezyonlar ve miyelomlardan sonra gelir. Osteosarkomların çoğu primerdir; önceden bilinen herhangi bir kolaylaştırıcı faktör olmaksızın, kendiliğinden ortaya çıkar. Sekonder osteosarkomlar ise Paget hastalığı, radyasyon görmüş kemik, kemoterapi, travma, yabancı cisim (ortopedik implant) zemininde görülürler. Herediter retinoblastom, Li-Fraumeni sendromu ve Rothmund-Thomson sendromu genetik yatkınlık oluşturlar (3-5).

1970'lerden önce osteosarkom amputasyon ile tedavi edilen, sağkalımı kısa, hastaların %80'inin metastatik hastalıklardan öldüğü bir hastalıktı. İndüksiyon ve adjuvan kemoterapi protokollerinin gelişmesi, cerrahi teknikler ve radyolojik evreleme çalışmalarındaki ilerlemelerle hastaların %90-95'i artık ekstremitte koruyucu rezeksiyon ve rekonstrüksiyon ile tedavi görmektedir ve bu hastaların uzun dönem yaşama şansı ve kür oranı, lokalize (metastaz olmayan) hastalıklarda, %60-80'e yükselmiştir (6-8).

Osteosarkoma tedavisinde kullanılan neo-adjuvan (ameliyat öncesi tümörü küçültme amaçlı) kemoterapilerin uygulanması sonucunda klinik sağkalımda belirgin bir iyileşme görülmesine karşın post-operatif gelişen rekürrensler ortak bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bu rekürrens durumu genellikle ameliyat sonrası ilk iki yıl içinde ortaya çıkmakta ve bu takip süresinin uzamasıyla birlikte rekürrens olasılığı azalmaktadır. Nadir olmakla beraber beş yıl içinde de görülebilmekte ve bu durum osteosarkomun geç rekürrensi olarak tanımlanmaktadır (9, 10). Bu nedenle

post-operatif hastalarda rekürrensi önleyecek yeni yaklaşım arayışları yer almaktadır. Bu nedenle in vivo deney hayvanı çalışmaları önem taşımaktadır.

2.2. Osteosarkom Epidemiyolojisi

OS, malign mezenkimal hücrelerle birlikte histolojik osteoid üretim bulgularına sahip nadir bir sarkomdur (11). OS, ergenlik döneminde en sık görülen üçüncü kanser olup, daha yaygın görülen lenfomalar ve beyin tümörlerinden sonra gelmektedir. On beş yaşın altındaki bir milyon çocuk başına yıllık 5,6 vaka görülmektedir (12-14). İnsidansının en fazla olduğu yaşamın ikinci on yılındadır (15, 16). Beş yaşından önce OS nadir olarak görülmektedir (17). OS, hücre döngüsü düzenlemesinde bilinen kalıtsal kusurlarla ilişkili birkaç vaka ile birlikte sporadik olarak ortaya çıkabilmekte, ancak tümör örneklerinin yaklaşık % 70'i kromozomal anormallik sergilemektedir. Bunlar genellikle tümör baskılayıcı genlerdeki veya DNA helikazlarındaki mutasyonları içermektedir (18).

2.3. Osteosarkom Tipleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün kemik tümörlerinin histolojik sınıflandırması, OS'yi merkezi, intramedüller ve yüzey tümörlerine bölerek her grup altında bir dizi alt tipe ayırmaktadır (19) (Tablo 1).

Tablo 1. Osteosarkom tipleri (19)

Grup	Alt Tipleri
Konvansiyonel (intramedüller) osteosarkom	Osteoblastik
	Kondroblastik
	Fibroblastik
	Epiteloid
	Dev-hücreli
	Küçük hücreli
	Telanjiektatik
Korteks-ilışkili osteosarkom	Parosteal
	Dediferansiye parosteal
	Periosteal
	Yüksek-grade yüzey

İntrakortikal
Düşük-grade (merkezi) osteosarkom
Osteoblastom- benzeri osteosarkom
Hastalık-ilişkili osteosarkom

2.4. Osteosarkom Tanısı

Osteosarkom tanısı koymak için kullanılan teknoloji ve teknikler son birkaç on yılda gelişmiştir (20). Herhangi bir şüpheli kemik lezyonu için, tüm kemiğin ve bitişik eklemin en az iki röntgen görüntüsünün alınmasını içeren bir preoperatif görüntüleme protokolü izlenmelidir. Radyografilerde, kemik metafizinde ortaya çıkan ve osteoblastik ve / veya osteolitik bölgeler, periost reaksiyonu ve yumuşak doku kitlesi ile ortaya çıkan hastalık olarak tanımlanmış bir lezyon gösterilecektir (21-23).

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), lezyonun yumuşak doku ve nörovasküler yapılar yayılımını, kemik iliği replasman seviyesini, lezyonları dışlama ve sınırlayıcı eklemin içine uzanmasını değerlendirmek için kullanılmaktadır (21-23). Bilgisayarlı tomografi (BT) taramaları kortikal düzensizlikler, kırık bölgeleri, mineralizasyon ve nörovasküler tutulumun tanımlanmasında yararlıdır (21-23). Hastalığın kemoterapiye histolojik tepkisini değerlendirmek ve ilerlemesiz sağkalımı öngörmek için PET taramalarının kullanılmasını önermektedir (23).

OS tanısında biyopsi önemlidir. Nihai tümör rezeksiyonu biyopsi yolunu içermelidir, çünkü bu bölge tümör hücreleriyle kontamine olabilmektedir. Cerrah gelecekteki bu cerrahiye dahil edilecek bir biyopsi yolunu seçmelidir (22). Tercihen, biyopsiyi yapan cerrah, daha sonrasında rezeksiyonu gerçekleştiren aynı cerrah olmalıdır; eğer bu mümkün değilse, deneyimli bir radyolog biyopsiyi görüntüleme yardımı ile yapabilir veya deneyimli bir cerrah radyolojik rehberlik olmadan perkütan biyopsi yapabilmektedir (23, 24).

Biyopsi yapıldıktan sonra frozen kimi zaman tamamlanmaktadır. Histolojik olarak OS, osteoblastik, kondroblastik veya fibroblastik olarak ortaya çıkacaktır (25, 26). Birçok tümör, üç hücre tipinin ve matrisinin özelliklerini göstermektedir (25).

Bulgular kas-iskelet sistemi patolojisinde tecrübesi olan bir patolog tarafından gözden geçirilmelidir (26).

OS için tanısal bir laboratuvar testi yoktur; ancak, tam kan sayımı, temel metabolik panel, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri ve idrar tahlili, kemoterapiye başlamadan önce hastanın temel organ işlevini değerlendirmek için faydalıdır.

2.5. Osteosarkom Evrelemesi

Osteosarkomda kullanılan evreleme sınıflandırması, Enneking sistemi olarak da bilinen Kas İskelet Sistemi Tümör Derneği evreleme şemasıdır. Bu sistem, bir tümörün düşük veya yüksek dereceli (I veya II) olup olmadığını, tümörün intra veya ekstra bölümler arası (A veya B) olup olmadığını ve herhangi bir metastaz olup olmadığını belirler (III). Evre IA, kortikal olan düşük dereceli bir tümörü, IB ekstra kortikal olan düşük dereceli bir tümörü, IIA ise kortikal olan yüksek dereceli bir tümörü ve IIB, yüksek dereceli bir tümörü, ekstra-kortikal. Metastatik hastalık hastayı otomatik olarak evre III kategorisine yerleştirir (22, 23, 27). En sık olarak, OS hastaları evre IIB'de tanı almaktadır (22) (Tablo 2).

Tablo 2. Osteosarkom evreleri

Enneking' e göre OS' un Kas-İskelet Sistemi Tümör Derneği evrelemesi	
Evre I	Düşük-grade, metastaz yok
IA	Intra kompartmental
IIB	Ekstra kompartmental
Evre II	Yüksek-grade, metastaz yok
IIA	Intra kompartmental
IIB	Ekstra kompartmental
Evre III	Düşük- ve yüksek- grade, metastaz var

2.6. Osteosarkom Tedavisi

OS için konvansiyonel tedavi, neoadjuvan ve adjuvan kemoterapinin ve cerrahinin bir kombinasyonundan oluşmaktadır (29). Kemoterapi uygulanmadan önce, cerrahi amputasyonda dahi yüksek dereceli konvansiyonel osteosarkomda % 20'den daha az sağkalım sözkonusudur, bu da cerrahi öncesi mikrometastazların (tipik olarak pulmoner) varlığını göstermektedir (30). Düşük dereceli tipik olarak tek başına eksizyon ile tedavi edilebilir ve nihai patoloji düşük dereceli olduğunu doğrularsa kemoterapi uygulanmamaktadır.

2.6.1. Cerrahi tedavi

Tümör cerrahisinin amacı, tümörün geniş eksizyonu ile hastalığın tamamen rezeksiyonunu yapmaktır (31). Cerrahi seçenekler amputasyona karşı ekstremité kurtarma şeklinde ayrılabilir.

Ekstremité kurtarma cerrahi teknikleri, OS'li hastaların% 85-90'ı için güvenli bir tedavi metodolojisi sağlamaktadır (32, 33). Rezeksiyon ve rekonstrüksiyon da dahil olmak üzere, ekstremité kurtarmanın iki temel adımı vardır. Rezeksiyon, hastalığın ortadan kaldırılması için çok önemlidir. Önceki biyopsi alanı ve yollarından en az 2 cm boşluk içermelidir.

Rekonstrüksiyon, uzuv kurtarmada bir sonraki adımdır. Klavikula veya proksimal fibula gibi ağırlık taşımayan kemiklerin, sadece eksizyonun fonksiyonel eksikliğe neden olmadığından rekonstrüksiyon gerektirmediğine dikkat edilmelidir (34). Ağırlık taşıyan kemiklerde rekonstrüksiyon uygulamaları ise, endoprotetik replasman ve biyolojik rekonstrüksiyon şeklinde ayrılabilir. Biyolojik yer değiştirme, allogreft, otogreft, geri dönüşümlü otogreftler ve allogreft protez kompozit rekonstrüksiyonlarını içeren ikincil ekstremité rekonstrüksiyonlarıdır.

2.6.2. Kemoterapi tedavisi

Osteosarkom için standart tedavi şu anda neoadjuvan kemoterapi, cerrahi ve adjuvan kemoterapidir. Neredeyse tüm tedavi rejimlerinde bulunan dört kemoterapi maddesi, lökovorin kurtarma, doksorubisin, sisplatin ve ifosfamid ile birlikte metotreksat içermektedir. Metastatik hastalığı olan hastalar da etoposid ile tedavi edilebilmektedir. Neoadjuvan kemoterapiye tümör nekroz yanıtı tedaviye verilen

toplam yanıtı belirlemektedir (35). “Doz yoğunluğu” yaklaşımı da önemlidir. Lokalize OS'lu hastaların 703 çizelgesini geriye dönük olarak incelenmiş ve ameliyattan sonra kemoterapiye devam etmek için 21 günden fazla bekleyenlerin ölüm oranlarının anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Doz yoğunluğunun korumak için ameliyat sonrası ilk 21 gün içinde kemoterapinin yeniden başlatılması önerilmektedir (36).

2.6.3. Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, şüpheli etkinliği ve buna bağlı enfeksiyon riski nedeniyle OS'nin tedavisinde tartışmalı bir role sahiptir. Düşük maliyetli rekonstrüktif modaliteye ek olarak ilginç bir uygulama Japonya'da popüler hale gelmiştir. 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada, ekstracorporeal ışınlama (ECI) aldıktan sonra sarkomlu (37'si OS olan) 101 hastayı geriye dönük olarak incelemiş ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. ECI ilgili kemiğin blok rezeksiyonu, her kemik segmentinin 50 Gy radyasyonla tedavisi ve kemiğin nihai replantasyonundan oluşmaktadır. ECI hastalık rekürrensini önlemede etkili olan, düşük bir enfeksiyon riski taşıyan düşük maliyetli bir tedavi olarak önerilmektedir (37).

2.7. Kadmiyum

Kadmiyum kronik maruziyette karsinojenik olarak bilinen bir ajandır. Ancak birçok antikanserijen ajanın toksik ve uzun vadede karsinogenezi tetikleyici olabileceği bilinmektedir. Daha önce kadmiyumla ilgili yapılmış olan deney hayvanı çalışmalarına bakıldığında 1991 yılında Waalkes ve arkadaşlarının Fischer türü sıçanlarda kadmiyumum subkutan uygulamasının kronik karsinojenik ve toksik etkilerini değerlendirdiği görülmektedir (38). Kadmiyumun kemik dokusu üzerine direk etkileri literatürde tanımlanmıştır. Fetal ratlarda kemik resopsiyonunu arttırdığı, embriyonik civciv femur kültürlerinde kalsifiye ankalsifiye osteois dokuyu azalttığı, embriyonik civciv tibialarında kalsiyum salınımını arttırdığı görülmüştür (39, 40). Kadmiyuma maruz bırakılan osteosarkom hücrelerinde apoptoz oluştuğu ve kadmiyumun kemik metabolizmasını sıçan Osteosarkom modelinde, kalsiyum metabolizmasını kollajen sentezinin bozarak ve istenmeyen protein kinaz C aktivasyonu yoluyla da etkilediği bildirilmiştir.

Bunun haricinde kadmiyumun deney hayvanında kemik çimentosu içine absorbe edilerek yapılmış bir kanser çalışması da literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmada kadmiyumum DNA hasarı oluşturarak lokal olarak ameliyat sonrası bölgede kalmış olabilecek tümör hücrelerini öldürücü ya da proliferasyonlarını azaltıcı etkisinin olup olmayacağı test edilmiştir.

2.8. Kemik Çimentosu

Yaygın olarak kemik çimentosu olarak anılan Polimetilmetakrilat (PMMA), 50 yıldan uzun süredir ortopedik cerrahi prosedürlerde kullanılmaktadır. Daha öncesinde Gluck 1870’li yıllarda diz protezi fiksasyonunda alçı ve kolofan (reçine) ile oluşturduğu çimentoyu kullanmıştır (41). Alman biliminsanı Rohm PMMA ürünü olan plexiglası 1933 yılında tariflemiştir (42). PMMA toz polimeri ve sıvı monomerinin benzoil peroksit ile karıştırılarak sertleşmesi ise 1936’da Kulzer tarafından ortaya konmuştur (43). Ancak bu tepkimenin gerçekleşmesi için karışımın 100 °C’ye ısıtılması gerekmektedir. PMMA’nın klinik kullanıma girebilmesi ancak Degusa ve Kulzer tarafından oda sıcaklığında tepkimeyi sağlayabilecek bir başlatıcı ekleme sonrasında olmuş ve başlangıçta diş hekimleri tarafından yaygın olarak kullanılmıştır (44). Ortopedide kemik çimentosunun ilk kullanan ise 1958 yılında diş hekimlerinin bu malzemesini kendi adıyla ünlene çimentolu kalça protezi uygulamalarında tarif eden Charnley olmuştur (45).

PMMA; karıştırıldığında ısı açığa çıkaran (ekzotermik) bir tepkimeye yol açan sıvı haldeki metilmetakrilat monomeri ve toz haldeki polimerden oluşmaktadır. Karıştırılma öncesinde tepkime oluşmasını engellemek için stabilizatör amaçlı hidrokinon içermektedir. Tepkimenin oda sıcaklığında oluşabilmesini sağlamak için tozun içerisine başlatıcı benzoil peroksit ve hızlandırıcı olarak toludin sıvının içerisine eklenmektedir (41). Bunun yanında kemik çimentosunun röntgenlerde görüntülenebilmesini sağlamak amacıyla radyoopak baryumsülfat veya zirkonyumdioksitten faydalanılmaktadır (46). Kemik çimentosu içerisine sonradan veya üretim aşamasında başta gentamisin, vankomisin, tobramisin olmak üzere antibiyotikler de eklenebilmektedir (47). Ancak kemik çimentosuna eklenecek her malzemenin biyomekanik dayanıklılığı da değiştireceği unutulmamalıdır.

Kemik imentosu yapıştırıcı değil tutunucu bir malzemedir. Ortopedik cerrahide kemiğin içerisine girerek implantı sabitlemekte ya da boşlukları doldurmakta kullanılmaktadır. Uygulama sonrası doku içerisinde oluşan ekzotermik tepkimenin ısı artışı ile protein denatürasyonu, damar uçlarında termal koagulasyon ve monomerlerin hücre toksisitesi gibi lokal etkileri de mevcuttur (48).

Kemik imentosunun boşluklar içeren yapısı ilaçların ilgili bölgeye lokal olarak uygulanmasını sağlamaktadır. Çimento içine katılan ilaçların dokuda yavaşça salınarak uzun süre yüksek konsantrasyonlarda etki göstermesi hedeflenmektedir. Kemik imentosunun bu amaçla kullanımının en yaygın şekli ortopedik enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikli imento uygulamalarıdır. Bunun yanı sıra son yıllarda ortopedik tümörlerin tedavisinde metotreksat, doksorubisin, sisplatin gibi ilaçların kemik imentosu içerisinde uygulanmaları üzerine çalışmalar yapılmaktadır (49,50). Yine kemik imentosu içerisine bifosfonatların (pamidronat, zolendronik asit) eklenmesi de multipl miyelom, dev hücreli tümör ve metastatik karsinomlarda izlenen osteolizi tedavi etmek için denenmektedir (51).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Subkutan ksenograft nude fare osteosarkom tümör modelinde cerrahi rezeksiyon sonrası lokal olarak bu bölgeye konulacak kemik çimentosu içindeki kadmiyum ile rezidü tümör ve rekürrens olasılığı önlemesi üzerine etkinliğinin edilmesinin amaçlandığı bu çalışma deneysel çalışma olarak planlandı.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın hücre kültürü bölümü, sakrifikasyon sonrası immünohistokimyasal, akımsitometrik ve diğer analizler Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim dalında, in vivo deney hayvanı modeli deneyleri, cerrahi girişimler ve sakrifikasyon Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Araştırmaya Ekim 2017'da başlandı ve veri toplama işlemi Aralık 2018'de sonlandırıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda üretilen nude farelerle deneysel olarak gerçekleştirildi. Atimik nude farelerin onkoloji araştırmalarında tümör modeli oluşturma açısından sağladığı pratik avantajlar nedeniyle literatürde yapılan araştırmalar sonucunda model indüksiyonu açısından nude farelerin kullanıldığı görülerek bu model seçildi.

Çalışmada 8 haftalık ortalama ağırlıkları 30 gr olan, 35 adet dişi atimik nude fareler rastgele seçilerek, her biri 7 fare içeren beş grup oluşturuldu.

Grup K (n: 7) : Kontrol tümör grubu

Grup I (n: 7) : Totale yakın tümör rezeke edilip takip edilen Fare grubu

Grup II (n: 7) : Totale yakın tümör rezeke edilip kemik çimentosue kadmiyum emdirilerek lokal salınımı yoluyla uygulanan Fare grubu

Grup III (n: 7) : Totale yakın tümör rezeke edilip kemik çimentosue SF emdirilerek lokal salınımı yoluyla uygulanan Fare grubu

Grup IV (n: 7) : Total tümör rezeke edilip takip edilen Fare grubu

3.4. Çalışma Materyali

Ortalama ağırlıkları 30 gr olan, 8 haftalık 35 adet dişi atimik nude fare Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (DEÜTFDHAD) sağlandı. Fareler çalışma süresince oda ısısında (20 ± 2 °C) ve 12'şer saatlik aydınlık / karanlık ortamında tutulup, steril edilebilen pellet fare yemi ile beslendi, steril suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce fareler bir hafta süreyle bu ortamda izlenip ortama uyum göstermeleri sağlandı.

Diğer materyaller:

- ✓ Tunel kit
- ✓ Annexin v fitc apoptosis detection kit
- ✓ İnkübatör ana kartı (thermo için)
- ✓ Kemik kemik çimentosui
- ✓ Atimik nude fare
- ✓ Tüp rakı renkli plastik
- ✓ Kriyotüp kutusu (cryo box)
- ✓ Mikrofiltre 70 mikrom steril
- ✓ Otoklav bandi buhar
- ✓ Petri kutusu 15mm çapında
- ✓ Alüminyum folyo
- ✓ Fare yemi (patojenlerden arındırılmış tip) - 5 kg

- ✓ Otomatik pipet seti (0,5-10; 10-100; 100-1000 ul)
- ✓ Pipet tabancası 1-100 ml (pipette aid)
- ✓ Manuel pipet steril 2 ml
- ✓ Manuel pipet steril 10 ml
- ✓ Hücre kazıyıcı (cell scraper)
- ✓ Lam saklama (taşıma) kutusu, 100 lamlık
- ✓ Penisilin / streptomisin
- ✓ D-PBS (dulbecco fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
- ✓ K7M2 osteosarkom hücre hattı
- ✓ RPMI-1640 medium 500 ml
- ✓ FBS fetal dana (fetal bovine) serum inaktive edilmiş 100 ml
- ✓ DMEM [dulbecco's modified eagle medium] 500 ml.
- ✓ Pastör pipeti 3 ml
- ✓ Gazlı bez (7.5x7.5 cm)
- ✓ Lam 100lük
- ✓ Pipet ucu mavi 0-1000 mikrol
- ✓ Flask 75 cm²
- ✓ Pipet ucu sarı 20-200 mikrol
- ✓ Filtreli santrifüj tüpü 4 ml (24 adet/paket)

- ✓ Yüzey kapaklı kuyucuklu slayt
- ✓ Flask 25 cm²
- ✓ Kriyovial steril, polipropilen 2 ml.
- ✓ Lamel 24x50 100lük
- ✓ Eldiven pudrasız lateks
- ✓ Lam polilizin kaplı
- ✓ İnsülin enjektörü (100 ad/kutu)
- ✓ Bistüri ucu no:24 (100 ad/kutu)
- ✓ Deney hayvanları altlığı
- ✓ Kadmiyum standart solüsyonu
- ✓ Tripsin EDTA solüsyon
- ✓ L-glutamin

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımlı değişkeni: Tümör boyutundaki değişim, apoptoz, nekroz, canlılık

Araştırmanın bağımsız değişkeni: Gruplar

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre kültürü ve Kadmiyum emdirilmiş kemik çimentosunun in vitro değerlendirilmesi

Kullanılan ajanların in vivo osteosarkom nude fare modelindeki etkisinin belirlenmesinden önce doz optimizasyonları için K7M2 hücre hattında canlılığına etkisinin in vitro araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle hücreler %10 fetal bovin

serum içeren DMEM ortamında (%1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin'li) kültüre edildikten sonra 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler yaklaşık 2x10⁶ düzeyine eriştiğinde tripsin-edta solusyonu ile flask yüzeyinden kaldırılarak 96 kuyucuklu plate içine 6 kuyucuk/ grup ve kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Bu plate, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunması için 24 saat beklendikten sonra hücrelerin kalkmamasına dikkat edilerek üst fazlar pipetlenip uzaklaştırılacak ve kadmiyum sülfatın farklı dozları (0, 0.1 uM, 0.25 uM, 0.5 uM, 1 uM, 2 uM, 2.5 uM, 4 uM, 5 uM) verilerek; Plate 24 saat 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresi bittiğinde WST-1 ile hücre canlılığı tayini yapıldı. Kemik çimentosu içinden salınımı en uygun olacak doz aşağıda detayları verilen optimizasyon deneylerimize göre belirlenerek hayvan deneyi için rehber alındı.

MG-63 ve K7M2 osteosarkom hücre hatları sırasıyla MEM ve DMEM kültür ortamları içerisinde (%10 FBS, %1 penisilin- streptomisin ve %1 L-glutamin ilaveli) 37°C 'de %5 CO₂ koşullarda inkübe edildi. Deney grupları için hedeflenen hücre sayısına ulaşıldıktan sonra 10 mg/ml dozdaki kadmiyum ve PMMA kemik çimentosu (Biomet Bone Cement, Biomet Orthopedics Warsaw, Indiana, ABD) ile iki farklı in vitro uygulama yapıldı. İlk grupta kadmiyum çözeltisi 5–10–15–20–25–50–100–200–300–400–500 kat seyreltilerek dondurulmuş haldeki çimentoya emdirildi ve hücrelerin bulunduğu kuyucuklarda 24 saat bekletildi. Bir diğer uygulama şekli ise 20 kat seyreltilmiş dozdaki kadmiyum çözeltisinin toz haldeki kemik çimentosu polimerine eklendikten sonra sıvı monomeri ile karıştırılarak hazırlanmasını takiben hücre hattını içeren kuyucuklara sayısı artan sement parçaları eklendi ve 24 saat sonra değerlendirildi. Süre sonunda sementler kuyucuklardan çıkarılarak WST-1 yöntemi ile hücrelerin canlılıkları değerlendirildi. Diğer taraftan sementsiz sadece kadmiyum çözeltisinin seyreltilmiş dozları da MG-63 hücrelerine uygulanarak 24 saat sonunda hücre canlılığı değerlendirildi. Kadmiyum eklenmeden sadece kemik çimentosunun hücre hatlarına uygulandığı grup ise çalışmanın son grubunu oluşturdu. Her üç gruba da uygulanan çimento şekillerinin por yapıları da mikroskopik düzeyde incelendi.

Her iki osteosarkom hücre hattında da kadmiyumun hücre proliferasyonunu doz bağımlı olarak azalttığı tespit edildi. Tek başına kadmiyum uygulandığında MG-

63 hücrelerinde 5 ve 10 kat seyreltmeler en yüksek anti-proliferatif etkiyi gösterdi (%25 ve %42 canlılık. Kadmiyumun donmuş çimentoya emdirilerek uygulandığı grupta ise daha yüksek seyreltmelerde, tek başına uygulandığı aynı seyreltme koşullarına göre daha etkin anti-proliferatif etkinlik görüldü. Kadmiyum eklenip karıştırılarak hazırlanan çimentonun uygulandığı grupta ise; donmuş çimentoya emdirilerek uygulandığı gruptan daha yüksek sitotoksik etki tespit edildi. Sementin kadmiyumsuz uygulandığı grupta ise %80'lere ulaşan yüksek canlılık gözlemlendi.

3.6.2. Fare ksenograft modelinin oluşturulması

Çalışmada 8 haftalık ortalama ağırlıkları 30 gr olan, 35 adet dişi atimik nude fareler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında (DEÜTFDHAL) hepafiltre ile havalandırması olan özel bir odada tutularak ve serbestçe yem ve suya ulaşmaları sağlandı. Fareler çalışma boyunca oda ısısında ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve onikişer saatlik aydınlık/ karanlık ortamda tutulup, steril edilebilen pellet fare yemi ile beslenmesi ve steril suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce fareler bir hafta süreyle bu ortamda izlenip ortama uyum göstermeleri sağlandı.

Atimik nude farelere 1×10^6 hücre/mL K7M2 osteosarkom hücresinin femur içine enjeksiyonu ile tümör gelişimi sağlandı. Oluşturulan tümör hacmi 150 mm^3 'e ulaştığında (yaklaşık 10 gün) her bir grupta $n=7$ olacak şekilde fareler randomize edilerek, hayvanlarda 15 günlük süreç içerisinde tümör oluşumu tespit edilmeyenlere aynı miktardaki K7M2 hücreleri subkutan sağ kalça üzerine enjekte edilerek tümör oluşumu değerlendirilmeye alındı.

Çalışma grupları oluşturulmadan önce çalışma optimizasyonu için alınan 5 farede tümör oluşumu optimize edildi. Kemik çimentosu içine kadmiyum emdirildikten sonra hayvandaki adaptasyonu ve salınımı izlendi.

Cerrahi girişim klas 2 kabinette hepafiltre çalışırken gerçekleştirildi. Girişimsel işlemler öncesinde farelere ketamin 35mg/kg, ksilazin 5mg/kg kombinasyonu ile genel anestezi uygulandı. Batikonla lokal insizyon yeri temizliği sonrası cilt ciltaltı kesilip tümör görölerek ve gruplara göre tümü ya da 15 mm^3

tümör kalacak şekilde opere edildi. Hemostaz sağlanıp, lokal maddeler uygulanıp steril sütürlerle kapatıldı. Post operatif bakım IVC kafeslerde yapıldı.

3.6.3. Kimyasallar

Kadmiyum: Sigma A.Ş.'den temin edildi. 1 cc SF ve Kadmiyum kemik çimentosu içine emdirilerek kemik çimentosu post-operatif yerleştirilmesi ile lokal salınımı gerçekleştirilerek hayvana uygulandı.

Kemik Çimentosu: Dokuz Eylül Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğimizde cerrahi uygulamalarda rutin kullanımda olan Biomet Bone Cement (Biomet Orthopedics Warsaw, Indiana, ABD) deney grubuna uygun biçimde kadmiyum ve SF eklenerek kullanıldı.

3.6.4. Farelerin araştırmadan çıkarılma kriterleri

Çalışma süresince sepsis gelişmesi, veterinerin uygun görmesi halinde ve uyarılara belirgin derecede azalmış yanıt verme durumunda fareler çalışmadan çıkarılmak üzere gözlemlendi. Ağırlığının % 15'inden fazlasını kaybeden hayvanlar çalışma dışı bırakılması ve böyle bir durumda her bir grupta 5 adet fare olması sağlanana dek yeni farelerle çalışmaya devam edilmesi ve kayıplardan etik kurulun haberdar edilmesi planlanmıştı. Ancak çalışma süresince takiplerde kaybedilen veya çalışmadan çıkarılmak durumunda kalınan hiç hayvan olmamıştır.

3.6.5. Farelerin sakrifikasyonu, organ ve dokuların disseke edilmesi

Operasyondan 15 gün sonra fareler sakrifiye edildi. Fareler feda edilmeden önce eter inhalasyon anestezisi şeklinde uygulandı. Farelerin organ ve dokuları disseke edilerek, rezidü tümör yatağı disseke edilip formol içine konarak ışık mikroskopik analizlere ayrıldı.

3.6.6. Parafin Kesitte Tunel İle Apoptoz Analizi

Kesitler, bir gece 60°C etüvde tutulup soğutulduktan sonra 2 şer defa 30 dk ksilen içerisinde bekletildi. Hayvanın kodu, alınan örnek ve lamın üzerine kurşun kalemle yazılarak kaydedildi. Parafin kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde ikişer dk tutulup fosfat tamponunda 5 dk yıkandı. Kesitlerin çevreleri

sınırlayıcı kalem ile çizilip 1:500 dilüsyon oranındaki Protinaz K solüsyonu damlatılarak 15 dk oda sıcaklığında tutuldu. PBS solüsyonu ile 3 defa 5 'er dk yıkamanın ardından endojen peroksit blokajı yapıldı. (% 3 H₂O₂) (5 dakika). PBS solüsyonu ile 3 defa 5'er dk yıkamadan sonra equilibration tampon solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında yıkandı. Her bir kesit için 77 µl tampon solüsyonuna 33 µl TdT eklenerek örnek başına 100 µl TdT solüsyonu hazırlanmış oldu ve kesitler üzerine damlatıldı. TdT konmuş kesitlerin üzerine solüsyonun iyice yayılması için plastik lamel konularak 37°C sıcaklıkta 1 saat bekletilerek süre sonunda reaksiyon durdurma tampon solüsyonu hazırlanarak (1 ml durdurucu yıkama tamponu ve 34 ml distile su karıştırılarak) 10 dk oda sıcaklığında yıkandı. Anti-digoxigenin konjugatı ile 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkayıp DAB solüsyonu damlatıldı ve 5 ile 10 dk kadar kapalı ve nemli kutuda bekletildi. PBS solüsyonu ile 3 defa 5'er dk yıkandıktan sonra distile su ile de yıkama yapıldı ve Mayer'in hematoksileni ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 1-5 dk boyama yapıldı. Distile su ile yıkamanın ardından sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 1'er dakika bekletilip kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilende şeffaflaştırıldı ve lamel kapatma solüsyonu kullanılarak kesitler kapatıldı.

3.6.7. Değerlendirme yöntemleri

Steril koşullarda sakrifiye edilen fareler sırttan açılarak tümör dokusu alınmıştır. Gerekli doku takip işlemlerinden sonra dokularda histopatolojik incelemelerle değerlendirmeler yapılmıştır. TUNEL yöntemi Parafin bloktan hazırlanan 5 mikrometre kalınlıkta polilizin kaplı lamlardaki TUNEL yöntemi ile apoptoz boyaması yapılmıştır. Değerlendirme 5 farklı alanda 1000'er hücrede sayım yapıp yüzde ortalama olarak kaydedilmiştir. Tümör dokusundaki nekrotik alanlar ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir. Ayrıca lokalize olarak yerleştirilen kadmiyumun sistematik olarak bir etkisinin olup olmadığı sakrifikasyon sırasında alınan karaciğer, böbrek dokularında histopatolojik olarak ve TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiştir.

3.6.8. Anneksin V- propidyum iyodür boyama protokolü ile akım sitometrik apoptoz değerlendirilmesi

Kontrol grubu olan farelerin tümörleri ve diğer gruplardaki eksizyon sırasında alınan (primer) ve eksizyon sonrasında tekrarlayan, nüks tümör örnekleri taze olarak RPMI hücre kültür ortamında akım sitometri çalışmasına hazırlandı. Tümörler medium içerisinde küçük parçalara ayrılıp filtreden geçirilerek tek hücre süspansiyonu elde edildi. 1200 rpm de 5 dk santrifüj edilen hücreler 200 ul PBS içerisinde resüspanse edildi. Her örnek için 100 ‘er ul hücre süspansiyonu doğru kapılama amaçlı kullanılacak, boyasız “*unstained*” tüpüne aktarıldı. Kalan 100 ul ise anneksin V ve PI boyaması için diğer 5 ml lik polistren akım sitometri tüpüne alındı. Boyama boyunca tüpler buz içerisinde muhafaza edilerek, ışıktan korumak amaçlı tüplerin etrafı alüminyum folyo ile sarıldı. Boyama yapılacak tüplere FITC konjuge edilmiş olan Anneksin V ‘den 5 ‘er ul, PI ‘dan 10 ‘ar ul eklendi. Tüpler +4 °C ‘de 15 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında taze olarak 10x Anneksin V bağlayıcı tampon dilüe edilerek PBS ile 1x lik konsantrasyona getirildi. İnkübasyon sonunda 1x anneksin bağlayıcı tampondan tüm tüplere (*unstained* ve anneksin V- PI içerenlere) 400 ‘er ul eklendi. BD Accuri C6 akım sitometri cihazı ile tüpler uygun kapılamalar alınarak apoptoz, nekroz ve canlılık açısından değerlendirildi.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizi, SPSS istatistik programının 24.0 versiyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler ortalama±standart sapma biçiminde verildikten sonra iki grup arası karşılaştırmalar nonparametrik Mann-Whitney U; ikiden fazla gruplar arası Kruskal Wallis testleri ile yapıldı. P değeri 0.05’den düşük olarak anlamlılık düzeyinde kabul edildi.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu araştırmada deney hayvanı kullanıldığı için tümör oluşum süresinin standart olmaması, eş zamanlı olarak tüm grupların sakrifikasyonunun gerçekleştirilememesi gibi araştırma sınırlılıkları ile karşılaşıldı. Ancak ksenograft

alışmalarında bu sınırlılıklar sıklıkla karşılaşıldığı için araştırma bulgularına olumsuz bir etkisinin olmadığı göz önünde bulundurulmuştur.

3.9. Etik Kurul Onayı

Tüm alışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 41/2014 protokol no'lu 01.07.2014 gün ve 01/13/2014 sayılı etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Apoptoz Bulguları

Kontrol grubundaki hayvanlar 1/17, 2/17, 12/17, 13/17, 24/17 ve 34/17 olarak kodlandı. Bu hayvanlarda herhangi bir ek uygulama yapılmadığı için sadece ilk tümörlerinde apoptoz, nekroz ve canlılık değerlendirildi. Buna göre; apoptoz yüzdeleri sırasıyla % 6,9, % 1,1, % 3,8, % 2,3, % 4,5 ve % 2,1 olarak bulundu. Nekroz oranları sırasıyla; %1,8, %9,7, %3,1, %4,3, %2,1 ve % 4 olarak bulundu.

Total eksizyon yapılan gruptaki hayvanlar 10/17, 11/17, 14/17, 15/17 ve 16/17 olarak kodlandı. 10/17 kodlu hayvanın tümör dokularından yeterli sayıda akım sitometri analizine uygun hücre elde edilemediğinden verisi bulunmamaktadır. Bu hayvanlarda totale eksizyon yapıldığı zaman toplanan tümör dokuları ilk tümör olarak adlandırıldı. Bu tümörlerde apoptoz oranları sırasıyla; %3,3, %0,4, %1,8 ve %0,4 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %4,1, %4, %2,6 ve %1,7 olarak bulundu. Total eksizyon sonrası tekrar gelişen tümör ise nüks olarak adlandırıldı. Bu tümörlerdeki apoptoz oranları sırasıyla; %0,9, %1,8, %0,4 ve %0,7 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %4,2, %3, %3,8 ve %5,1 olarak bulundu.

Totale yakın eksizyon yapılan gruptaki hayvanlar 3/17, 4/17, 5/17, 6/17, 7/17 ve 8/17 olarak kodlandı. Bu hayvanlarda totale yakın eksizyon yapıldığı zaman toplanan tümör dokuları ilk tümör olarak adlandırıldı. Bu tümörlerde apoptoz oranları sırasıyla; %3,3, %10,8, %1,9, %3,7, %0,1 ve %3,6 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %3,9, %9,7, %11,7, %1,2, %2,1 ve %2,1 olarak bulundu. Totale yakın eksizyon sonrası tekrar gelişen tümör ise nüks olarak adlandırıldı. Bu tümörlerdeki apoptoz oranları sırasıyla; %0,2, %0,5, %1,9, %2,3, %3 ve %4,3 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %2,2, %3,7, %4,2, %1,3, %3,5 ve %1,9 olarak bulundu.

Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruptaki hayvanlar 19/17, 20/17, 21/17, 22/17, 23/17, 32/17 ve 33/17 olarak kodlandı. Bu hayvanlarda totale yakın eksizyon

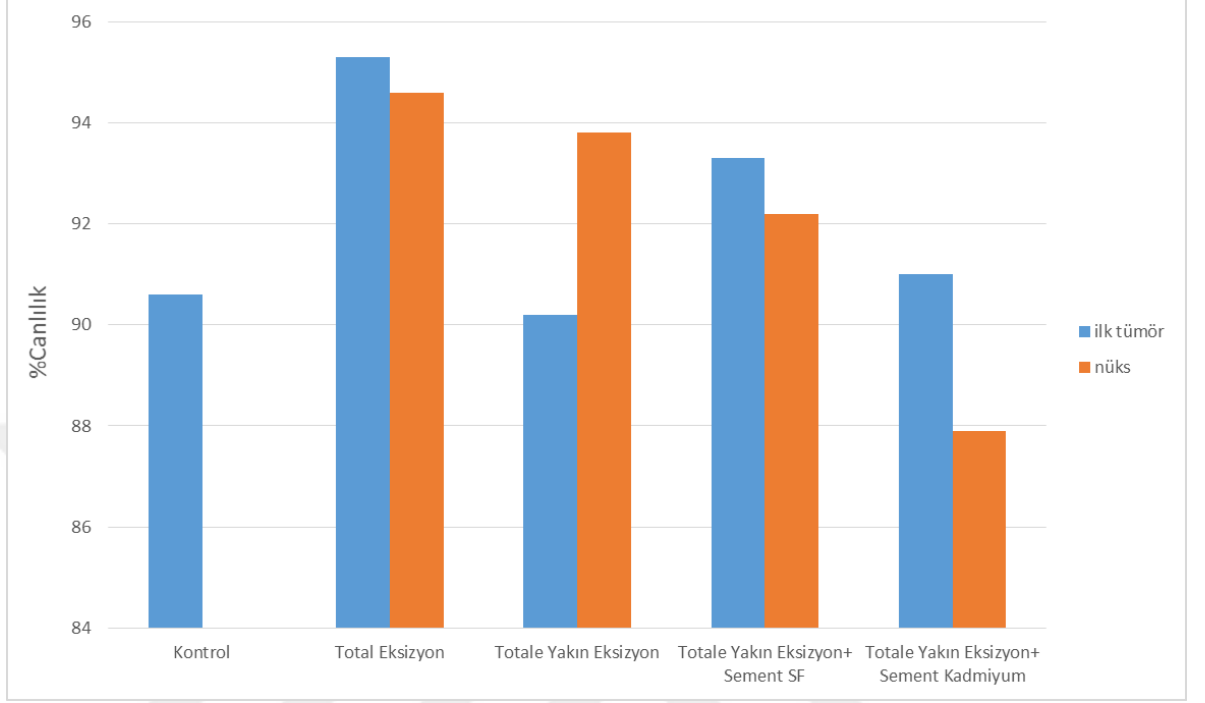
yapıldığı ve serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inokülasyonu öncesi toplanan tümör dokuları ilk tümör olarak adlandırıldı. Bu tümörlerde apoptoz oranları sırasıyla; %3,8, %0, %1,3, %0, %0,8, %0,2 ve %0,2 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %6,6, %0,1, %8,5, %0,2, %10, %5,9 ve %4,4 olarak bulundu. Totale yakın eksizyondan sonra serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inokülasyonu ardından tekrar gelişen tümör ise nüks olarak adlandırıldı. Bu tümörlerdeki apoptoz oranları sırasıyla; %7, %4,8, %1,3, %0, %1,3, %1,3 ve %0,5 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %3,5, %4, %4,7, %0, %6,2, %30,7 ve %4,9 olarak bulundu.

Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruptaki hayvanlar 25/17, 26/17, 27/17, 28/17, 29/17, 30/17 ve 31/17 olarak kodlandı. Bu hayvanlarda totale yakın eksizyon yapıldığı ve kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inokülasyonu öncesi toplanan tümör dokuları ilk tümör olarak adlandırıldı. Bu tümörlerde apoptoz oranları sırasıyla; %0,9, %14,2, %10,3, %3,1, %2,6, %1,2 ve %0 olarak bulundu.

Nekroz oranları ise sırasıyla; %1,8, %7,4, %3,5, %7,6, %2,1, %1 ve %0 olarak bulundu. Totale yakın eksizyondan sonra kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inokülasyonu ardından tekrar gelişen tümör ise nüks olarak adlandırıldı. Bu tümörlerdeki apoptoz oranları sırasıyla; %1,6, %9,4, %4,9, %5,2, %2,8, %3 ve %0,5 olarak bulundu. Nekroz oranları ise sırasıyla; %4,5, %5,1, %5,2, %7,3, %2,6, %1,5 ve %3,6 olarak bulundu.

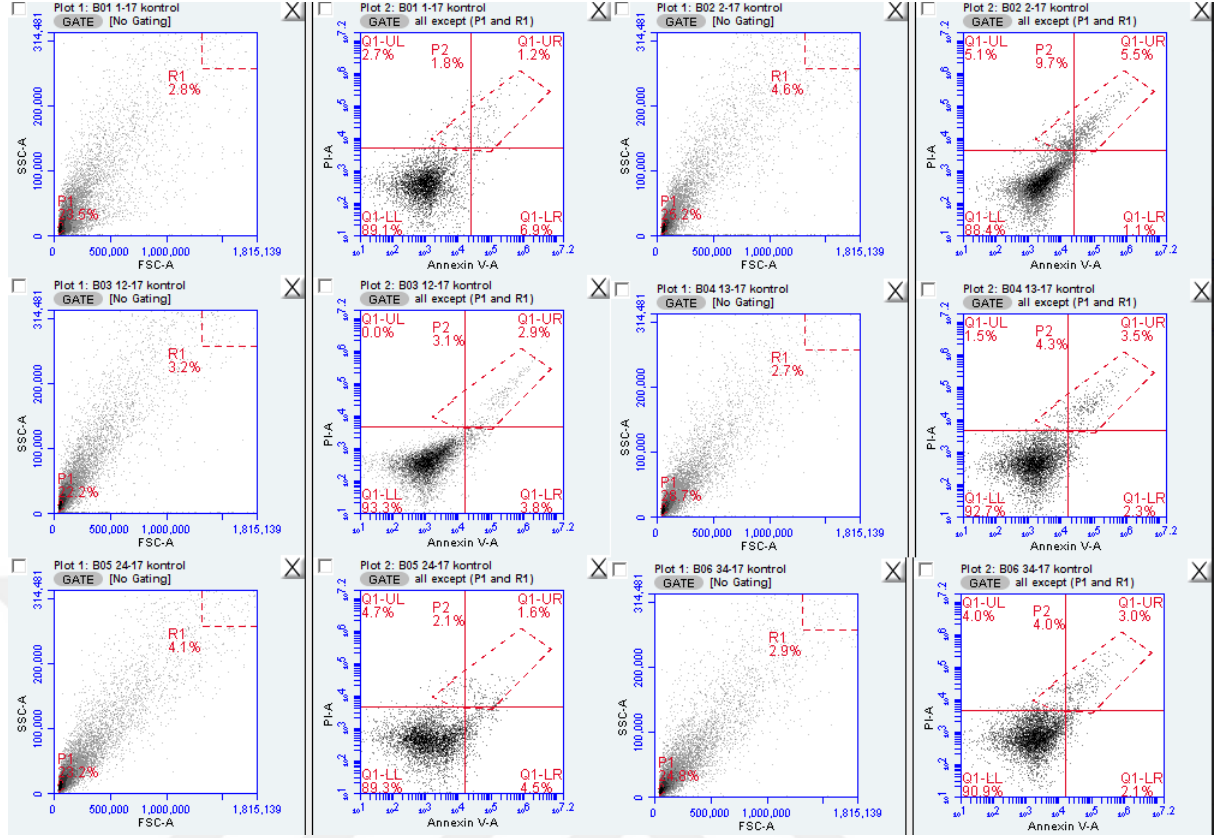
Tüm gruplardaki canlılık yüzdelerinin ortalamaları değerlendirildiğinde kontrol grubunda canlılık ortalama %90,6 bulundu. Total eksizyon grubundaki ilk tümörlerin canlılık ortalaması %95,3 iken nüks tümörlerinde %94,6 bulundu. Totale yakın eksizyon grubundaki ilk tümörlerin canlılık ortalaması %90,2 iken nüks tümörlerinde %93,8 bulundu. Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruptaki hayvanların ilk tümörlerindeki canlılık ortalaması %93,3 iken nüks tümörlerinde %92,2 bulundu. Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruptaki hayvanların ilk tümörlerindeki canlılık

ortalaması %91 iken minimal nüks tümörlerinde %87,9 bulundu. İlgili grafik şekil 1 de görülmektedir.



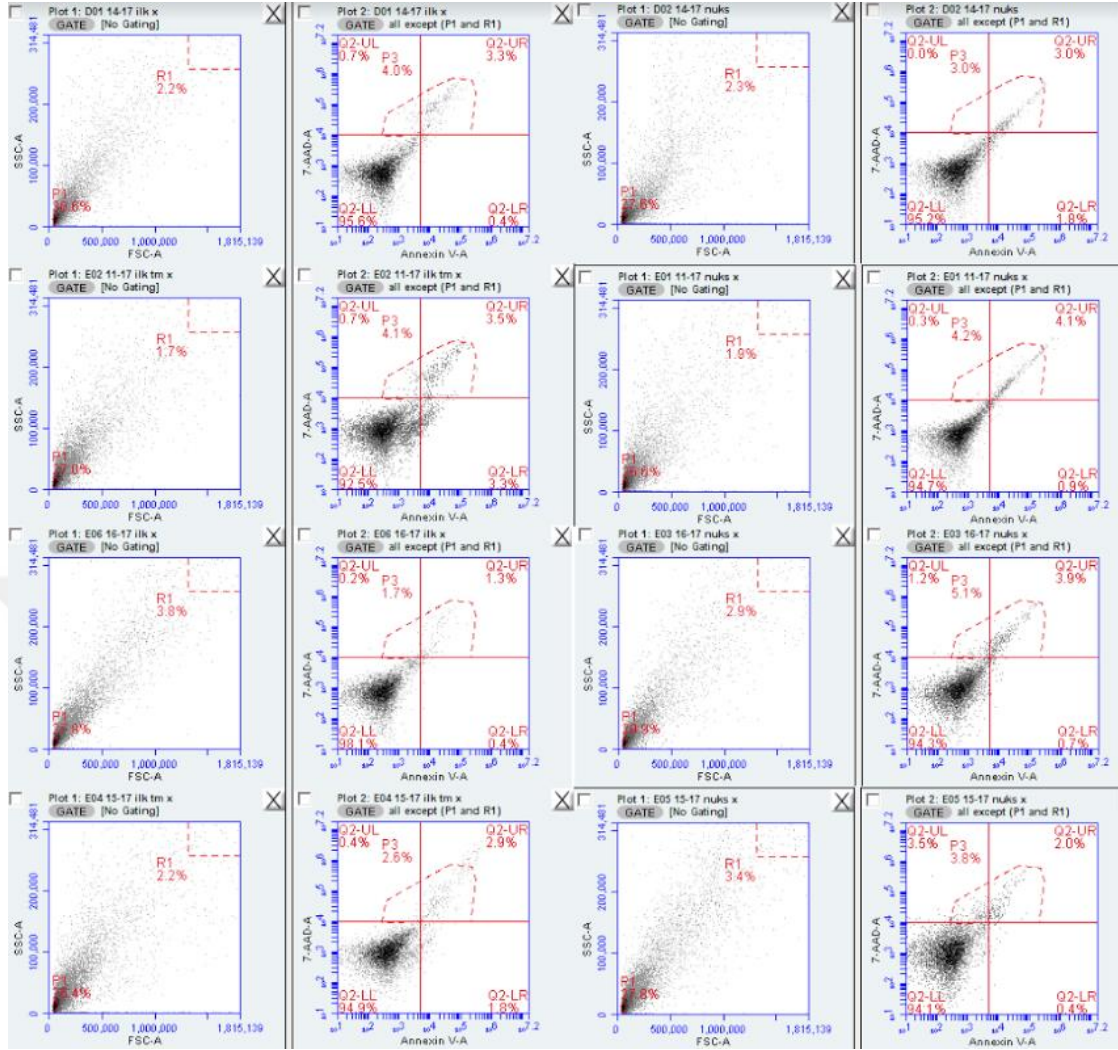
Şekil 1. Tüm gruptaki canlılık yüzdelerinin ilk ve nüks tümörlerde ortalama dağılımları

Uygun kapılamalar ardından tespit edilen kontrol grubuna ait *dot plot* analiz diyagramları şekil 2 de gösterilmektedir.



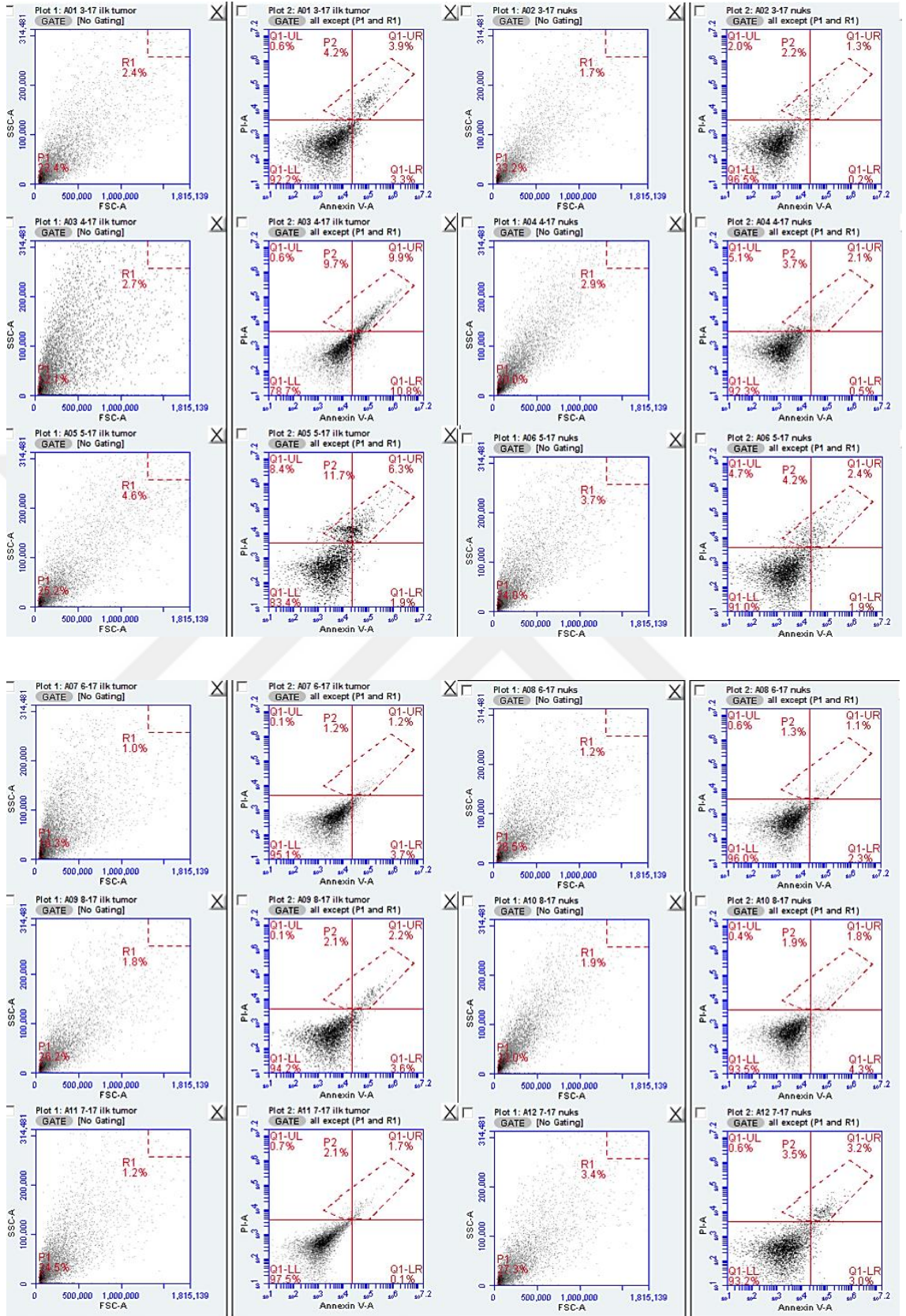
Şekil 2. Kontrol grubunun *dot plot* analizi

Uygun kapılamalar ardından tespit edilen total eksizyon grubuna ait *dot plot* analiz diyagramları şekil 3 de gösterilmektedir.



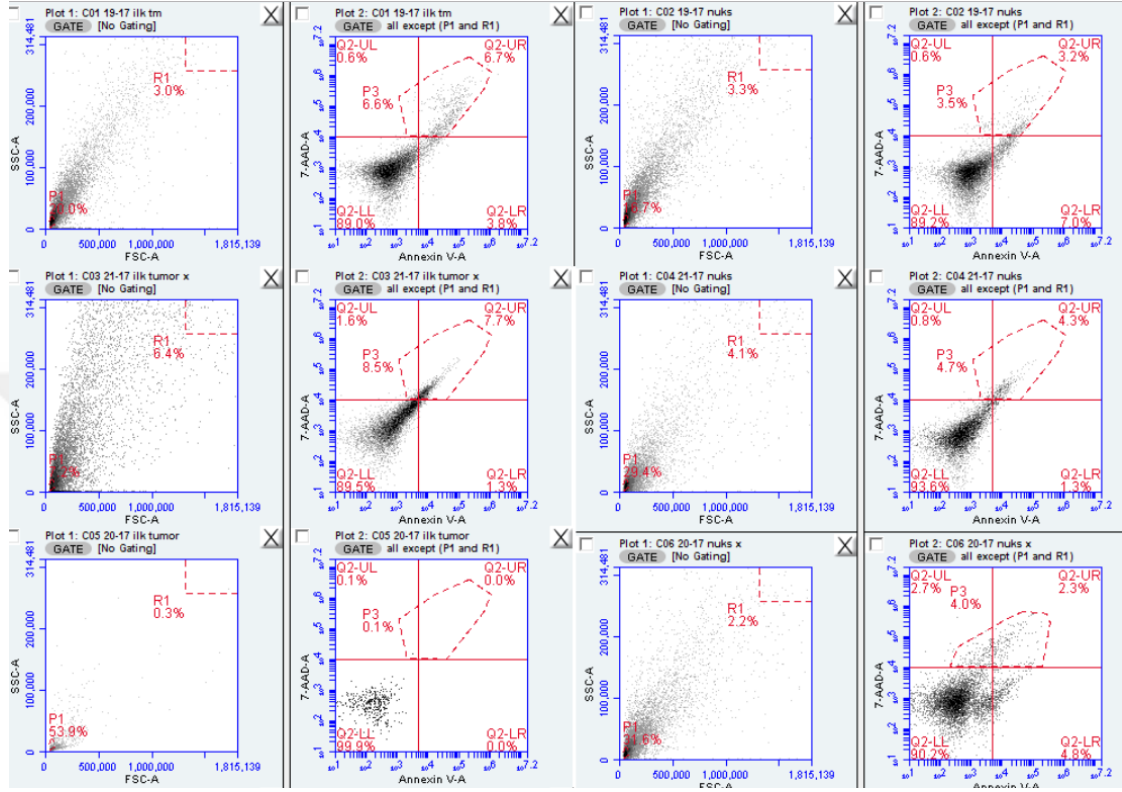
Şekil 3. Total eksizyon grubunun *dot plot* analizi

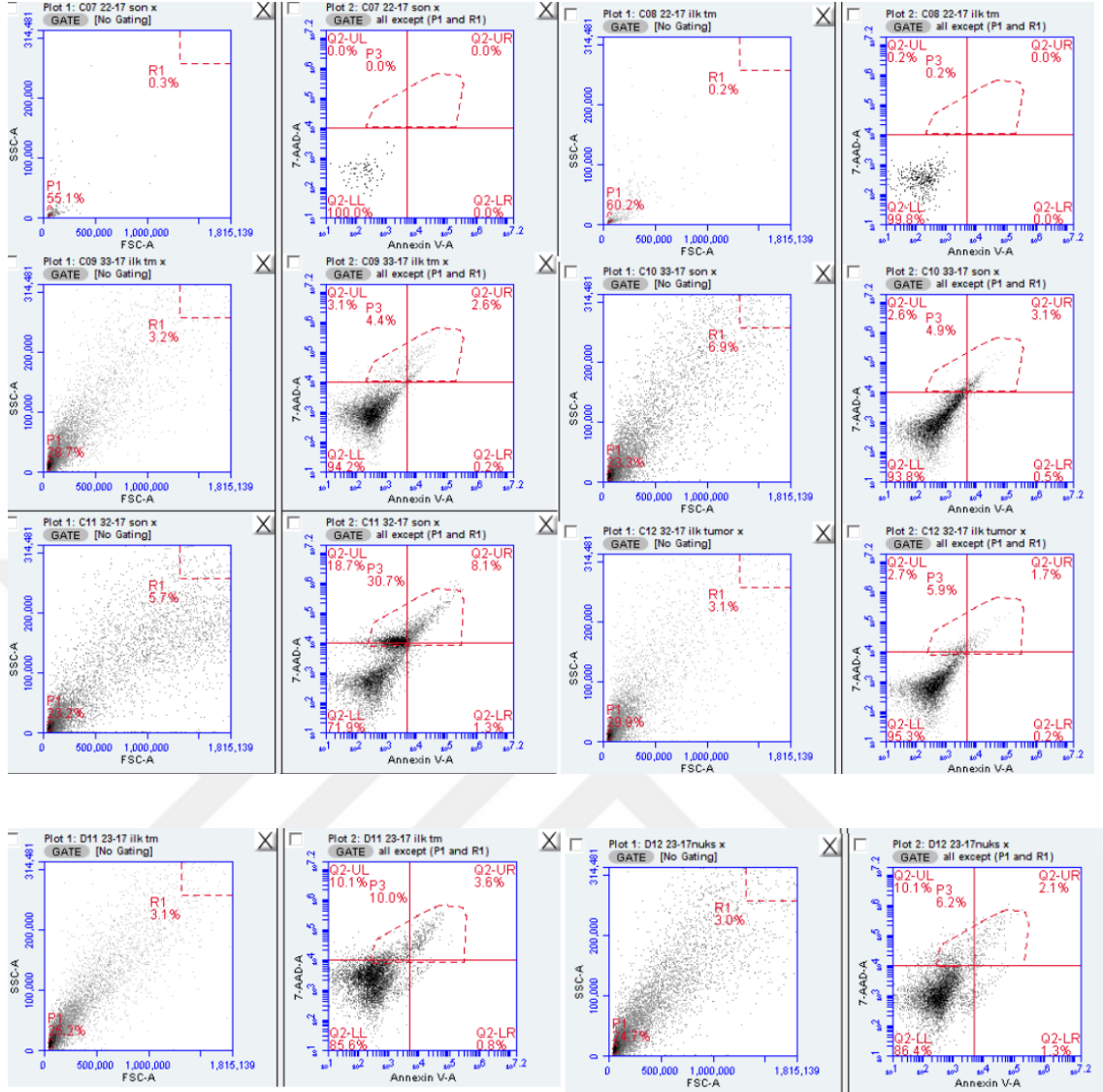
Uygun kapılamalar ardından tespit edilen totale yakın eksizyon grubuna ait *dot plot* analiz diyagramları şekil 4 de gösterilmektedir.



Şekil 4. Totale yakın eksizyon grubu *dot plot* analizi

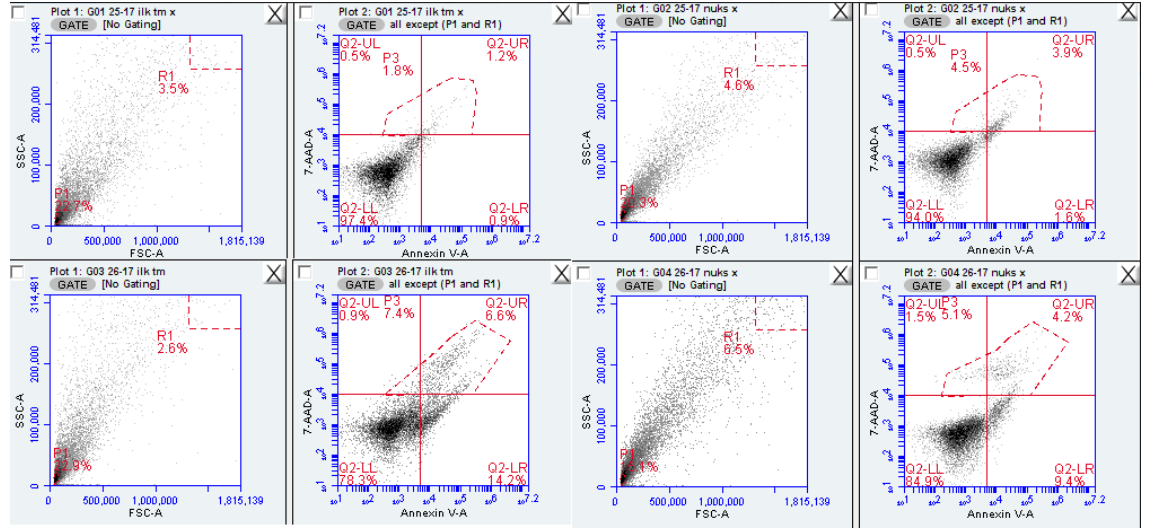
Uygun kapılamalar ardından tespit edilen totale yakın eksizyon yapılan ve ardından serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruba ait *dot plot* analiz diyagramları şekil 5 de gösterilmektedir.





Şekil 5. Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından serum fizyolojik ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruba ait *dot plot* analizi

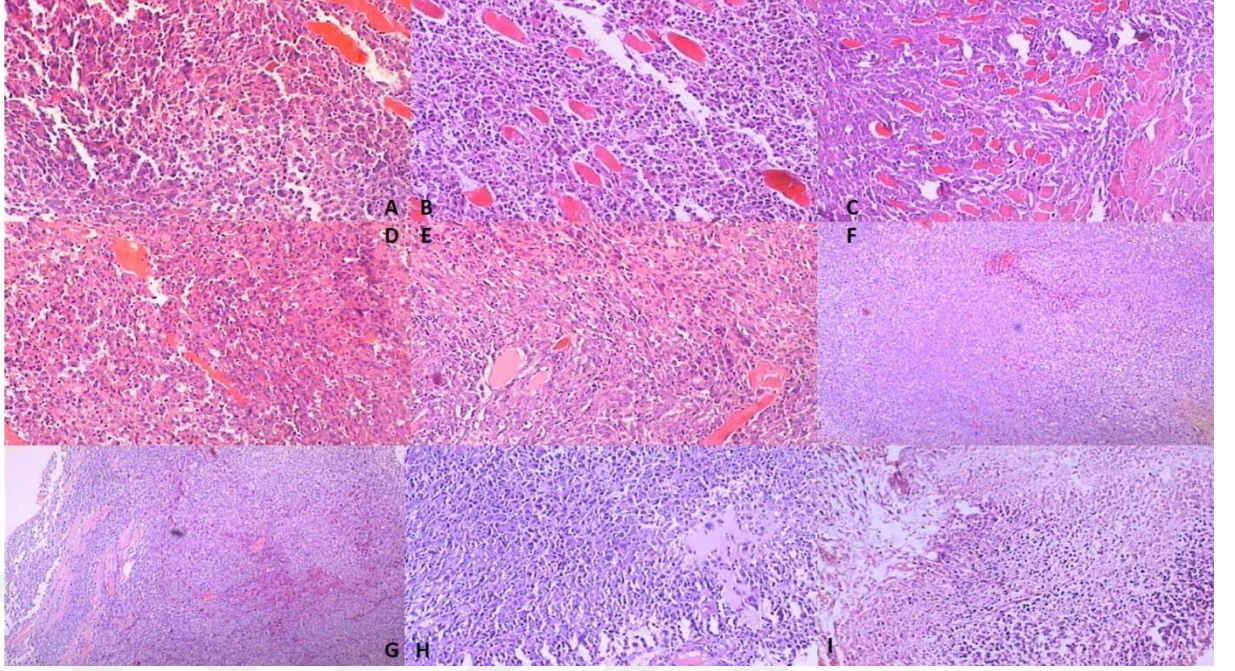
Uygun kapılamalar ardından tespit edilen totale yakın eksizyon yapılan ve ardından kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruba ait *dot plot* analiz diyagramları şekil 6 de gösterilmektedir.



Şekil 6. Totale yakın eksizyon yapılan ve ardından kadmiyum ile hazırlanmış kemik çimentosu inoküle edilen gruba ait *dot plot* analizi

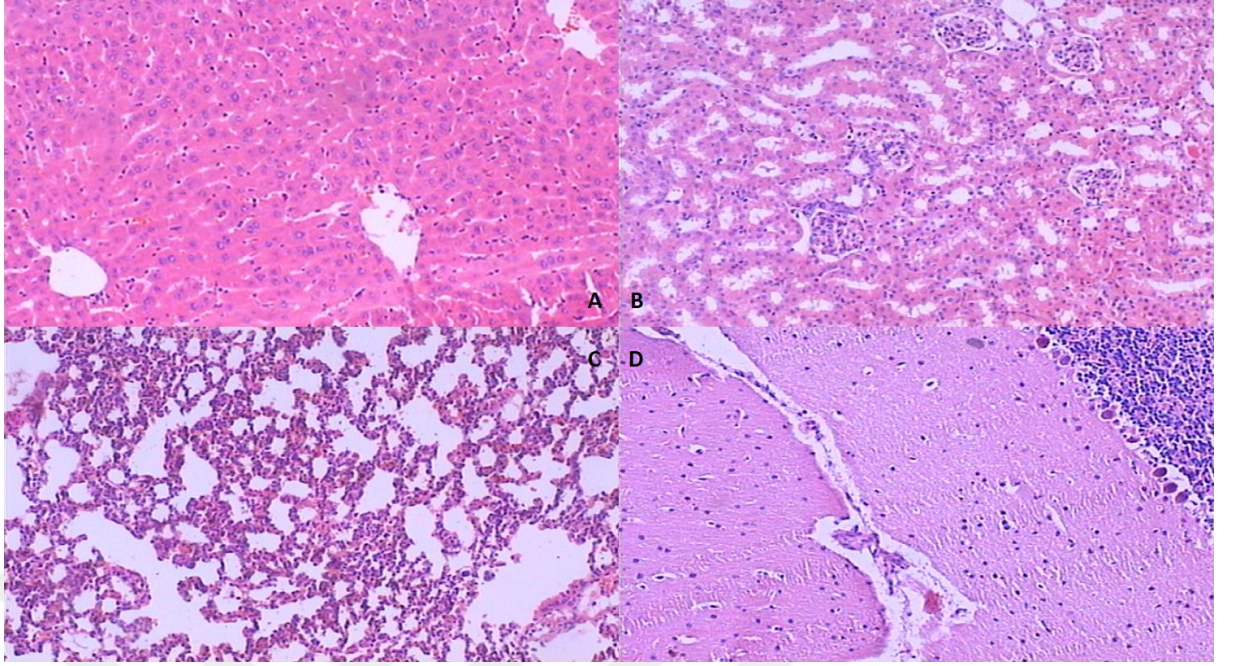
4.2. Histomorfolojik Değerlendirme Bulguları

Kontrol grubu olan farelerin tümörleri ve diğer gruplardaki eksizyon sırasında alınan (primer) ve eksizyon sonrasında tekrarlayan, nüks tümör örnekleri parafin bloka alınıp daha sonra parafin kesitleri histomorfolojik açıdan değerlendirildiğinde şu bulgular elde edildi. Şekil 7 de görüldüğü üzere kontrol grubunda vasküler yapı, agresif, kasa invaziv olmuş indifferansiyel tümör bulunmaktadır. Totale yakın eksizyon grubunda ilk ve nüks tümörlerin her ikisi de kontrol grubu ile benzer şekilde agresif ve invaziv yapıdadır. Total eksizyon yapılan grupta geniş çaplı bir eksizyon yapılmış olmasına karşın opere olan 7 farede de iki hafta sonunda nüks tümör görülmektedir. SF ile birlikte uygulanan kemik çimentosu etrafında eksizyon sonrası iki haftada nüks tümör görülürken kadmiyumlu kemik çimentosu uygulanan grupta belirgin nekroz görülmektedir.



Şekil 7. Tümör dokusu mikroskopik kesitler, A: kontrol grubu B ve C: totale yakın eksizyon grupları, B: eksizyon olan tümör C: aynı bölgede 2 hafta sonra oluşan tümör. D ve E: total eksizyon grubu. D: eksize olan tümör E: 2 hafta sonra aynı bölgede oluşan tümör. F ve G: Total eksizyon sonra kemik çimentosu + SF uygulanan grup. F: ilk eksize olan tümör G: Kemik çimentosu etrafında 2 hafta sonra oluşan nüks tümör. H ve I: Total eksizyon sonrası kemik çimentosu + kadmiyum uygulanan grup, H: ilk eksize olan tümör, I: Kemik çimentosu etrafında iki hafta sonra oluşan nüks tümör

Kemik çimentosu ve kadmiyumun birlikte uygulandığı grupta sakrifikasyon sırasında alınan diğer dokular (kalp, akciğer, böbrek, karaciğer, beyin) sistemik etki bakımından değerlendirilmek üzere işleme alındı. Sonuç olarak patolojik bulguya rastlanmadı. Ayrıca önemli bir bulgu olarak, kadmiyumun lokal uygulanmasının sistemik bir etkiye sebep olmadığı görüldü (Şekil 8).



Şekil 8. Kemik çimentosu + kadmiyum uygulanan grupta organların mikroskopik kesitleri. A: karaciğer; B: böbrek; C: akciğer; D:beyin.

4.3. Fare Ksenograft Modelinde Tümör Oluşum Bulguları:

Belirtilen gruptaki hayvanlar kemik çimentosu uygulandıktan onbeş gün sonra sakrifiye edilerek tümör dokuları ve diğer organları toplandı. Tümör dokuları histo-morfolojik, immünohistokimyasal ve akım sitometrik analizler için kullanıldı. Beyin, kalp, böbrek, akciğer ve karaciğer organları da yan etki ya da metastaz bakımından değerlendirilmek üzere parafin kesitleri alınarak incelendi.

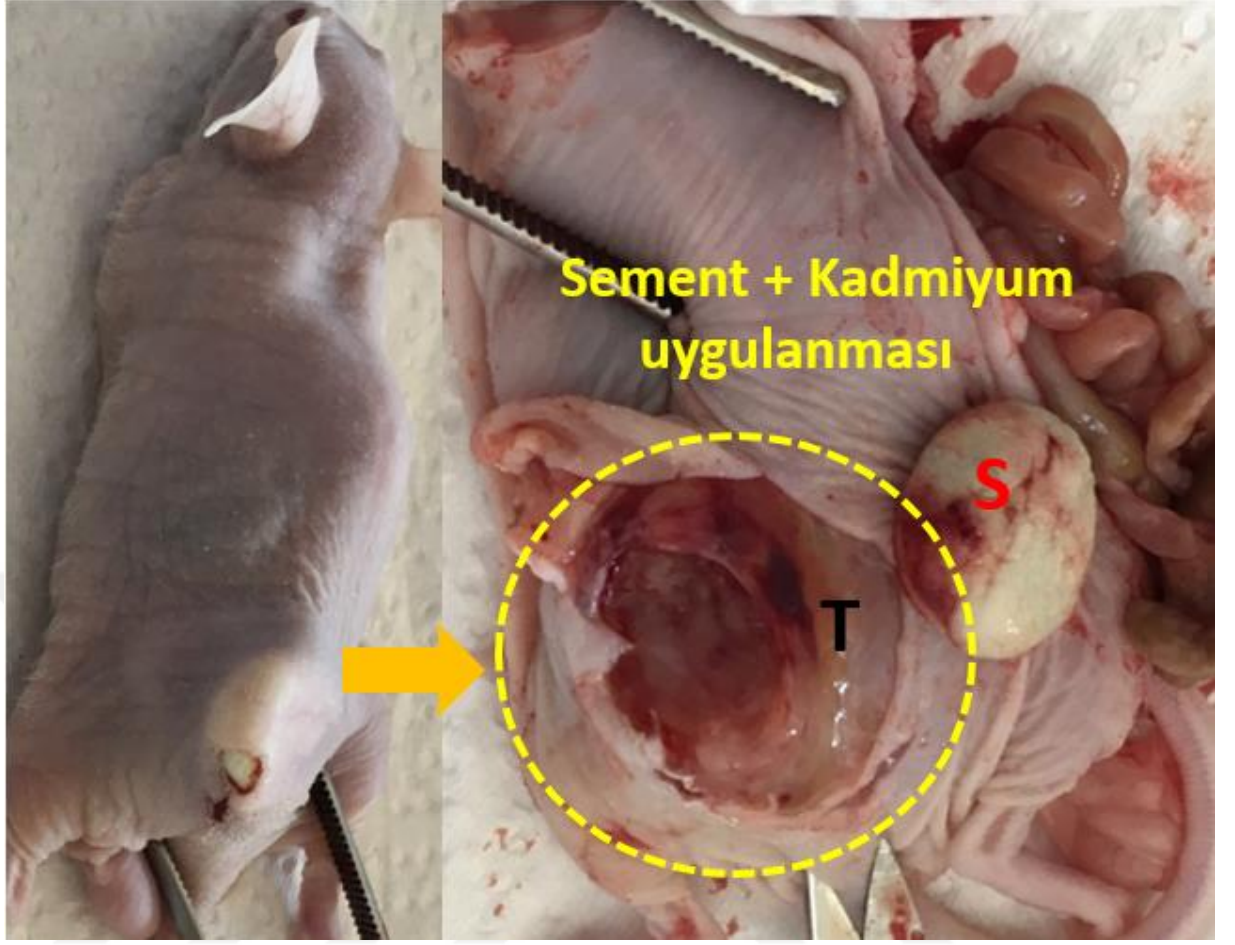
Yapılan değerlendirmelere göre kontrol grubu ile total eksizyon grubu arasında makroskopik olarak belirgin bir fark gözlenmedi (şekil 9). Her iki grupta da tümör gelişimi benzer görüldü. Kemik çimentosu uygulanan gruplar değerlendirildiğinde ise makroskopik olarak şekil 10 'a görüldüğü üzere SF ile birlikte hazırlanarak uygulanan kemik çimentosu grubunda büyük nüks tümörlerin geliştiği gözlemlendi.



Şekil 9. Totale yakın eksizyon sonrası SF 'li kemik çimentosu uygulanan farede tümör gelişimi (S: kemik çimentosu, T: tümör)



Şekil 10. Totale yakın eksizyon sonrası SF 'li kemik çimentosu uygulanan farede tümör gelişimi (S: kemik çimentosu, T: tümör)



Şekil 11. Totale yakın eksizyon sonrası Kadmiyumlu kemik çimentosu uygulanan farede tümör gelişimi (S: kemik çimentosu, T: tümör)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada cerrahi rezeksiyon sonrası lokal olarak uygulanan kemik çimentosuna emdirilmiş kadmiyum ile rezidü tümör ve rekürrens olasılığını önlemesi üzerine etkinliği in vivo hayvan modelinde test edilmiştir. Çalışmanın sonuçları subkutan ksenograft nude fare osteosarkom tümör modelinde cerrahi olarak subtotal rezeksiyon sonrası lokal olarak bu bölgeye konulacak kemik çimentosu içindeki kadmiyumun rezidü tümör ve rekürrens olasılığını azalttığını göstermiştir. Kontrol grubu ile total eksizyon grubu arasında makroskopik olarak belirgin bir fark gözlenmeyerek, her iki grupta da tümör gelişimi benzer izlenirken; diğer taraftan kemik çimentosu uygulanan gruplar değerlendirildiğinde ise makroskopik olarak SF ile birlikte hazırlanarak uygulanan kemik çimentosu grubunda büyük nüks tümörlerin geliştiği gözlenmiştir. SF ile birlikte uygulanan kemik çimentosu etrafında eksizyon sonrası iki haftada nüks tümör görülürken kadmiyumlu kemik çimentosu uygulanan grupta bunun aksine belirgin nekroz görülmüştür. Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu da, kadmiyumun lokal uygulanmasının hayvan modelinde sistemik bir etkiye yol açmadığının görülmesidir. Kemik çimentosu ve kadmiyumun birlikte uygulandığı grupta sakrifikasyon sırasında kalp, akciğer, böbrek, karaciğer ve beyinden alınan doku örneklerinde sistemik etki yönünden patolojik bulguya ve uzak metastaza rastlanmamıştır.

Osteosarkom önceleri amputasyon ile tedavi edilen, sağkalımı kısa, hastaların büyük kısmının özellikle akciğer metastazları sonucu kaybedildiği agresif bir hastalık olarak kabul edilirken; indüksiyon ve adjuvan kemoterapi protokollerinin gelişmesi, cerrahi teknikler ve radyolojik evreleme çalışmalarındaki ilerlemelerle hastaların %90-95'i artık ekstremita koruyucu rezeksiyon ve rekonstrüksiyon ile tedavi görmektedir. Bu hastaların uzun dönem yaşama şansı ve kür oranı, lokalize (metastaz olmayan) hastalıklarda, %60-80'e yükselmiştir (6-8). Osteosarkoma tedavisinde kullanılan neo-adjuvan (ameliyat öncesi tümörü küçültme amaçlı) kemoterapilerin uygulanması sonucunda klinik tedavi başarısında belirgin bir iyileşme görülmüştür. Buna karşın post-operatif gelişen rekürrensler ortak bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bu nedenle post-operatif hastalarda rekürrensi önleyecek yeni yaklaşım arayışları önem taşımaktadır. Bu amaçla farklı ilaçların,

taşıyıcı malzemeler içerisinde lokal olarak uygulanması üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

PMMA kemik çimentosu farklı antineoplastik ilaçların lokal uygulamalarının incelendiği çalışmalarda literatürdeki en yaygın kullanılan taşıyıcı malzeme olarak göze çarpmaktadır. Kondroblastomlar gibi benign veya lokal agresif tümörlerin cerrahi tedavileri sonrası adjuvan kryoterapi veya fenolizasyon gibi uygulamalar nüksü azaltmak için denenmektedir (52). Ancak Osteosarkom gibi malign tümörlerin geniş rezeksiyonu sonrası daha büyük defektler oluşmakta ve hem bu boşlukların doldurulmasında, hem de rekonstruksiyonu sırasında uygulanan ortopedik implantın kemiğe tutunmasında PMMA çimentolar yaygın olarak klinik kullanımdadır. Bu nedenle de *invivo* ve *invitro* çalışmaların büyük kısmı taşıyıcı ajan olarak PMMA'yı incelemiştir. Çalışmalardaki PMMA içerisine uygulanan tüm antineoplastik ilaçların kemik çimentosundan salınabildiği ve tümör hücreleri üzerine inhibitör bir etki yaptıkları bildirilmiştir (53). Biz de bu başarılı literatür sonuçları ışığında, cerrahi uygulamamızda da sık olarak kullandığımız PMMA kemik çimentosunu çalışmamızda kadmiyumu taşıyıcı araç olarak tercih ettik.

Kemik çimentosundan ilaç salınımının uygulamadan hemen sonra çok yüksek olduğu ve zaman içerisinde azalma eğiliminde olduğu konusunda literatürde bir fikir birliği mevcuttur. Bu amaçla bazı yazarlar kemik çimentosu içerisine chitosan veya mannitol gibi ajanları uygulayarak bu süreyi uzatmayı amaçlamışlardır. Liu ve ark. kemik çimentosu içerisine metotreksat ekleyerek yaptıkları çalışmada chitosanın ilaç salınımı süresini uzattığını ve kemiğe daha iyi entegrasyonu sağladığını bildirmişlerdir (54). Danorubisin katılmış kemik çimentosunun atimik nüde fareler ve wistar cinsi sıçanlar üzerinde incelendiği bir diğer çalışmada ise karışıma mannitol eklenmesinin hem *invivo*, hem de *invitro* ilaç salınımını %90'lara varan oranda arttırabileceği gösterilmiştir (55). Ancak bu eklenen malzemelerin kemik çimentosunun biyomekanik özelliklerini ne kadar değiştirdiği yönünde bir çalışma yapılmamıştır. Biz *invivo* uygulama öncesinde yürüttüğümüz *invitro* ön çalışmalarda farklı dozlarda kadmiyumun kemik çimentosu içerisinden salınımını inceledik. MG-63 ve K7M2 osteosarkom hücre hatları dört gruba ayrılarak ilk gruba kadmiyumun dondurulmuş kemik çimentosuna emdirilmiş hali; ikinci gruba ise kadmiyumun toz haldeki çimentoya eklendikten sonra

karıştırılarak hazırlanmış şeklini artan sayılarda hücre hatlarına uyguladık. Sementin kadmiyumsuz uygulandığı grupta %80'lere ulaşan en yüksek oranda canlılık gözlemlendi. Kadmiyum eklenip karıştırılarak hazırlanan çimentonun uygulandığı grupta; donmuş çimentoya emdirilerek uygulandığı gruptan daha yüksek sitotoksik etki tespit ettik. Sonuç olarak bu ön çalışmalar ile kadmiyumun dondurulmuş çimento içerisine emdirilerek ya da çimento hazırlığı sırasında kemik çimentosuna eklenmesi ile uygulanabileceği ve her iki şekilde de Osteosarkom hücreleri üzerine sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdik (56). Ön çalışmada elde ettiğimiz yüksek salınım değerleri ve sitotoksik etki üzerine; diğer taraftan eklenecek her malzemenin çimentonun biyomekanik özelliklerini de bozabileceğini düşünerek; çimentoya salınımı arttırmak için ayrıca bir malzeme eklemeye ihtiyaç olmadığı sonucuna ulaştık ve çalışmamızda PMMA içerisine sadece kadmiyum ekleyerek lokal etkilerini inceledik.

Kadmiyum aslında kronik maruziyette karsinogenik olarak bilinen bir ajandır. Ancak birçok antikanserojen ajanın toksik ve uzun vadede karsinogenezi tetikleyici olabileceği bilinmektedir. Daha önce kadmiyumla ilgili yapılmış olan deney hayvanı çalışmalarına bakıldığında 1991 yılında Waalkes ve arkadaşlarının Fischer türü sıçanlarda kadmiyumum subkutan uygulamasının kronik karsinogenik ve toksik etkilerini değerlendirdiği görülmektedir (11). Bunun haricinde kadmiyumum deney hayvanında kemik çimentosu içine absorbe edilerek yapılmış bir kanser çalışması literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmada kadmiyumum DNA hasarı oluşturarak lokal olarak ameliyat sonrası bölgede kalmış olabilecek tümör hücrelerini öldürücü ya da proliferasyonlarını öldürücü etkisinin olup olmayacağı test edilmiştir.

Kadmiyum endüstride uzun süredir kullanılan ve toksik etkileri iyi bilinen bir geçiş metalidir. Atom numarası 48 olan kadmiyum (Cd) gümüş beyaz renkli, seramik, pil, elektrik ve akü sanayisinde kullanılan bir elementtir. Kadmiyum, çinko bileşikleriyle beraber doğada kadmiyum sülfür olarak bulunur. Çinko, kurşun ve bakırın yan ürünü olarak üretilir. Japonya'da kadmiyuma aşırı maruziyet sonrası osteomalazi ve osteoporotik lezyonlara eşlik eden ağır renal yetmezlik ile karakterize "itai-itai hastalığı" tanımlanmıştır (57). Kadmiyumun osteoblastlar da dahil olmak üzere birçok hücrede hem invivo hem invitro olarak apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Hu ve ark. çalışmalarında kısa süreli kadmiyuma maruz bırakılan

MG-63 osteosarkom hücrelerinde apoptoz oluştuğunu gözlemlemiş ve kadmiyumun oksijen radikallerini arttırması sonucu, p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağını aktive edip, ekstraselüler sinyal regule kinaz (ERK) 1/2 yolaklarını baskılaması sonucu apoptoza yol açtığını ortaya koymuşlardır (58). Kadmiyumun kemik metabolizmasını nasıl etkilediği üzerine sıçan Osteosarkom modelinde yapılan bir başka çalışmada kadmiyumun, kalsiyum metabolizmasını kollajen sentezinin bozulması ve istenmeyen protein kinaz C aktivasyonu yoluyla etkilediği bildirilmiştir (59).

Literatürde PMMA kemik çimentosu içerisine karıştırılarak antineoplastik özellikleri en çok araştırılan ajanın metotreksat olduğu görülmektedir (53). Metotraksatın kemik çimentosu içerisinde uygulanması Hernigou ve ark.'nın 1989 tarihli çalışmalarına kadar uzanmaktadır. Bu öncü çalışmada PMMA'dan metotreksat salınımının olduğu, ekzotermik çimento reaksiyonu sonrası metotreksatın aktif halde olduğu invitro olarak gösterilmiş, ayrıca ratlarda oluşturulan Osteosarkom kitlesinin ortasına metotreksat içeren alçı veya PMMA'dan yapılmış taşıyıcılar uygulanarak tümör canlılığı incelenmiştir; ancak ratlarda kitlenin eksizyonu yapılmamıştır (60). Çalışmamızda uyguladığımız subtotal eksizyon sonrası bölgeye kemik çimentosu uygulamasının klinikte yapılan cerrahi rezeksiyonu tümörün ortasına çimento uygulanmasından daha iyi taklit edebileceğini düşünmekteyiz. Spontan Osteosarkom gelişen köpeklerde ve primer veya metastatik tümörü olan ilk 14 hastaya kemik çimentosu içerisinde metotreksat uygulamalarının sonuçlarını da dahil ettikleri çalışmalarında Hernigou ve ark. 17 köpeğin sekiz ay takip sonrası hayatta kalan 10 tanesinden ikisine amputasyon uygulamışlar ancak hiçbirinde akciğer metastazı olmadığını bildirmişlerdir. Yine takip ettikleri hastaların tümünde yara drenajında yüksek metotreksat düzeylerine ulaşıldığını ve kanda on güne, idrarda ise üç haftaya kadar metotreksata rastlandığını bildirmişlerdir (60).

Benzer şekilde kemik çimentosu içerisine metotreksat uygulayarak SaOS2 ve MG63 osteosarkom hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir başka in vitro çalışmada ise salınımın ilk gün en yüksek düzeyde olduğu ve azalarak üçüncü haftada bir plato oluşturduğu; buna rağmen tesbit edilebilen canlı tümör hücrelerinin üçüncü günden sonra namlı şekilde azaldığı ve bir haftanın sonunda neredeyse hiç rastlanmadığını bildirmişlerdir (61). Metotreksatın kemik çimentosuyla meme kanseri

hücrelerine uygulandığı çalışmalarında Maccauro ve ark.ları da ilaç salınımının ilk gün en fazla olduğunu, zamanla azaldığını bildirmişler ayrıca çalışmalarına ekledikleri biyomekanik testler ile eklenmiş olan metotreksatın kemik çimentosunun kompresif direncini azaltmadığını ortaya koymuşlardır (62).

Kemik çimentosu içerisinde çalışmaları yapılan bir diğer ajan da sisplatindir. Domuz vertebroplasti modelinde kemik çimentosu içerisinde farklı gruplara metotreksat ve sisplatinin uygulandığı 2017 tarihli bir çalışmada haftalık alınan örneklerde metotreksatın bir hafta, sisplatinin ise üçüncü haftada en yüksek düzeyine ulaştığı ve her iki ilacın da salınımının beş haftaya kadar sürdüğü gösterildi. Bunun yanında miyelosupresyon, hepatotoksisite veya nefrotoksisite bulgularına rastlanmadı. Ancak tümör modeli değil sağlıklı domuzlarda yürüttükleri bu çalışmada ilaçların antineoplastik etkinlikleri değil sadece salınım süreleri ve sistemik yan etkileri araştırılabilmıştır (63). Mestiri ve ark. ise çalışmalarında sisplatinin invitro ve tavşan hücrelerinde salınımını incelemişlerdir. Ancak yine tümör modeli içermeyen çalışmada sadece ilacın çimentodan yeterli miktarda salındığı ortaya konmuştur (64). Sisplatinin kemik çimentosu içerisindeki etkilerinin incelendiği ülkemizden yayınlanan bir çalışmada da Özben ve ark. sisplatinin çimentodan salınarak SaOS 2 hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterebildiğini ve çimentonun biyomekanik özelliklerini bozmadığını göstermişlerdir (65).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde metotreksat, doksorubisin ve sisplatinin salınımını ve sitotoksik etkilerini karşılaştıran çalışmada ise tüm ilaçların aktif formlarında salınabildiğini ancak meme kanseri hücreleri üzerine en yüksek etkiyi doksorubisinin yarattığını göstermişlerdir (50). Aynı üç ilacın etkinliğini bu kez dev hücreli tümör hastalarından alınıp üretilen hücre hatlarında araştıran başka bir in vitro çalışma da her üç ilacın da uygulanan en düşük dozda bile çimentodan aktif şekilde salındığı ve yeterli sitotoksik etkiyi ortaya çıkardığı bildirilmiştir (66). Doksorubisin ve sisplatinin PMMA çimentodan salınımını inceleyen bir invitro çalışmada da yine her iki ilacın etkin biçimde salınabildiği ve hücreler üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (67). Daha önce de değindiğimiz gibi çimento içerisindeki doksorubisine mannitol de eklenerek ilacın in vivo salınımının arttırılabileceği bilinmektedir (55). Çimento içerisine doksorubisin yanında pamidronat da eklenerek yapılan bir in vitro çalışmada iki ilaç beraber verildiğinde ilk gün içinde yarısının

salındığını, sadece pamidronat verildiğinde ise bu sürenin üç güne uzadığı gösterilmiş; bununla beraber her iki ilacın da iki grama kadar kemik çimentosu içerisine eklenmesinin biyomekanik özellikleri azaltmadığı bulunmuştur (49).

Bifosfonat grubu üçüncü kuşak ilaçlardan zoledronik asitin PMMA kemik çimentosuna eklenerek dev hücreli tümör, multipl myelom, renal hücreli kanser gibi farklı hücre hatlarında etkin olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (51). Zoledronik asitin PMMA veya hidroksiapatit (HA) üzerinde taşınarak Osteosarkom, fibrosarkom, sinovyal sarkom, renal hücreli kanser, prostat kanseri ve akciğer kanseri gibi farklı türde hücreler üzerine etkileri de incelenmiştir. Zoledronik asitin PMMA kemik çimentosu ile uygulanmasının tümör hücreleri üzerine daha potent olduğu; muhtemelen bifosfonatların HA'ya daha yüksek afinite göstermeleri nedeniyle HA üzerinde uygulanmasının daha az etkili olduğunu gösterilmiştir (68). Literatürde PMMA içerisinde uygulanarak SaOS-2 hücreleri üzerine etkinliği araştırılan valproik asit (VPA) ve suberoylanillid hidroksamik asit (SAHA) gibi başka ilaçlar da mevcuttur. Her iki ilacın da kemik çimentosundan yeterli miktarda salındığı ve in vitro olarak Osteosarkom hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (69). Tüm bu çalışmalar ışığında farklı mekanizmalarla tümör hücreleri üzerine etki gösteren bir çok ilacın PMMA kemik çimentosu içerisinde aktif formda lokal olarak uygulanabileceği görülmektedir.

Çalışmamızın literatürdeki daha büyük çoğunlukta yer alan invitro çalışmalardan en temel üstünlüğü ksenograft nude fare osteosarkom tümör modelinde PMMA içerisindeki kadmiyumun hem lokal olarak tümör hücrelerine etkinliğinin ortaya konmuş olması; hem de sistemik toksisite, uzak metastaz gibi sistemik etkilerinin de araştırılabilmiş olmasıdır. Çalışmanın sonucunda cerrahi olarak subtotal rezeksiyon sonrası lokal olarak bu bölgeye konulacak kemik çimentosu içindeki kadmiyumun rezidü tümör ve rekürrens olasılığını azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu da, kadmiyumun lokal uygulanmasının hayvan modelinde sistemik bir etkiye yol açmadığının görülmesidir. Kemik çimentosu ve kadmiyumun birlikte uygulandığı grupta sakrifikasyon sırasında kalp, akciğer, böbrek, karaciğer ve beyinden alınan doku örneklerinde sistemik etki yönünden patolojik bulguya ve uzak metastaza rastlanmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Osteosarkomda rezidü tümörlerin önemli bir kısmını oluşturan cerrahi sonrası rekürrenslerde kullanılabilecek kemiğe yerleştirilebilecek kemik çimentosu içine emdirilmiş kadmiyumun etkinliğinin bulunması hastalarda da uygulanmaya aday bir model olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır. Bu bulgu hem sağlık açısından hem de ticari açıdan yaygın bir etkiye neden olmuştur. Ayrıca bu modelin geliştirilmesi sonraki çalışmalara ışık tutması amacıyla önem taşımaktadır.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular kemik çimentosu içinde lokal kadmiyum uygulamasının cerrahi sonrası osteosarkomun lokal tedavisine katkıda bulunabileceğini desteklemektedir. Postoperatif ortopedik biyomekanik malzemeler içinde lokal tedavi, osteosarkomda rekürrensi önlemede katkı tedavi seçeneği olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Puri, and Gulia. The results of total humeral replacement following excision for primary bone tumour. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*. 2012; 34(9): 1277–1281.
2. Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma?. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;16C:15-23.
3. Fox MG, Trotta BM. Osteosarcoma: review of the various types with emphasis on recent advancements in imaging?. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2013; 17(2):123-36.
4. Angiero F, Moltrasio F, Cattoretti G, Valente MG. Clinical and histopathological profile of primary or secondary osteosarcoma of the jaws. *Anticancer Res*. 2011;31(12):4485-9.
5. Yagishita S, Horinouchi H, Yoroazu T, et al. Secondary osteosarcoma developing 10 years after chemoradiotherapy for non-small-cell lung cancer?. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44(2):191- 192.
6. Ando K, Heymann MF, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers (Basel)*. 2013; 5(2):591-616.
7. Goudarzi A, Gokgoz N, Gill M, Pinnaduwege D, et al. Protein kinase C epsilon and genetic networks in osteosarcoma metastasis?. *Cancers (Basel)*. 2013;8;5(2):372-403.
8. Tanzawa Y, Tsuchiya H, Shirai T, et al. 2011. Potentiation of the antitumor effect of calcium phosphate cement containing anticancer drug and caffeine on rat osteosarcoma? *J Orthop Sci*.2011; 16(1):77-84.
9. Kobys VL, Konovalenko VF, Repin NV, et al. 2013. Treatment of large osteosarcoma in children: new approach?. *Exp Oncol*. 35(2):105-8.
10. Yu X, Wu S, Wang X, Xu M, Xu S, Yuan Y. 2013. Late post-operative recurrent osteosarcoma: Three case reports with a review of the literature. *Oncol Lett*. 6(1):23-27.
11. Raymond AK, Jaffe N. Osteosarcoma multidisciplinary approach to the

- management from the pathologist's perspective, in *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*. 2009; 63–84
12. Abate ME, Longhi A, Galletti S, Ferrari S, Bacci G. Non-metastatic osteosarcoma of the extremities in children aged 5 years or younger. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55: 652–654.
 13. Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branscheid D, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2003;21: 2011–2018.
 14. Pakos EE, Nearchou AD, Grimer RJ, Koumoullis HD, Abudu A, Bramer JAM, Jeys LM, et al. Prognostic factors and outcomes for osteosarcoma: an international collaboration. *Eur J Cancer*, 2009;45:2367–2375.
 15. Cho WH, Song WS, Jeon DG, Kong CB, Kim MS, Lee JA, Yoo JY, Kim JD, Lee SY. Differential presentations, clinical courses, and survivals of osteosarcomas of the proximal humerus over other extremity locations. *Ann Surg Oncol* 2010;17, 702–708.
 16. Kaste SueC, Liu T, Billups CA, Daw NC, Pratt CB, Meyer WH. Tumor size as a predictor of outcome in pediatric non-metastatic osteosarcoma of the extremity. *Pediatr Blood Cancer*. 2004; 43:723–728.
 17. Kager L, Zoubek A, Dominkus M, Lang S, Bodmer N, Jundt G, Klingebiel T, Jürgens H, Gadner H, Bielack S. Osteosarcoma in very young children. *Cancer* 2010; 116: 5316–5324.
 18. Hayden JB, Hoang BH. Osteosarcoma: basic science and clinical implications. *Orthop Clin North Am*. 2006;37, 1–7.
 19. Ozaki T, Flege S, Liljenqvist U, Hillmann A, Delling G, Salzer-Kuntschik M, Jürgens H, Kotz R, Winkelmann W, Bielack SS. Osteosarcoma of the spine: experience of the cooperative osteosarcoma study group. *Cancer* 2002;94: 1069–1077.
 20. Mialou V, Philip T, Kalifa C, Perol D, Gentet JC, Marec-berard P, Pacquement Helene, Chastagner P, Defaschelles AS, Hartmann O. Metastatic osteosarcoma at diagnosis prognostic factors and long-term outcome – the French pediatric experience. *Cancer* 2005;104: 1100–1109

21. Majó J, Cubedo R, Pardo N. Treatment of osteosarcoma. A review. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2010;54:329–336.
22. Messerschmitt PJ, Garcia RM, Abdul-Karim FW, Greenfield EM, Getty PJ. Osteosarcoma. *J Am Acad Orthop Surg*. 2009; 17, 515–527.
23. Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2010; 8: 705–718.
24. Welker JA, Henshaw RM, Jelinek J, Shmookler BM, Malawer MM. The percutaneous needle biopsy is safe and recommended in the diagnosis of musculoskeletal masses. *Cancer* 2000; 89:2677–2686.
25. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol* 2006;125:555–581.
26. Unni Krishnan K, Dahlin DC. Osteosarcoma: pathology and classification. *Semin Roentgenol* 1989; 24:143–152.
27. Schima W, Amann G, Stiglbauer R, Windhager R, Kramer J, Nicolakis M, Farres MT, Imhof H. Preoperative osteosarcoma: imaging staging of efficacy of MR in detecting joint involvement. *Am J Roentgenol* 1993;163, 1171–1175
28. Zamborsky R, Kokavec M, Harsanyi, Danisovic L. Identification of prognostic and predictive osteosarcoma biomarkers. *Med Sci (Basel)*.2019; 7(2): pii: E28
29. Hong AM, Millington S, Ahern V, Mccowage G, Boyle R, Tattersall M, Haydu L, Stalley PD. Limb preservation surgery with extracorporeal irradiation in the management of malignant bone tumor: the oncological outcomes of 101 patients. *Ann Oncol* 2013; 24: 2676–2680
30. O’Kane GM, Cadoo KA, Walsh EM, Emerson R, Dervan P, O’Keane C, Hurson B, et al. Perioperative chemotherapy in the treatment of osteosarcoma: a 26-year single institution review. *Clin Sarcoma Res* 2015; 5: 1–8.
31. Betz M, Dumont CE, Fuchs B, Ulrich Exner G. Physeal distraction for joint preservation in malignant metaphyseal bone tumors in children. *Clin Orthop Relat Res* 2012;470: 1749–1754.
32. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Forni C, Bertoni F, Fabbri N, Zavatta M, Versari M. Neoadjuvant chemotherapy for high grade osteosarcoma of the extremities: long-term results for patients treated according to the Rizzoli IOR/OS-3b protocol. *J Chemother* 2001;13, 93–99.

33. Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A, Bacci G (2001) Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann Oncol* 12, 1145–1150.
34. Kapoor S, Tiwari A, Kapoor S. Primary tumours and tumorous lesions of clavicle. *Int Orthop* 2008; 32, 829–834.
35. O’Kane GM, Cadoo KA, Walsh EM, Emerson R, Dervan P, O’Keane C, Hurson B, et al. Perioperative chemotherapy in the treatment of osteosarcoma: a 26-year single institution review. *Clin Sarcoma Res* 2015; 5: 1–8.
36. Imran H, Enders F, Krailo M, Sim F, Okuno S, Hawkins D, Neglia J, et al. Effect of time to resumption of chemotherapy after definitive surgery on prognosis for non-metastatic osteosarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91: 604–612.
37. Hong AM, Millington S, Ahern V, Mccowage G, Boyle R, Tattersall M, Haydu L, Stalley PD. Limb preservation surgery with extracorporeal irradiation in the management of malignant bone tumor: the oncological outcomes of 101 patients. *Ann Oncol* 2013; 24:2676–2680.
38. Waalkes MP, Rehm S, Sass B, Konishi N, Ward JM. Chronic carcinogenic and toxic effects of a single subcutaneous dose of cadmium in the male Fischer rat?. *Environ Res.* 1991;55(1):40-50.
39. Gobin B, Moriceau G, Ory B, Charrier C, Brion R, Blanchard F, Redini F, Heymann D. Imatinib mesylate exerts anti-proliferative effects on osteosarcoma cells and inhibits the tumour growth in immunocompetent murine models. *PLoS One.* 2014; 9(3):e90795.
40. Long GJ. The effect of cadmium on cytosolic free calcium, protein kinase C, and collagen synthesis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 143(1):189-95.
41. Vaishya, R., Chauhan, M., & Vaish, A. (2013). Bone cement. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*, 4(4), 157-163.
42. Nottrott M. Acrylic bone cements: influence of time and environment on physical properties. *Acta Orthop Suppl.* 2010;81:1–27.
43. Kuhn KD. Chapter 3. 1: Properties of Bone Cement-What is Bone Cement? The

- well-cemented total hip arthroplasty: theory and practice, Germany: Springer; 2005. pp. 51–59.
44. Arora M., Chan E.K.S., Gupta S., Diwan A.D. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: a review of the literature. *World J Orthop.* 2013;4(2):67–74.
 45. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br.* 1960;42-B:28–30.
 46. Gillani R, Ercan B, Qiao A, Webster TJ. Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J nanomedicine.* 2010;5:1–11.
 47. Hanssen AD. Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard-in opposition. *J Arthroplasty.* 2004;19:73–77.
 48. Willert, H. G. Ludwig J. Semlitsch, M. : Reaction of bone to metacrylate after hip, arthroplasty. A long-term gross, light microscopic. Electron microscopic study. *JBJS.* 1974; 56-A: 1368
 49. Healey JH, Shannon F, Boland P, DiResta GR. PMMA to stabilize bone and deliver antineoplastic and antiresorptive agents. *Clin Orthop Relat Res.* 2003(415 Suppl):S263-275.
 50. Rosa MA, Maccauro G, Sgambato A, Ardito R, Falcone G, De Santis V, Muratori F. Acrylic cement added with antiblastics in the treatment of bone metastases. Ultrastructural and in vitro analysis. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(5):712-716.
 51. Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, Cheng EY. Cytotoxic effect of zoledronic acid-loaded bone cement on giant cell tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines. *J Bone Joint Surg Am.* 92(1):162-168.
 52. Hapa O, Karakaşlı A, Demirkıran ND, Akdeniz O, Havıtcıoğlu H. (2016). Operative treatment of chondroblastoma: a study of 11 cases. *Acta Orthop Belg,* 82(01), 68-71.
 53. Pountos, Ippokratis, and Peter V. Giannoudis. "Drug-eluting implants for the suppression of metastatic bone disease: current insights." *Expert review of medical devices* 15.4 (2018): 301-311.

54. Liu BM, Li M, Yin BS, et al. Effects of incorporating carboxymethyl chitosan into PMMA bone cement containing methotrexate. *PLoS One*. 2015;10:e0144407.
55. Froschle GW, Mahlitz J, Langendorff HU, Achilles E, Pollock J, Jungbluth KH. Release of daunorubicin from polymethylmethacrylate for the improvement of the local growth control of bone metastasis animal experiments. *Anticancer Res* 1997; 17:995-1002.
56. Demirkıran ND, Erçetin AP, Aydın M, Bekcioglu O, Havitcioglu H, Aktaş S. Osteosarkomda Kadmiyumun Kemik Çimentosu İçerisinde In vitro Uygulanabilirliği. *Acta Oncologica Turcica*. 2019; kabul edildi.
57. Pier SM: The role of heavy metals in human health. *Tex Rep Biol Med* 1975;33:85-106.
58. Hu, K. H., Li, W. X., Sun, M. Y., Zhang, S. B., Fan, C. X., Wu, Q., ... & Xu, X. (2015). Cadmium induced apoptosis in MG63 cells by increasing ROS, activation of p38 MAPK and inhibition of ERK 1/2 pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(2), 642-654.
59. Long, G. J. (1997). The effect of cadmium on cytosolic free calcium, protein kinase C, and collagen synthesis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 143(1), 189-195.
60. Hernigou P, Thiery JP, Benoit J, Voisin MC, Leroux P, Hagege G, Delepine G, Goutallier D. Methotrexate diffusion from acrylic cement. Local chemotherapy for bone tumours. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71:804-11.
61. Kim HS, Park YB, Oh JH, Yoo KH, Lee SH. The cytotoxic effect of methotrexate loaded bone cement on osteosarcoma cell lines. *Int Orthop* 2001;25:343-8.
62. Maccauro G, Cittadini A, Casarci M, Muratori F, De Angelis D, Piconi C, et al. Methotrexate-added acrylic cement: biological and physical properties. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18:839-44.
63. Llombart-Blanco, R., Villas, C., Silva, Á., Aldaz, A., Navarro, I., Forteza, J., ... & Alfonso, M. (2017). Local and systemic diffusion of antineoplastic drugs following vertebroplasty using acrylic cement mixed with cisplatin or methotrexate: experimental study in pigs. *European Spine Journal*, 26(12),

3216-3224.

64. Mestiri M BJ, Hernigou P, Devissaguet JP, Puisieux F. Cisplatin-loaded poly (methyl methacrylate) implants: a sustained drug delivery system. *J Control Release* 1995;33:107- 13.
65. Özben, H., Eralp, L., Baysal, G., Cort, A., Sarkalkan, N., & Özben, T. (2013). Cisplatin loaded PMMA: mechanical properties, surface analysis and effects on Saos-2 cell culture. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*, 47(3), 184-192.
66. Savadkoohi DG, Sadeghipour P, Attarian H, Sardari S, Eslamifar A, Shokrgozar MA. Cytotoxic effect of drugs eluted from polymethylmethacrylate on stromal giant-cell tumour cells: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90: 973-9.
67. Greco F, de Palma L, Specchia N, Jacobelli S, Gaggini C. Polymethylmethacrylate-antiblastic drug compounds: an in vitro study assessing the cytotoxic effect in cancer cell lines-- a new method for local chemotherapy of bone metastasis. *Orthopedics* 1992;15:189-94.
68. Koto, K., Murata, H., Sawai, Y., Ashihara, E., Horii, M., & Kubo, T. (2017). Cytotoxic effects of zoledronic acid-loaded hydroxyapatite and bone cement in malignant tumors. *Oncology letters*, 14(2), 1648-1656.
69. Tonak, M., Becker, M., Graf, C., Eckhard, L., Theobald, M., Rommens, P. M., ... & Proschek, D. (2014). HDAC inhibitor-loaded bone cement for advanced local treatment of osteosarcoma and chondrosarcoma. *Anticancer research*, 34(11), 6459-6466.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul Raporu

 DÜZCE EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, Incehan, Iğdır 232 4722234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/08/2017
Toplantı Tarihi : 18 Nisan 2017

Sayın, Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

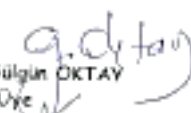
41/2014 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Osteosarkomda İn Vivo Ksenograft Modelde Lokal Rekürrensi Önleme" isimli projede;gönderilen belgeler incelenerek, gruplarda yapılan düzeltmeler uygun bulunmuştur. (7 adet ek Nude Mice) Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Araştırmacı)


Prof.Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye (Araştırmacı)

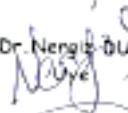
Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Araştırmacı)

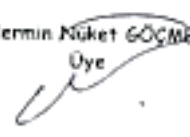

Prof.Dr. Gülgün ÖKTAY
Üye

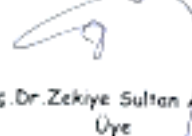
Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye (Topl.Katılmadı)


Prof.Dr. Türkan ERTAY
Üye

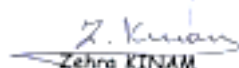

Prof.Dr. Pembe UYGUL KESKİNOĞLU
Danışman


Doç. Dr. Nergiz BURMUŞ
Üye


Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Yard.Doç. Dr. Orhan KALEMCI
Üye (Topl.Katılmadı)


Zehra KINAM
Üye


Vet. Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK 2 : ÖZGEÇMİŞ



NİHAT DEMİRHAN DEMİRKİRAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	14948526706
Doğum Tarihi	28/02/1986
İletişim Adresi	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ ORTOPEDİ VE Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi
Telefon	(232) 412 33 79 (507) 457 35 87
E-posta	ordemirhandemirkiran@hotmail.com nihatdemirhan.demirkiran@ksbu.edu.tr
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

- 04 Eylül 2015 - Şu Anda (3 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 4.0 / 4.0
- 01 Eylül 2011 - 28 Eylül 2016 (5 yıl 1 ay)
Tıpta Uzmanlık, Anadal/Normal Öğretim, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
TIP FAKÜLTESİ, CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
Tez Başlığı: ?Çok katmanlı menisku?s yapı iskelelerinin menisku?s iyileşmesi
u?zerine etkisinin taşıyan modelinde araştırılması (Effects of multilayer me niscal
scaffolds on meniscus healing: Investigation on a rabbit model)? - 2016
Tez Konusu: ?Çok katmanlı menisku?s yapı iskelelerinin menisku?s iyileşmesi
u?zerine etkisinin taşıyan modelinde araştırılması (Effects of multilayer me niscal
scaffolds on meniscus healing: Investigation on a rabbit model)? - 2016
Tarih: 2016
Tez Danışmanı: HASAN HAVİTÇIOĞLU
Diploma Numarası: 122922
- 09 Ekim 2006 - 02 Haziran 2008 (1 yıl 8 ay)
Ön Lisans, Açıköğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ, SAĞLIK KURUMLARI İŞLETMECİLİĞİ PR.
(AÇIKÖĞRETİM)
Diploma Numarası: 2008-4208
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 68.06 / 100.0
- 09 Eylül 2004 - 22 Temmuz 2010 (5 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, TRAKYA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
TIP FAKÜLTESİ, TIP PR.
Diploma Numarası: 3715
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.65 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

02 Mayıs 2019 - Şu Anda (2 ay) (Tam Zamanlı)
DR. ÖĞR. ÜYESİ, KÜTAHYA SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

17 Eylül 2011 - Şu Anda (7 yıl 10 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ CERRAHİ
TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

SİRPÇA (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

N. D. DEMİRKİRAN, O. BAŞCI & E. KAYA, Omuz Sorunlarında tanı (Muayene,
Görüntüleme, Tanısal Artroskop), Takım Doktoru Olarak Spor Ortopedisti(119 -
127), ISBN: 978-605-67864-2-6: Karınca Creative Ajans, Kitap.

Makaleler

N. D. DEMİRKİRAN, A. ZİYLAN, H. HAVİTÇIOĞLU, Ü. CANKURT & B. HÜSEMOĞLU,
Novel multilayer meniscal scaffold provides biomechanical and histological results
comparable to polyurethane scaffolds: An 8 week rabbit study., Acta Orthopaedica
et Traumatologica Turcica, 2019, 1017-995X.

N. D. DEMİRKİRAN, Suture Treatment for Pincer Nail Deformity, Dermatologic Surgery, 2019, 1076-0512, 1.

O. HAPA, N. D. DEMİRKİRAN, R. B. HUSEMOĞLU, M. EDİZER & H. HAVİTÇİOĞLU, Anatomic implications of lesser trochanteroplasty, ACTA ORTHOPAEDICA ET TRAUMATOLOGICA TURCICA, 2018, 1017-995X, 52, 1, 54-57.

A. E. ACAN, O. GÜRSAN, N. D. DEMİRKİRAN & H. HAVİTÇİOĞLU, Late treatment of obstetrical brachial plexus palsy by humeral rotational osteotomy and lengthening with an intramedullary elongation nail, ACTA ORTHOPAEDICA ET TRAUMATOLOGICA TURCICA, 2018, 1017-995X, 52, 1, 75-80.

M. ERDURAN, N. D. DEMİRKİRAN & T. C. DÜLGEROĞLU, Long anatomical femoral stem reduces stress concentrations on femurs with lateral bowing deformity: A finite element analysis, Annals of Medical Research, 2018, 2636-7688, 0, 1.

A. E. AÇAN, O. GÜRSAN, A. KARAKAŞLI, N. D. DEMİRKİRAN, O. BAŞCI & H. HAVİTÇİOĞLU, Femur can be lengthened over nail, along its mechanical axis : a modified lengthening over nail technique, ACTA ORTHOPAEDICA BELGICA, 2017, 0001-6462, 83, 2, 223-230.

A. KAR, N. D. DEMİRKİRAN, M. H. TATARLI, B. UZUN & F. ERTEM, Hexagonal grafts in mosaicplasty: Biomechanical comparison of standard cylindrical and novel hexagonal grafts in calf cadaver model, ACTA ORTHOPAEDICA ET TRAUMATOLOGICA TURCICA, 2017, 1017-995X, 51, 2, 160-164.

M. ERDURAN, N. ACAR, N. D. DEMİRKİRAN & K. ATALAY, The impact of medial cuneiform bone variant measures on the severity of hallux valgus: A radiological study, Journal of Orthopaedic Surgery, 2017, 2309-4990, 25, 3, 230949901772792.

O. HAPA, A. KARAKAŞLI, N. D. DEMİRKİRAN, O. AKDENİZ & H. HAVİTÇİOĞLU, Operative treatment of chondroblastoma: a study of 11 cases, ACTA ORTHOPAEDICA BELGICA, 2016, 0001-6462, 82, 1, 68-71.

Bildiriler

M. ERDURAN, N. D. DEMİRKİRAN & M. GÜNGÖRÜRLER, Lateral Femoral Eğimi Olan Hastalarda Uzun Anatomik Bileşen Yük Yığılımını Azaltır: Sonlu Elemanlar Analizi, Poster Sunumu, 27. Milli Türk Ortopedi-Travmatoloji Kongresi, 24 Ekim 2017, 29 Ekim 2017.

Ödüller

En İyi Makale Ödülü, Ulusal, ?Deneyisel Çalışma Dalında XXII. Akif Şakir Şakar Bilim Ödülü", ?Deneyisel Çalışma Dalında XXII. Akif Şakir Şakar Bilim Ödülü", Ödül Alınan Kurum: Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği (TOTDER) (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 19 Mayıs 2018.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, ?Prof. Dr. Münir Ahmet Sarpyener En İyi Uzmanlık Tezi İkincilik Ödülü, ?Prof. Dr. Münir Ahmet Sarpyener En İyi Uzmanlık Tezi İkincilik Ödülü, Ödül Alınan Kurum: TÜRK ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ BİRLÜĞÜ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 29 Ekim 2017.

Diğer, Ulusal, "Ekstremitte Rekonstrüksiyonu ve Ilizarov Alanında En İyi Sözlü Bildiri", "Ekstremitte Rekonstrüksiyonu ve Ilizarov Alanında En İyi Sözlü Bildiri", Ödül Alınan Kurum: TÜRK ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ BİRLÜĞÜ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 29 Ekim 2016.

Patentler

Distal femoral kondil çivisi, Distal femoral kondil çivisi, Patent Başvurusu, Ulusal, Başvuru No: 2015/09453, 30 Temmuz 2015

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0