

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK KANSERLERİNDE KULLANILAN KEMO-
İMMÜNOTERAPİNİN VE GREFT MATERYALLERİNİN
MİKROÇEVRE İLİŞKİSİ**

ÖMER BEKCİOĞLU
ORCID:0000-0003-2423-0161

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Temel Onkoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR

HAZİRAN 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2016970161

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK KANSERLERİNDE KULLANILAN KEMO-
İMMÜNOTERAPİNİN VE GREFT MATERYALLERİNİN
MİKROÇEVRE İLİŞKİSİ**

ÖMER BEKCİOĞLU

ORCID:0000-0003-2423-0161

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Temel Onkoloji Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.100 numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Ömer BEKCİOĞLU'nun tarafından hazırlanan “**Kemik Kanserlerinde Kullanılan Kemo- İmmünoterapinin ve Greft Materyallerinin Mikroçevre İlişkisi**” başlıklı tez çalışması 08/06/2021 Salı günü 14:00-15:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafınan OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji AD
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
Orcid: 0000-0002-7658-5565

Üye:Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU
Dokuz Eylül Üniversitesi
Ortopedi ve Travmatoloji ABD
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
Orcid: 0000-0001-8169-3539

Üye:Prof.Dr. Zekiye S. ALTUN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
Orcid: 0000-0002-1558-4534

Üye:Doç. Dr.Nüket ELİYATKIN
Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
Orcid: 0000-0002-7784-5699

Üye: Doç.Dr.Demirhan DEMİRKIRAN
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
Orcid: 0000-0002-0724-9672

Prof. Dr. H. Nur OLGUN
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji AD
Danışman, oy kullanmayacak
Orcid: 0000-0001-9591-0207

Yedek Üye: Prof. Dr. Gülden DİNİZ
Demokrasi Üniversitesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
Orcid: 0000-0003-1512-7584

Yedek Üye: Prof.Dr. Işıl SOMALI
Dokuz Eylül Üniversitesi O
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı
Tezi Onaylıyorum/Onaylamıyorum
Orcid: 0000-0003-3135-9043

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1. Problemin Tanımı.....	5
1.2. Araştırmanın Amacı	6
1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri.....	6
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Osteosarkoma Tanımı.....	8
2.2. Osteosarkom Epidemiyolojisi	8
2.3. Osteosarkom Tipleri	9
2.4. Osteosarkom Tanısı.....	10
2.5. Osteosarkom Evrelemesi	11
2.6. Osteosarkom Tedavisi	11
2.6.1. Cerrahi Tedavi	11
2.6.2. Kemoterapi Tedavisi.....	12
2.6.3. Radyoterapi.....	13
2.7. İfosfamid	13
2.7.1. İfosfamidin Osteosarkomda Kullanımı.....	16
2.8. Mifamurtid.....	16
2.8.1. Mifamurtidin Osteosarkomda Kullanımı.....	17
2.8. Kemik Çimentosu.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Araştırmanın Tipi	19

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	19
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	19
3.4. Çalışma Materyali	20
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	22
3.6. Veri Toplama Araçları.....	22
3.6.1. Hücre Kültürü	22
3.6.2. Hücre Canlılık Testi.....	22
3.6.2. Fare Ksenograft Modelinin Oluşturulması	23
3.6.3. Kimyasallar	27
3.6.4. Farelerin araştırmadan çıkarılma kriterleri	27
3.6.5. Farelerin sakrifikasyonu, organ ve dokuların disseke edilmesi.....	27
3.6.6. İmmünohistokimyasal Analizler.....	27
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	28
3.8. Araştırmanın Akış Şeması.....	28
3.9. Etik Kurul Onayı	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. WST-1 ile in vitro Proliferasyon Bulguları	30
4.2. Histopatoloji İmmünohistokimya Bulguları.....	32
4.2.1. Balb/c osteosarkom fare modeli histopatoloji bulguları	32
4.2.2. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve serum fizyolojik grubu immünohistokimya bulguları.....	37
4.2.3. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve mifamurtid grubu immünohistokimya bulguları.....	41
4.2.4. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve ifosfamid grubu immünohistokimya bulguları.....	45
4.2.5. Balb/c osteosarkom fare modeli mifamurtid, ifosfamid ve sement grubu immünohistokimya bulguları.....	49

4.2.6. Atimik Nude Fare Kontrol Grubunda İmmünohistokimya Bulguları	51
4.2.7. Atimik Nude Farede Serum Fizyolojik İle Hazırlanan Sement Uygulanan Grubun İmmünohistokimya Bulguları.....	55
4.2.8. Atimik Nude Farede İfosfamid İle Hazırlanan Sement Uygulanan Grubun İmmünohistokimya Bulguları	56
4.2.9. Atimik nude farede serum intraperitoneal ifosfamid uygulanan grubun immünohistokimya bulguları.....	61
4.3. Balb/c fare bulgularının istatistiksel analizi	62
4.3.1. Kontrol grubu ile serum fizyolojik ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması.....	62
4.3.2. Kontrol grubu ile mifamurtid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması.....	64
4.3.3. Kontrol grubu ile ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması.....	69
4.3.3. Kontrol grubu ile mifamurtid+ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması	70
4.3.4. SF+Sement grubu ile mifamurtid+ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması	72
4.3.5. İfosfamid+Sement grubu ile mifamurtid+ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması	75
4.3.6. Mifamurtid+Sement grubu ile ifosfamid+sement uygulamasının karşılaştırılması.....	76
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
8. EKLER.....	93

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Osteosarkom tipleri.....	8
Tablo 2. Osteosarkom evreleri.....	10
Tablo 3. Balb/c hayvanlara yapılan günlük uygulamalar	22
Tablo 4. Atimik nude hayvanlara yapılan günlük uygulamalar.....	23
Tablo 5. Balb/c osteosarkom fare modeli kontrol grubunda inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları.....	37
Tablo 6. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve serum fizyolojik verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları.....	41
Tablo 7. Balb/c osteosarkom fare modeli mifamurtid ve sement verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları	45
Tablo 8. Balb/c osteosarkom fare modeli ifosfamid ve sement verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları	48
Tablo 9. Balb/c osteosarkom fare modeli mifamurtid ve ifosfamid ile hazırlanan sement verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları.....	50
Tablo 10. Atimik nude fare kontrol grubunda CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri	50
Tablo 11. Atimik nude fare serum fizyolojik ile hazırlanan sement uygulanan grubun tümör rezeksiyonu önce ve sonrası CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri.....	55
Tablo 12. Atimik nude fare ifosfamid ile hazırlanan sement uygulanan grubun tümör rezeksiyonu önce ve sonrasında CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri.....	60
Tablo 13. Atimik nude fare intraperitoneal ifosfamid uygulanan grubun CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri	60
Tablo 14. Balb/c fare bulgularının istatistiksel analizi	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. İfosfamid çalışma mekanizması (48).....	14
Şekil 2. Deney hayvanları görüntüleri	25
Şekil 3. Balb/c farelerin kontrol grubunda osteosarkom hücrelerinin enjekte edildiği ve tümör oluşumunun gözlenmediği alanlar.....	32
Şekil 4. 146- (Kontrol Grubu) inflamatuvar yanıt yok	33
Şekil 5. 147-(Kontrol Grubu) İnflamatuvar yanıt düşük	33
Şekil 6. 152-CD64 (Kontrol Grubu) Seyrek Histiositler	34
Şekil 7. 147-NCR1 (kontrol Grubu) Orta düzeyde Natural killer cell reseptör ekspresyonu.....	34
Şekil 8. 148-FAPA (kontrol Grubu) Artmış fibroblast activating protein ekspresyonu	35
Şekil 9. 160-CD8 (Sement+Mepact Grubu) Sitotoksik T lenfositlerin yakından görünümü	36
Şekil 10. Balb/c osteosarkom fare modelinde sement ve serum fizyolojik kombinasyon immünohistokimya görüntüleri 154-CD20 (Sement+ SF Grubu) Az sayıda CD 20 eksprese eden B lenfositler	38
Şekil 11. 158-CD4 (Sement+ SF Grubu) Artmış T helper hücreler	38
Şekil 12. 156-CD64 (Sement+ SFGrubu) orta düzeyde histiositler	39
Şekil 13. 156-NCR1 (Sement+ SF Grubu) düşük düzeyde Natural killer cell reseptör ekspresyonu.....	39
Şekil 14. 154-CD4 (Sement+ Sf Grubu) Yağ dokusu içinde fibroblastlar ve inflamatuvar hücreler arasında kavrerenkli boyanmış T helper lenfositler.....	40
Şekil 15. 153-CD8 (Sement+ SF Grubu) Çok sayıda sitotoksik T lenfositler.....	40
Şekil 16. Balb/c osteosarkom fare modelinde mifamurtid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası immünohistokimya görüntüleri 161-CD64 (Sement+Mifamurtid Grubu) Çok sayıda histiositler	42
Şekil 17. 161- (Sement+Mifamurtid Grubu) İnflamatuvar yanıt belirgin, monosit ve histiositler daha fazla, anjiogenez var	42

KISALTMALAR

CPC	: Kalsiyum fosfat çimento
CT	: Bilgisayarlı Tomografi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DEÜTFDHAL	: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı
ECI	: Ekstracorporeal Işınlama
IV	: İntravenöz
L-MTP-PE	: Lipozomal muramil tripeptit fosfatidil etanolamin
MAP	: Cisplatin, doksorubisin, metotreksat kombinasyonu
MAPIE	: Cisplatin, doksorubisin, metotreksat kombinasyonuna ifosfamid ve etoposid eklendiği tedavi rejimi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
OOPS	: 1,2-dioleoil fosfatidil serin
OS	: Osteosarkom
PMMA	: Polimetil metakrilat
POPC	: 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidil kolin
RFS	: Rekürrensiz sağkalım
ROS	: Reaktif oksijen türevleri

TEŞEKKÜR

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

Biyomekanik yüksek lisans eğitimimden başlayarak akademik hayatımın her basamağında yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim, bana yaşamımın her anında tecrübelerini aktaran, bana bu imkanı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Hasan HAVITÇIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde çok büyük katkısı bulunan, bilimsel her basamakta yanımda olan, gerek sosyal gerekse bilimsel alanda fikir ve düşüncelerini benimsediğim Prof.Dr. Safiye AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Bölüm içerisinde ihtiyaç duyduğum her an desteğini hissettiğim Prof.Dr. Zekiye ALTUN'a, tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr.Pınar Erçetin ÖZDEMİR, Dr.Ali İhsan KILIÇ, Dr.Nihat Demirhan DEMİRKIRAN ve Melek AYDIN'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde 2018.KB.SAG.100 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 babama Arife BEKCİOĞLU-Ahmet BEKCİOĞLU ve ablalarımın teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan maddi-manevi her türlü desteğini veren abim Özgür ŞAMPIYON'a, desteğini hep bildiğim Muhammet COŞKUN'a teşekkür ederim.

Desteklerini hep bildiğim, geçmişte ve günümüzde hayatıma katkısı olmuş değerli arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ömer BEKCİOĞLU

KEMİK KANSERLERİNDE KULLANILAN KEMO- İMMÜNÖTERAPİNİN VE GREFT MATERYALLERİNİN MİKROÇEVRE İLİŞKİSİ

Doktora Tezi

Ömer Bekcioğlu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Osteosarkom malign osteoblastların proliferasyonu ile karakterizedir. Osteosarkom tedavisinde kullanılan neo-adjuvan kemoterapilerin iyi sonuçlarına karşın post-operatif gelişen rekürrensler ortak bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Post-operatif hastalarda rekürrensi önleyecek yeni yaklaşım arayışları önem taşımaktadır. Çalışmanın amacı *in vitro* olarak ve rekürrensleri önlemede bu bölgeye uygulanacak sement içine emdirilmiş kemoterapötik ve immunoterapötik ajanların *in vivo* deney hayvanda mikroçevre ile ilişkisinin değerlendirilmesidir.

Osteosarkom K7M2 hücreleri kültüre edildikten sonra mifamurtid ve ifosfamid'in *in vitro* deneylerle uygun dozları saptanmıştır. Kontrol, sement+SF, sement+ifosfamid, sement+mifamurtid ve sement+ifosfamid+mifamurtid olacak şekilde 5 grup (7 hayvan/grup) oluşturulmuştur. K7M2 hücreleri Balb/c farelerin sağ gluteal bölgesine verilerek tümör oluşumu ardından ve ilgili gruplar uygulanmıştır. Ayrıca atimik nude farelere de sement+SF, sement+ifosfamid, IP ifosfamid uygulanmıştır. Yedi günlük sonra sakrifikasyon yapıp immunohistokimyasal olarak ile mikroçevre ilişkili CD4, CD8, CD20, CD64, FAPA, NCR1 düzeyleri değerlendirilmiştir. Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi parametrik olmayan testler ve ki kare testleriyle değerlendirilmiştir. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

İn vitro deneyler sonrasında ifosfamid ve mifamurtid ile hazırlanmış sementin osteosarkom hücre hattı olan K7M2 ile etkileşimleri incelenip uygun doz hesaplanmıştır. Ardından çalışmanın *in vivo* basamığına geçilmiştir. 2 farklı hayvan türünde (balb/c ve nude mice) çalışılmıştır. Balb/c farelerde tümör oluşumu gözlenmediği için tümör hücrelerinin verildiği bölgeye ifosfamid ve mifamurtid ile hazırlanan sement cerrahi işlem ile implante edilmiştir. İfosfamid ve mifamurtid ile

hazırlanan sementin tümör mikroçevresinde etkileşimleri görülmüştür. Nüde farelerde ise subkutan enjeksiyon sonrası bir ay içinde tümör oluşmuştur. İmmün yanıtı olmayan bu hayvanlarda ifosfamidin sement ile hazırlanıp implante edilen grubun IP olarak verilen gruba göre daha efektif bulgular elde edilmiştir.

Bulgularımız, kemik çimentosu içinde lokal ifosfamid ve mifamurtid uygulamasının cerrahi sonrası osteosarkomun lokal tedavisine katkıda bulunabileceğini desteklemektedir. Postoperatif biyomalzemeler içinde lokal tedavi, osteosarkomda rekürrensi önlemede katkı tedavi seçeneği olabilir.

Anahtar Kelimeler: Osteosarkom, Mifamurtid, ifosfamid, kemik greft materyali

Tezin sayfa adeti:108

Danışman: Prof.Dr. H. Nur OLGUN

**THE RELATION OF KEMO- IMMUNOTHERAPY USED IN BONE
CANCERS WITH MICROENVIRONMENT**

PhD Thesis

Ömer BEKCİOĞLU

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Department Of Basic Oncology

ABSTRACT

Osteosarcoma is characterized by proliferation of malignant osteoblasts. As a result of the application of neo-adjuvant chemotherapies used in the treatment of osteosarcoma, a significant improvement in clinical outcomes was observed. However, post-operative recurrences continue to exist as a common problem. The search for a new approach to prevent recurrence is important in post-operative patients. The aim of the study is to evaluate the relationship between the microenvironment and the chemotherapeutic and immunotherapeutic agents absorbed in cement to be applied to prevent recurrence *in vivo*.

After osteosarcoma K7M2 cells were cultured, appropriate doses of mifamurtide and ifosfamide were determined by in vitro experiments. 5 groups (7 animals / group) were formed as control, cement + SF, cement + ifosfamide, cement + mifamurtid and cement + ifosfamid + mifamurtid. K7M2 cells were transferred to the right gluteal region of Balb / c mice followed by tumor formation and related groups were applied. In addition, cement + SF, cement + ifosfamide and IP ifosfamide were applied to athymic nude mice. After seven days of observation, sacrifice was performed and CD4, CD8, CD20, CD64, FAPA, NCR1 levels were evaluated immunohistochemically and with microenvironment. Expression levels were evaluated between the groups by Kruskal Wallis and subsequent Mann-Whitney U test and chi-square tests. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

After in vitro studies interactions of cement prepared with ifosfamide and mifamurtide with osteosarcoma cell line, K7M2, were examined and the appropriate dose was calculated. Then the in vivo step of the study was started. It was studied in 2 different animal species (balb / c and nude mice). As no tumor formation was observed in Balb / c mice, cement prepared with ifosfamide and mifamurtide was implanted in the area

where the tumor cells were administered. Interactions of cements prepared with ifosfamide and mifamurtide were observed in the tumor microenvironment. In nude mice, tumors occurred within one month after subcutaneous injection. In these animals with no immune response, more effective findings were obtained from the group that was prepared and implanted with ifosfamidine cement compared to the IP group.

Our findings support that local administration of ifosfamide and mifamurtide in bone cement may contribute to local treatment of osteosarcoma after surgery. Local treatment among postoperative biomaterials may be additive treatment options for preventing recurrence in osteosarcoma.

Keywords: Osteosarcoma, Mifamurtide, ifosfamide, bone graft material

Page number:108

Advisor: Prof.Dr. H. Nur OLGUN

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı

Osteosarkom malign kemik tümörü olup solid tümörler grubuna aittir ve normalde kemikleri oluşturan hücrelerin dejenerasyonu, yani kontrolden çıkması sonucu oluşur (1). Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde sıklıkla ölümcüldür. Doğrudan doğruya kemik dokusundan kaynaklandıkları için, primer yani birincil kemik tümörleri diye de adlandırılır. Osteosarkom sadece kemiğe ve kemik iliği ile ilişkilendirilse de bağ dokusuna, yağ dokusuna ve kas dokusunun yakınındaki sinir dokularına da geçebilir. Kemoterapik tedavi planlamalarında tümör ve çevresi göz önüne alınmaktadır (2,4).

Kemoterapi ilaçlarının önerilen standart kombinasyonları halen yoktur ve optimal tedavi süresi henüz tanımlanmamıştır. Bununla birlikte şu anda, osteosarkom tedavisinde iyi bilinen etkinliğe sahip dört kemoterapötik ajan vardır: doksorubisin, sisplatin, lökovorin kurtarma ile yüksek doz metotreksat ve ifosfamid (3,5,6). Halen, yüksek dereceli, metastatik olmayan osteosarkom hastalarının % 60-70'inde bu üç veya dördü ajan neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi rejimleri sonrasında uzun süreli, hastalıksız sağ kalım sağlanmaktadır (7). Standart kemoterapinin sunulmasından bu yana, standart terapötik amaçlı armonantaryuma etkinliği kanıtlanmış yeni ilaçlar eklenmemiştir. Çeşitli çalışmalar, çok etkenli kemoterapinin biyolojik cevap modifikatörleri ve immün aktivatörlerle kombinasyonun ek tedavi yararları sağlayabileceğini önermektedir (8,9).

Bir immünoadjuvan terapi olan mifamurtid, osteosarkomda son zamanlarda gelişen terapötik ilerlemedir. Mifamurtid, doğal immün sistemi aktive edebilen, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler için ortak olan minimal peptidoglikan motifi olan muramil dipeptidin sentetik lipofilinin bir analogudur.

Mifamurtid ile aktive olan monositler ve makrofajlar, serum TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 düzeylerinde artışa ve diğer bağışıklık hücrelerinin etkilenmesine neden olurlar. Yukarıda belirtildiği gibi, bu sitokinler, kemik mikro çevresi içindeki normal ve patolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir. Aynı zamanda IL-6, fare modellerinde osteosarkomun gelişimi için hız sınırlayıcıdır (10, 11).

Ifosfamid (IFS), bir DNA-alkilleyici ajan ve siklofosfamidin bir yapısal analogudur. Ön ilaç olarak davranır ve metabolizması ağırlıklı olarak hepatositlerde

bulunan CYP 3A4 ve CYP 2B6 enzimlerinden oluşur (12). Sement genellikle kemik hasarlarını onarmak ve kemiği bütün hale getirmek için ortopedi alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Kanser cerrahisi sonrası kemiklerde kullanılan sementin mifamurtid ve ifosfamid ile etkileşiminin araştırılmadığı görülmüştür. Kanser mikroçevre ile ilişkisinin saptanmadığı görülmüştür. Çalışmamızda lokal nüksleri önlemek için kanser oluşan Balb/c farelerde kemoterapi ya da mifamurtid emdirilmiş sement kullanımının, kanserli çevrenin büyümemesi, lokalize kalması ve tümör baskılayıcı olarak yarar sağlayacağı düşünülmüştür.

Polimetil metakrilat (PMMA) kemik çimentosu olarak adlandırılır ve çeşitli ortopedi ve travma cerrahisinde implant fiksasyonu için yaygın olarak kullanılır. PMMA, iki steril bileşen karıştırılarak oluşturulan bir akrilik polimerdir. Sıvı olan bileşen MMA monomerdir ve katı halde bulunan bileşen güçlendirilmiş bir MMA stiren ko-polimerdir. İki bileşen karıştırıldığında, sıvı monomer önceden polimerleştirilmiş toz parçacıklarının etrafında polimerize olur ve böylece sertleştirilmiş PMMA oluşur. Bu süreçte, bir ekzotermik reaksiyon nedeniyle ısı üretilir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı osteosarkom hücrelerine mifamurtid ve ifosfamid'in mikroçevre ve kemik greft materyali olan sement ile etkileşiminin in vitro ve in vivo deney hayvanı modelinde incelenmesidir.

1.3. Araştırma Soru ve Hipotezleri

Bu araştırmanın ana hipotezi, semente absorbe ettirilmiş olan kemoterapötik ifosfamidin lokal rekürrensi önleyeceği, immünoterapötik mifamurtidin de tümör ve mikroçevresine immün komponentleri çekerek immün yanıt oluşturacağıdır. Buna dayanarak araştırmada şu soruların yanıtları aranmıştır:

1. Tümöre karşı ifosfamidin apoptoz ve nekroz üzerindeki etkisi sadece kemik çimentosu uygulanmasından farklı mıdır?
2. Tümöre karşı mifamurtidin apoptoz ve nekroz üzerindeki etkisi sadece kemik çimentosu uygulanmasından farklı mıdır?
3. Lokal uygulanan ifosfamidin etkisi kemik çimentosu ile azalmakta mıdır?

4. Kemik imentosu içinde uygulanan mifamurtid tümör mikroçevresinde immün yanıtı tetiklemekte veya arttırmakta mıdır?
5. Kemik imentosu içinde uygulanan mifamurtid tümör içine T lenfosit infiltrasyonunu arttırmakta mıdır?



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteosarkoma Tanımı

Osteosarkom (OS) mezenkimal kökenli osteoid üreten bir malignitedir. Bu yüksek dereceli tümör, kemiğin en sık görülen primer malignitesidir ve hem çocuklarda hem de yetişkinlerde sıklıkla ölümcüldür (13). Ulusal Kanser Enstitüsü SEER (Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar) programına göre primer kemik kanserleri tüm kanserlerin %0,2 'sinden daha azını temsil ederken, son on yılda sıklıkları yılda %0,3 oranında artmaktadır (13, 14). Yirminci yüzyılın büyük bir kısmı için, tipik OS için beş yıllık sağkalım oranları %20 idi. 1970'lerde, OS tedavisinde adjuvan kemoterapinin uygulanması sağkalım oranlarını %50'ye çıkardı (14-16). 1970'lerin ortalarından önce, amputasyon yüksek dereceli OS için rutin tedaviydi. 1990'a kadar, yüksek dereceli OS yönetimi, kemoterapi ve ekstremité kurtarmaya daha fazla vurgu yapmak için değişmiştir. Mevcut sağkalım oranı >%65'e yükselmiştir (17).

2.2. Osteosarkom Epidemiyolojisi

Osteosarkomun bimodal yaş dağılımı vardır. İlk pik, pubertal büyüme artışına karşılık gelen 10 ila 14 yaş grubundadır. Bu grup primer osteosarkomların büyük çoğunluğunu temsil eder. Sıfır ila 14 yaş aralığında, tüm ırklarda ve cinsiyetlerde osteosarkom insidansı oranı milyon kişi başına yılda 4 vakadır (3.5 ila 4.6,% 95 güven aralığı). Bu sayı, 0 ila 19 yaş aralığı için milyon kişi başına yılda 5 vakaya (4,6 ila 5,6,% 95 güven aralığı) yükselir. Bir sonraki gözlemlenebilir pik, osteosarkom görünümünün Paget hastalığının malign dejenerasyonu, kemik enfarktüsü bölgeleri, vb. nedeniyle ortaya çıkan ikincil kanseri temsil etme olasılığı daha yüksek olduğunda 65 yaşından büyük yetişkinlerde görülür. Hastanın yaşının sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur; en düşük sağkalım yaşlı bireyler arasındadır. Osteosarkom için ölüm oranları yılda yaklaşık % 1.3 azalmaktadır. Beş yıllık genel sağkalım oranı cinsiyete bakılmaksızın yaklaşık % 68'dir (18).

Osteosarkom, pediatrik kanserlerin yaklaşık% 2.4'ünü oluşturur ve sekizinci en sık görülen çocukluk çağı malignitesidir. Lösemi en sık görülenidir (%30), ardından merkezi sinir sistemi maligniteleri (%22,3), nöroblastom (%7,3), Wilms tümörü (%5,6), Hodgkin Dışı lenfoma (%4,5), rabdomiyosarkom (% 3,1) ve retinoblastomdur (%2,8) (18).

Siyahlar, osteosarkomdan etkilenme olasılığı en fazla olan etnik gruptur ve insidans oranı milyonda yılda 6,8 vakadır. Hispanikler, milyon kişi başına yılda 6,5 vaka insidansıyla yakın ve ikinci sıradadır. Beyaz ırk bireyleri bu maligniteyi milyonda yılda 4,6 vaka yaşamaktadır. Osteosarkom insidansının erkeklerde kadınlardan daha yüksek olduğu rapor edilmiştir, insidans erkeklerde milyon başına yılda 5.4 vaka ve milyon kadında yılda 4 vaka görülmüştür (17).

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-ilişkili 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 yıllar içerisinde gelişmiştir (20). Herhangi bir şüpheli kemik lezyonu için, tüm kemiğin ve bitişik eklem en az iki X-ışını görüntüsünü almayı içeren preoperatif bir görüntüleme protokolü izlenmelidir. Radyografiler kemik metafizinde, osteoblastik ve / veya osteolitik alanlar, periost reaksiyonu ve yumuşak doku kitlesi ile birlikte kötü tanımlanmış bir lezyon gösterecektir (21-23). Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) lezyonun yumuşak doku ve nörovasküler yapılara invazyonunu, kemik iliği replasman seviyesini, lezyonları ve sınır eklemine genişlemesini değerlendirmek için gereklidir. (22, 23).

Bilgisayarlı tomografi (BT) taramaları kortikal düzensizliklerin, kırık bölgelerinin, mineralizasyonun ve nörovasküler tutulumun tanımlanmasında yararlıdır (23). Kemik sintigrafisi, polioototik tutulum, metastaz ve intraosseöz tümör genişlemesinin gösterilmesine yardımcı olabilir. Anjiyografi vasküler anatomisinin gösterilmesine yardımcı olabilir. Bu, proksimal tibia veya omuz kuşağında tümörü olan hastalarda preoperatif planlama için yararlıdır, çünkü bunlar yaygın vasküler anatomik anomalileri olan bölgelerdir. Pozitron emisyon tomografisi (PET) taramaları primer lezyonları değerlendirmek ve diğer kemiklerde ve akciğerlerde metastatik lezyonları saptamak için kullanılabilir (21). Bazı araştırmacılar, hastalığın kemoterapiye histolojik yanıtını değerlendirmek ve progresyonsuz sağkalımı öngörmek için PET taramaları kullanılmasını önermektedir (23).

OS tanısında biyopsi mutlaklıtır. Son aşamada yapılan tümör rezeksiyonu biyopsi hattını içermelidir, çünkü bu yol tümör hücreleriyle kontamine olabilir. Cerrah ileri zamanlarda gerçekleşecek cerrahiyi göz önünde bulundurarak biyopsi yolu seçmelidir (22-25). Açık biyopsi % 98 doğruluk oranı nedeniyle altın standart olarak kabul edilmiştir. Ancak özellikle biyopsi nihai tedavi alanının dışında yapılıyorsa, açık biyopsi ile ilişkili komplikasyonlar oluştuğu görülür (26). Lokal kontaminasyon riski daha az olduğu için çekirdek biyopsi tercih edilir. Ekstremitte koruyucu cerrahi geçirebilecek hastalarda bu önemlidir (21). Histolojik olarak OS osteoblastik, kondroblastik veya fibroblastik olarak görünecektir (27).

OS için tanı koyan bir laboratuvar testi yoktur; bununla birlikte, tam kan sayımı, temel metabolik panel, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri ve idrar tahlili, kemoterapiye başlamadan önce hastanın temel organ fonksiyonunu değerlendirmek için yararlıdır. Osteoblastik aktivite alkalın fosfataz düzeyleri ile değerlendirilebilir ve osteoklastik etkinliği değerlendirmek için laktat dehidrojenaz seviyeleri kullanılabilir (28).

2.5. Osteosarkom Evrelemesi

Osteosarkomda kullanılan evreleme sınıflandırması, Enneking sistemi olarak da bilinen Kas İskelet Sistemi Tümörü Derneği evreleme şemasıdır. Bu sistem, tümörün düşük veya yüksek dereceli (I veya II) olup olmadığını, tümörün intra- veya ekstra bölmeli (A veya B) olup olmadığını ve metastaz olup olmadığını belirler (III). Evre IA, kortikal olan düşük dereceli tümörü, IB, kortikal olan düşük dereceli tümörü, IIA, kortikal olan yüksek dereceli tümörü ve IIB, ekstra-kortikal. Metastatik hastalık hastayı otomatik olarak evre III kategorisine yerleştirir. OS hastalarına en sık evre IIB tanısı konur (18).

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

Osteosarkom tedavisi için mevcut standart neoadjuvan kemoterapi, cerrahi ve daha sonra ameliyat sonrası adjuvan kemoterapiyi kullanmaktadır.

2.6.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi eksizyon genellikle negatif sınırlarla tümör rezeksiyonunu içerir, çünkü çoklu çalışmalar pozitif marjları lokal rekürrens (LR) ve düşük sağkalım riski ile ilişkilendirmiştir (29). Klasik olarak, Enneking ve ekibi dört farklı cerrahi sınır

tipini tanımlamıştır: intralezyonel, marjinal, geniş ve radikal (30). Tümörün içinden örnek alındığında, adından da anlaşılacağı gibi intralezyonel bir sınır elde edilir. Bu marjların çok az terapötik faydası olmasına rağmen, genellikle biyopsiler için kullanılırlar ve tanısal amaçlarıdır. Marjinal ve geniş kenar boşlukları, lezyon bloğunu çıkarır ve geniş bir normal doku sınırı bırakır. Tümörü çevreleyen bu normal doku sınırı, OS tedavisinde kesinlikle çok önemlidir. Yaygın hastalığı olan hastalarda akciğer metastazının tam rezeksiyonu mümkün olduğunda hayati önem taşımaktadır (31, 32). Bunun nedeni akciğer metastektomisinin bu popülasyonda sağkalımı önemli ölçüde uzatmasıdır (33, 34).

Tekrarlayan rezektabl metastazları olan hastalar, ameliyat öncesi kemoterapi ile agresif bir şekilde tedavi edildiklerinde bile genellikle daha kötü prognoz gösterirler. Tekrarlayan veya refrakter hastalık için, bazı çalışmalar etopositin kemoterapi tedavi rejimine dahil edilmesinin yararlı olabileceğini önermektedir. Bununla birlikte, bu veriler tartışmalıdır ve ciddi toksisitelerle ilişkilidir. Mümkün olduğunda, tekrarlayan hastalığın cerrahi rezeksiyonu sistemik tedaviye göre ilk basamaktır ve bu daha az etkili olup rezeke edilemeyen vakalar için ayrılmıştır (35-37).

2.6.2. Kemoterapi Tedavisi

OS kemoterapi tedavisi, iki ila yedi ilacı içeren farklı kemoterapi rejimlerini içermektedir (38, 39). Tutarlı aktivite gösteren dört ilaç, cisplatin, doksorubisin, lökovorin kurtarmalı yüksek doz metotreksat ve etoposid içeren veya içermeyen izofosfamiddir. Yakın tarihli bir meta-analiz, üç ilaçla tedavi edilen hastaların, iki ilaç alanlara göre daha üstün bir sonuca sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, üç ilaca kıyasla dört ilacın kullanımında bir avantaj olmamıştır (40). Gerçekten de, standart veya yüksek doz ifosfamid eklenmesi, toksisiteyi önemli ölçüde artırdığı için hastalık sonucuna dair ihmal edilebilir etkiler yaratmıştır (41). Bu durum kısa bir süre önce, cisplatin, doksorubisin, metotreksat kombinasyonuna (MAP) yüksek doz ifosfamid ve etoposid eklenmesinin hiçbir faydası olmadığını göstermiştir (42). Bu nedenle, MAP, çok ajanlı kemoterapi şu anda ilk basamak tedavi ve standart tedavi yöntemidir.

Neoadjuvan (ameliyat öncesi) kemoterapi, metastatik olmayan hastalığı olan hastaların rekürrensiz sağkalımını (RFS) büyük ölçüde artırır. Ayrıca, önemli prognostik ve klinik değere sahip olan ve postoperatif tedavi stratejilerini değiştirme fırsatı sunan histolojik yanıt alt gruplarına tümör kategorizasyonu sağlar. Neoadjuvan kemoterapi ile pozitif bir tedavinin amacı, cerrahi olarak rezeke edilen tümörde en az % 90 nekroz elde etmektir. Neoadjuvan tedaviden sonra rezeksiyonda nekroz yüzdesi % 90'ın altındaysa, rezeksiyon sonrası adjuvan kemoterapi rejimi değiştirilebilir (37). Ancak, ameliyat sonrası yanıtla göre kemoterapi rejiminin değiştirilmesinin hasta sonuçları üzerinde olumlu bir etkisi olmadığı gösterilmiştir; gerçekten de, EURAMOS-1 randomize kontrol deneme serisinden elde edilen bir başka bulgu, zayıf yanıt verenler için kemoterapi rejimlerinin yoğunlaşması sonucu (ifosfamid ve etoposidin eklenmesi, yani MAPIE) artan toksisite ve ikincil maligniteler olduğunu bildirmiştir (43).

2.6.3. Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, şüpheli etkinliği ve ilişkili enfeksiyon riski nedeniyle OS tedavisinde tartışmalı bir role sahiptir. Japonya'da düşük maliyetli rekonstrüktif modaliteye ek olarak ilginç bir uygulama popüler hale getirilmiştir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada ekstrakorporeal ışınlama (ECI) uygulandıktan sonra 101 sarkomlu (37'si OS) hasta geriye dönük olarak gözden geçirilmiş ve bazı umut verici sonuçlar vermiştir. ECI, ilgili kemiğin blok rezeksiyonundan, her kemik segmentinin 50 Gy radyasyonla tedavisinden ve kemiğin nihai replantasyonundan oluşur. OS'lu 37 hastanın hiçbirinde hastalık nüksü görülmemiştir. Araştırmacılar ECI'yi hastalığın nüksetmesini önlemede etkili olan ve düşük bir enfeksiyon riski taşıyan düşük maliyetli bir tedavi olarak desteklemektedir (44).

2.7. İfosfamid

Ifosfamid, tek bir ajan olarak veya çok çeşitli maligniteleri tedavi etmek için diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanılan bir alkilleyici ajan ve bir siklofosfamid analogudur. Bu maligniteler arasında (45):

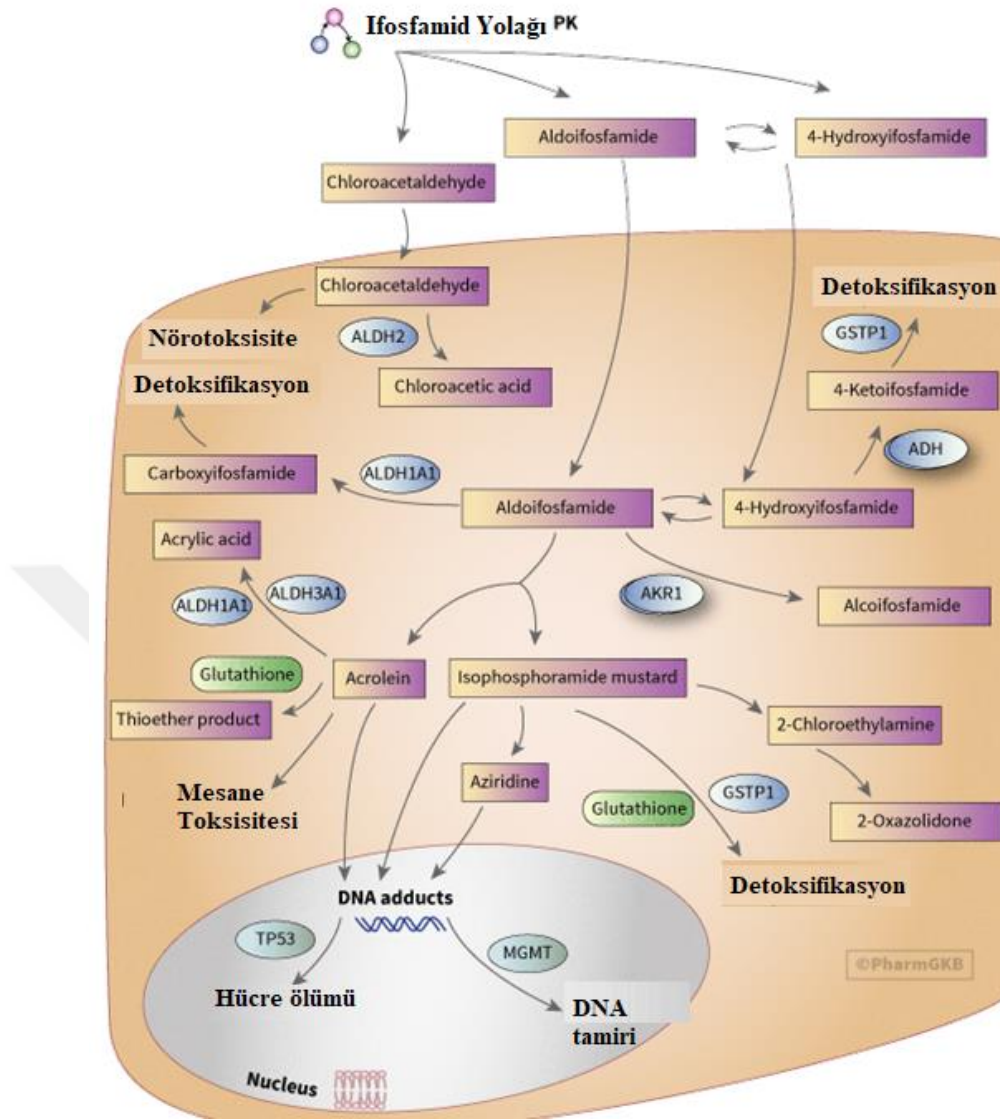
- Testisin germ hattı tümörü
- Yumuşak Doku Sarkomları
- Ewing Sarkom
- Rahim ağzı kanseri (rekürren veya metastatik)

- İleri Mesane Karsinomu
- Hodgkin Dışı Lenfoma
- Hodgkin lenfoma
- Küçük ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri
- Osteosarkom
- Over kanseri
- Timik kanser

Tüm bu kanserler arasında, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ilacı sadece testisin germ hattı tümörü için onaylamıştır.

Ifosfamid, oksazofosforin alkilleyici ajanların sınıfına aittir. Ana formunda (ön ilaç) aktif olmayan bir bileşiktir. Aktif metabolitlere CYP450 enzimleri tarafından karaciğerde metabolize olur. Bu aktif metabolitler (fosforamid hardal türevleri ve akrolein) DNA'ya bağlanır ve DNA sentezini inhibe eder (46). Bu metabolitin etki ettiği iki mekanizma aşağıdaki gibidir:

Birincisi, interstrand veya intrastrand çapraz bağlar oluşturarak hücre hasarına neden olur ve ikincisi, hasarlı hücrenin apoptozuna yol açar (47). Bu aktif metabolitler, onarılamaz DNA hasarı ile sonuçlanan ve protein oluşumunu durduran reaktif oksijen türlerini (ROS) düzenler. Diğer alkilleyici bileşiklerle karşılaştırıldığında, siklofosfamid ve ifosfamid türevleri olarak daha fazla anti-tümör aktivitesine sahiptir, fosforamid hardal türevleri ve akrolein sitostatik değil sitotoksiktir (47) (Şekil 1).



Şekil 1. İfosfamid çalışma mekanizması (48)

Filtrasyon öncelikle böbrek yoluyla gerçekleşir ve dozlar böbrek fonksiyonuna göre ayarlamayı gerektirir. İlacın birincil uygulama şekli intravenöz (IV) yoldan geçer (49). Oral formun yüzde 100'e yakın bir biyoyararlanımı olmasına karşın ciddi nörotoksisite ile sonuçlanmış ve o zamandan beri uygulama intravenöz forma geçilmiştir (50). Araştırmacılar, yirmi yıl önce ifosfamidi keşfetmiş ancak hemorajik sistit gelişmesine bağlı olarak doz sınırlamalarına maruz kalmışlardır. Sadece tiyol nöroprotektif bileşik mesna mevcudiyetinden sonra ilaç çok çeşitli maligniteleri tedavi etmek için daha yaygın olarak kullanılmıştır. Bu nedenle uygulama neredeyse her zaman mesna ile birlikte (49).

Olumsuz etkiler esas olarak doza bağlıdır. Bunlar sistemlere göre tanımlanabilir (50). Bu sistemler gastrointestinal, dermatolojik, merkezi sinir sistemi, hematolojik, renal, endokrin ve kardiyaktır (51, 52):

1. Gastrointestinal: Bulantı ve kusma (% 50'nin üzerinde); karın krampları; anoreksiya - genellikle hastaların hidrate kalmaları tavsiye edilir ve bu terapi sırasında çok su içmeleri önerilir (51). Antiemetikler genellikle ilaçla birlikte verilir (52).
2. Dermatolojik: alopesi - ifosfamid ile not edilen evrensel bir yan etkidir. (% 90)
3. Merkezi sinir sistemi: ensefalopati. (% 15)
4. Hematolojik: lökopeni, anemi, trombositopeni. (% 30 ila 50)
5. Böbrek: hematüri (% 90) - tek başına kullanıldığında.
6. Endokrin ve metabolik: metabolik asidoz. (% 30)
7. Kardiyak: Aritmiler. (% 10'un altında) (53)

2.7.1. Ifosfamidin Osteosarkomda Kullanımı

1980'lerin başında, osteosarkomlu hastaların sağkalımını artırmak için etoposid ile birlikte veya etoposid olmadan ifosfamid, kemoterapi ile birlikte kullanılmıştır. Osteosarkom için standart tedavilerden sonra rekürrens yaşayan hastalar, ifosfamide maruz kaldıklarında kayda değer yanıtlar göstermiştir (54, 55). Fransız Pediatrik Onkoloji Derneği'nin relaps veya refrakter osteosarkomlu hastaları içeren bir Faz II çalışmasında, ifosfamid ve etoposidin kombine tedavisi % 48 yanıt oranı ile sonuçlanmıştır (% 95 güven aralığı (CI)): % 29, % 67). Bununla birlikte, bu sonuçlar Alman / Hollandalı / Avusturya / İsviçre Kooperatifi Ewing'in Sarkom Çalışmaları (*Gesellschaft für Padiatrische Onkologie und Hamatologie'den*) ve Birleşik Krallık Çocuk Kanseri Çalışma Grubu'ndan iki çok kurumlu grubun çalışmalarından farklıdır. Bu iki çalışmada, hastalara ifosfamid ile veya ifosfamid olmadan neoadjuvan tedavisi verilmiş olmasına karşın sağkalımda anlamlı bir fark bulunmadı (56).

2.8. Mifamurtid

Lipozomal muramil tripeptit fosfatidil etanolamin (L-MTP-PE) olarak da bilinen mifamurtid, Avrupa'daki osteosarkom tedavisi için onaylanmıştır. Mifamurtid'in rasyonel ilaç tasarımı, sentetik fosfolipidler 1-palmitoil-2-oleoil

fosfatidil kolin (POPC) ve 1,2-dioleoil fosfatidil serin (OOPS) içeren çok lamelli lipozom ilaç taşıyıcısında makrofaj aktivasyonu için MTP-PE kullanır. İlaç in vitro normal veya tümör hücrelerine karşı sitotoksik olmamasına rağmen, in vivo olarak osteosarkomun akciğer metastazlarına karşı immün aktivasyonu, mifamurtidin anti-osteosarkom etkilerini açıklar. Fosfatidil serin içeren lipitler, apoptozdan sonra dış zarına "çevrilmiş fosfatidil serin" içeren makrofaj hücrelerine işaret eder (örn, tümör hücrelerinin kemoterapiden hasar görmesinden sonra); bu nedenle, hem mifamurtidin aktif hem de inaktif bileşenleri, akciğerlerdeki bağışıklık hücrelerini hedefler. Mifamurtid uygulaması, osteosarkomlu metastatik olmayan ve metastatik hastalarda kemoterapiye eklendiğinde 6- ve 5 yıllık genel sağkalımda % 8 ve % 13 iyileşme ile sonuçlanmıştır. Mifamurtidin kısa süreli toksisiteyi (ateş, baş ağrısı, grip benzeri semptomlar ve sertlikler), ilk infüzyon için premedikasyon olarak ibuprofen (200 mg) kullanılarak azaltılır veya ortadan kaldırılır; öncesi ve sonrası için bir algoritma sunulmaktadır. Bugüne kadar, mifamurtidin uzun vadeli yan etkileri bildirilmemiştir. İki büyük kanser merkezinde (MD Anderson ve Memorial Sloan-Kettering) bulunan merhametli erişim programları, Kuzey Amerika'da bu potansiyel olarak hayat kurtarıcı ilacı sağladı. Mifamurtid deneyimi, düzenleyici kurumlar ve kurumlar, ilaç endüstrisi ve pediatrik onkologlar arasında kanser tedavisini ve nadir görülen sarkomu olan çocuklar ve gençler için sonuçları iyileştirmek için başarılı bir işbirliği örneği sunmaktadır (57).

2.8.1. Mifamurtidin Osteosarkomda Kullanımı

Kemoterapi ile karşılaştırıldığında, mifamurtid, tümör hücreleri üzerinde doğrudan bir sitotoksik etkiye sahip olmak yerine, sitotoksiteyi dolaylı olarak etkilemek için bağışıklık sistemini modüle etmesi bakımından benzersiz bir etki tarzına sahiptir (58). Ekstremitte cerrahisi ile ilişkili enfeksiyonların hem köpeklerde hem de osteosarkomlu insanlarda sağkalım üzerinde olumlu bir etkisi vardır. Kemoterapiden sonra daha yüksek mutlak lenfosit sayısında düzelme de sağkalımda iyileşme ile ilişkili gibi görünmektedir. Gerçekten de, sağkalımın iyileştirilmesinde rol oynayan immün sistem için en iyi kanıt, fosfatidil kolin + fosfatidil fosfatidil etanolamin (L-MTP-PE; mifamurtid) içeren bir makrofaj aktivatörü kullanılarak yapılan 20 yıldan fazla çalışmadan elde edilmektedir (59-61).

2.8. Kemik Çimentosu

Polimetil metakrilat (PMMA) yaygın olarak kemik çimentosu olarak bilinir ve çeşitli ortopedik ve travma cerrahisinde implant fiksasyonu için yaygın olarak kullanılır. Gerçekte “çimento” yanlış adlandırmadır çünkü çimento kelimesi iki şeyi birbirine bağlayan bir maddeyi tanımlamak için kullanılır. Bununla birlikte, PMMA, implantı kemiğe karşı tutan sıkı bir alan oluşturan ve böylece bir 'harç' olarak işlev gören bir boşluk dolgu maddesi olarak işlev görür (62). Kemik çimentolarının kendinden yapışkanlı özellikleri yoktur, ancak bunun yerine kemik yüzeyi ve protez gibi yüzeyler arasında yakın mekanik kilitlenme gerçekleşmektedir. Ticari olarak temin edilebilen diğer kalsiyum fosfat çimentoları (CPC 'ler) ve cam polialkenoat (iyonomer) çimentoları (GPC 'ler) gibi diğer kemik çimentosu, çeşitli ortopedik ve dental uygulamalarda başarıyla kullanılmaktadır. TBM'ler biyolojik olarak emilebilir ve biyouyumludur, ancak esas olarak düşük mekanik mukavemetleri nedeniyle kraniyal ve maksillo-yüz cerrahilerinde kullanılır (63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Subkutan ksenograft nude ve Balb/c fare osteosarkom tümör modelinde cerrahi rezeksiyon sonrası lokal olarak bu bölgeye konulacak kemik çimentosu içindeki kemoterapötik ajanların ve immunoterapötik ajanların tümör ve mikroçevresinin üzerine etkinliğinin değerlendirilmesini amaçlandığı bu çalışma deneysel çalışma olarak planlandı.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın hücre kültürü bölümü, sakrifikasyon sonrası immünohistokimyasal ve diğer analizler Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim dalında, in vivo deney hayvanı modeli deneyleri, sakrifikasyon aşaması Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Araştırmaya 2017 yılında başlandı ve veri toplama işlemi 2019 yılında sonlandırıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda üretilen balb/c ve nude farelerle deneysel olarak gerçekleştirildi.

Çalışmada 4 haftalık ortalama ağırlıkları 25 gr. olan, 35 adet erkek Balb/c fareler rastgele seçilerek, her biri 7 fare içeren beş grup oluşturuldu.

Grup I Kontrol grubu (n: 7) : Tümör enjekte edilen Balb-c grup

Grup II (n: 7) : Tümör enjekte edilip SF emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Grup III (n: 7) : Tümör enjekte edilip mifamurtid emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Grup IV (n: 7) : Tümör enjekte edilip ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Grup V (n:7) : Tümör enjekte edilip mifamurtid+ ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Atimik nüde fareler için oluşturulan gruplar: Atimik Nude mice, erkek, 4-6 haftalık, 25-30 gram, 28 adet

Grup I Kontrol grubu (n: 7) : Tümör oluşturulan grup

Grup II (n: 7) : Tümör oluşturulup subtotal rezeksiyon sonrası SF emdirilmiş sement yerleştirilen grup

Grup III (n: 7) : Tümör oluşturulup subtotal rezeksiyon sonrası ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilen grup

Grup IV (n: 7) : Tümör oluşturulup subtotal rezeksiyon sonrası sement yerleştirilip, IP ifosfamid verilen grup

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 ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) 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:

- ✓ CD4 antikor (IHK)
- ✓ CD8 antikor (IHK)
- ✓ CD20 antikor (IHK)
- ✓ CD64 antikor (IHK)
- ✓ NCR1 antikor (IHK)
- ✓ FAPA antikor (IHK)
- ✓ İnkübatör ana kartı (thermo için)
- ✓ Kemik çimentosu
- ✓ 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 özeltisi)
- ✓ K7M2 osteosarkom hücre hattı
- ✓ RPMI-1640 medium 500 ml
- ✓ FBS ftal 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 100lk
- ✓ 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 100lk
- ✓ 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, CD4, CD8, CD20, NCR1, FAPA yüzdeleri ve Balb/c 'ler için inflamasyon

Araştırmanın bağımsız değişkeni: İlaç ve cement uygulanan gruplar

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Kültürü

İfosfamid ve mifamurtidin *in vivo* osteosarkom fare modelindeki etkisinin belirlenmesinden önce doz optimizasyonları için, K7M2 hücre hattında canlılığına bakılmıştır. Bu amaçla hücreler %10 fetal bovin serum (FBS) içeren DMEM ortamında (%1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin 'li) kültüre edildikten sonra 37°C, %5 CO² koşulları sağlayan inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler yaklaşık 2x10⁶ düzeyine eriştiğinde hücreleri kaldırmak amacıyla Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılıp, hücreler 96 kuyucuklu plate içine 6 kuyucuk/ grup ve kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler tutunup %70 konfluent hale gelince sonra hücrelerin kalkmamasına dikkat edilerek üst fazlar pipetlenip uzaklaştırılacak ve ifosfamidin farklı dozları (10 ug/ml, 20 ug/ml, 40 ug/ml) tek başına ve sement ile birlikte; mifamurtidin de farklı dozları (0,25 ug/ml, 0,5 ug/ml, 1 ug/ml) tek başına ve sement ile birlikte verilmiştir. Plate 24 saat 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldıktan sonra WST ile hücre canlılığı tayini yapıldı. Sement içinden salınımı en uygun olacak doz optimizasyon deneylerine göre belirlenmiş ve hayvan deneyi için uyarlanmıştır.

3.6.2. Hücre Canlılık Testi

WST ile hücre proliferasyonunun tayini için hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu plate içinde boş bir kuyucuğa da sadece ortam koyularak kör olarak kullanıldı. 100 µl/kuyucuk hücre için her kuyucuğa 10 µl/kuyucuk WST-1 hücre proliferasyon reaktifi eklendi (1:10 dilüsyon). Hücreler 37°C %5 CO₂ lik etüvde 2

saat inkübasyona bırakıldı. Plate çalkalayıcıda bir dk çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 420- 480 nm de okutuldu. Referans dalga boyu olarak 600 nm den fazlası (630 nm) seçildi. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edilerek diğer absorbanslar karşılaştırılarak hücre canlılık yüzdeleri tayin edildi.

3.6.2. Fare Ksenograft Modelinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılan 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. Balb/c fareler ise hepafiltreli olmayan kafeslerde aynı koşullarda barındırıldı. Tüm farelerin çalışma boyunca $20\pm2^{\circ}\text{C}$ oda ısısında, 12 saatlik aydınlık/ karanlık ortamda tutulup, pellet fare yemi ile beslenmesi ve suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlanmıştır.

Balb/c farelere yapılan işlemlerin günlük süreçleri tablo 3 'de yer almaktadır.

Tablo 3. Balb/c hayvanlara yapılan günlük uygulamalar

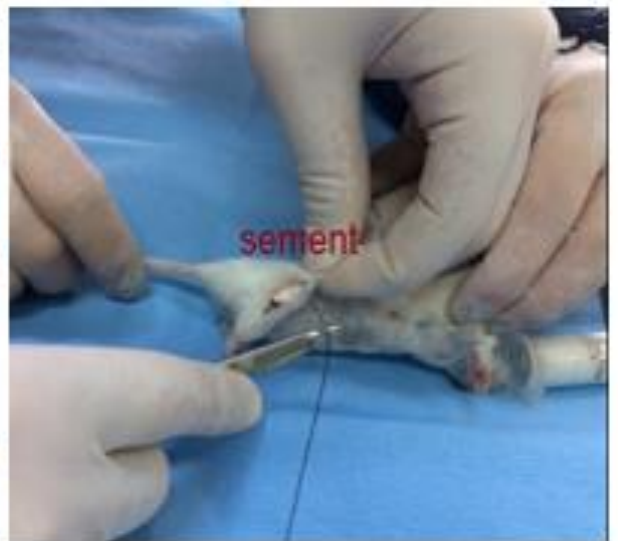
0. gün	1.gün	2-6. günler:	7.gün
Tüm gruplara sağ gluteal bölgeye subkutan 1×10^6 tümör hücre (K7M2 osteosarkom hücre hattı) enjeksiyonu	Grup I: - Grup II: Dietil eter anestezisi altında operasyon ile sağ yan gluteal bölgeye SF emdirilmiş sement yerleştirilmesi Grup III: Dietil eter anestezisi altında operasyon ile sağ yan gluteal bölgeye 100 ug mifamurtid emdirilmiş sement yerleştirilmesi Grup IV: Dietil eter anestezisi altında operasyon ile sağ yan gluteal bölgeye 10 mg ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilmesi Grup V: Dietil eter anestezisi altında operasyon ile sağ yan gluteal bölgeye 200 ug mifamurtid+ 20mg ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilmesi	Günde 2 kez hayvanların gözlem ve yakın takibi Ağrı varlığında analjezik desteği	Tüm gruplarda sakrifikasyon, Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme

Atimik nude farelere yapılan işlemlerin günlük süreçleri tablo 4 'de yer almaktadır.

Tablo 4. Atimik nude hayvanlara yapılan günlük uygulamalar

0. gün	1.gün	2-6. günler:	7.gün
Tüm gruplara sağ gluteal bölgeye subkutan 10^6 tümör hücre (K7M2 osteosarkom hücre hattı) enjeksiyonu	Grup I: Sadece tümör olan grup Grup II: Dietil eter anestezisi altında operasyon ile sağ yan gluteal bölgeye SF emdirilmiş sement yerleştirilmesi Grup III: Dietil eter anestezisi altında operasyon ile sağ yan gluteal bölgeye 100 ug ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilmesi Grup IV: Dietil eter anestezisi altında 10 ug/kg intraperitoneal ifosfamid uygulanan	Günde 2 kez hayvanların gözlem ve yakın takibi Ağrı varlığında analjezik desteği	Tüm gruplarda sakrifikasyon, Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme

Sementin yerleştirilmesi için yapılan cerrahi girişimler, atimik nude fareler için klas 2 kabinette gerçekleştirildi. Balb/c farelerde ise operasyon odasında gerçekleştirildi. Girişimsel işlemler öncesinde hayvanlarda sedasyon sağlamak üzere dietileter inhalasyonu uygulandı. Batikonla lokal insizyon yeri temizlendikten sonrası cilt, ciltaltı kesilip tümör görülerek ve gruplara göre tümü ya da 15 mm^3 tümör residü kalacak şekilde opere edildi. Hemostaz sağlandıktan sonra lokal maddeler uygulanıp steril suturelerle kapatıldı. Post operatif bakım IVC ve normal kafeslerde yapıldı. Balb/c farelere sement uygulanması, hayvanın anestezisi altında kapatılıp canlılığın sürdürülmesi, sakrifikasyon ve sonrasında sementin çıkarıldığı uygulama bölgesi Şekil 1 'de yer almaktadır.





Şekil 1. Hayvanlara sementin uygulanma ve sonrasındaki işlemler

3.6.3. Kimyasallar

Ifosfamid: Holoxan 2gr/50ml, Baxter, Eczacıbaşı

Mifamurtid: Mepact, 4 mg/50 ml, TAKEDA

Sement : Biomet Bone Cement (Biomet Orthopedics Warsaw, Indiana, USA)

3.6.4. Farelerin araştırmadan çıkarılma kriterleri

Çalışma süresince hayvanlarda sepsis gelişmesi ve uyarılara belirgin derecede azalmış yanıt durumunda, çalışmadan çıkarılmak üzere fareler gözlemlendi. Bununla beraber farelerin ağırlığının % 15'inden fazlasını kaybetmesi durumunda, her bir grupta 5 adet fare olması sağlanana dek yeni farelerle çalışmaya devam edilmesi ve kayıp olması halinde etik kurulun haberdar edilmesi planlanmıştır. Ancak çalışma süresince takiplerde kaybedilen veya çalışmadan çıkarılmak durumunda kalan hiç hayvan olmamıştır.

3.6.5. Farelerin sakrifikasyonu, organ ve dokuların disseke edilmesi

Sementin yerleştirildiği cerrahiden 7 gün sonra fareler sakrifiye edildi. Fareler sakrifiye edilmeden önce dietileter inhalasyon anestezisi uygulandı. Farelerin organ ve dokuları disseke edilerek tümör ve mikroçevresi formol içine konarak immünohistokimyasal ve histomorfolojik analizler için ayrıldı.

3.6.6. İmmünohistokimyasal Analizler

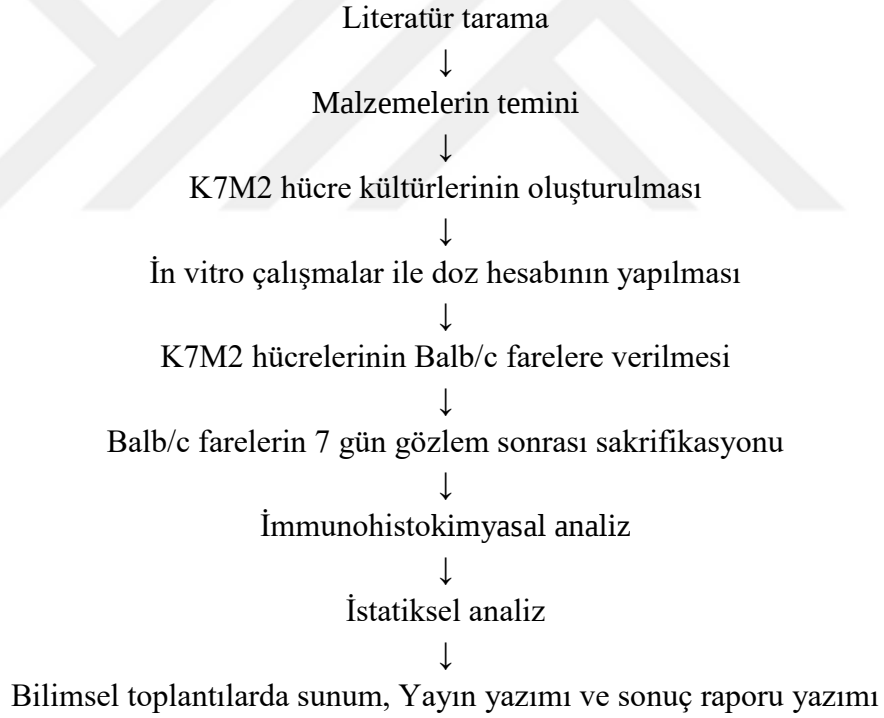
Parafine gömülen tümör dokularından parafin kesitler elde edildikten sonra bir gece 60°C etüvde tutulup ertesi gün 30 dk ksilen içerisinde bekletildi. Tümör ve sement çevresinde T lenfosit, B lenfosit vb hücre dağılımları incelendi. Bu dağılımları analiz edebilmek için immünohistokimya yöntemi ile yardımcı T lenfosit için CD4, sitotoksik T lenfositler için CD8, B lenfosit için CD20, natural killer hücreler için NCR1, Fibroblast için FAPA ve makrofaj oranı için CD64 antikorları kullanıldı. İmmünohistokimya olarak Temel Onkoloji Laboratuvarında bulunan Ventana Discovery cihazı kullanılacaktır. Boyama otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Tümör dokulardan alınan kesitler 3 mikron çapta pozitif yüklü lamalar üzerine alındı. 60 derecede bir gece etüvde bekletildikten sonra Ventana Discovery cihazına yüklenerek deparafinizasyon ve preparasyon aşamaları gerçekleştirildi. Ardından blokan ve

primer antikor ve devamında streptavidin biotin peroksidasyon yöntemiyle DAB ile renklendirme yapıldı. Bu işlem sonrasında hemotoksidan zemin boyası yapıp şeffaflaştırılan lamalar entellan ile kapatılıp ışık mikroskobunda gözlem yapılmıştır. İncelenen hücrelerin oranları % olarak kaydedilmiştir.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin analizi SPSS istatistik programının 24.0 versiyonu kullanılarak istatistik açıdan gerçekleştirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde verildikten sonra nonparametrik Mann-Whitney U (iki grup karşılaştırmak için); Kruskal Wallis (ikiden fazla gruplar arası) testleri ile yapıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılması Ki-kare testi ile gerçekleştirildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.

3.8. Araştırmanın Akış Şeması



3.9. Etik Kurul Onayı

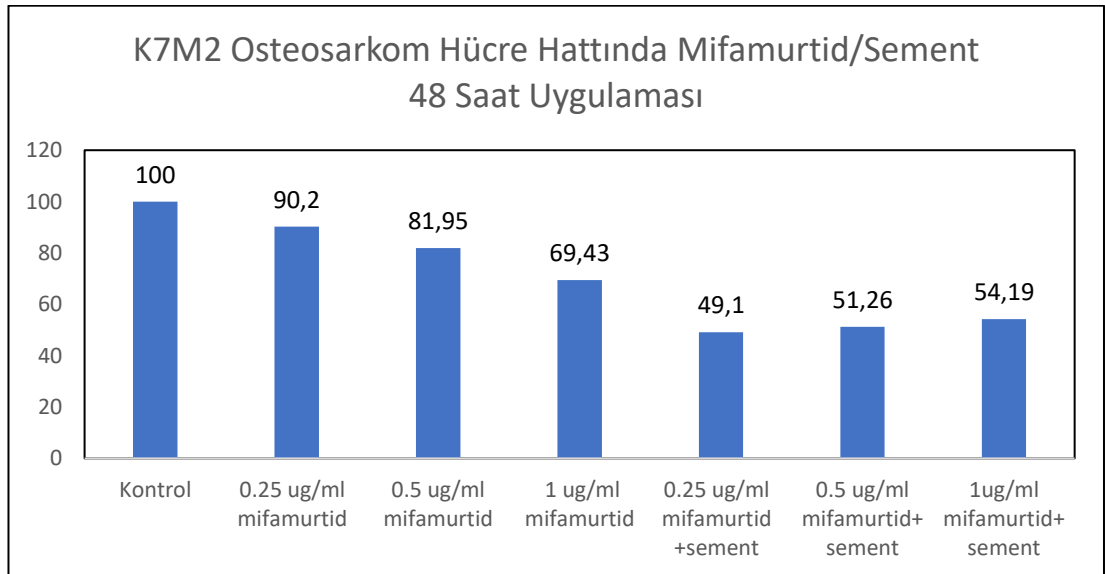
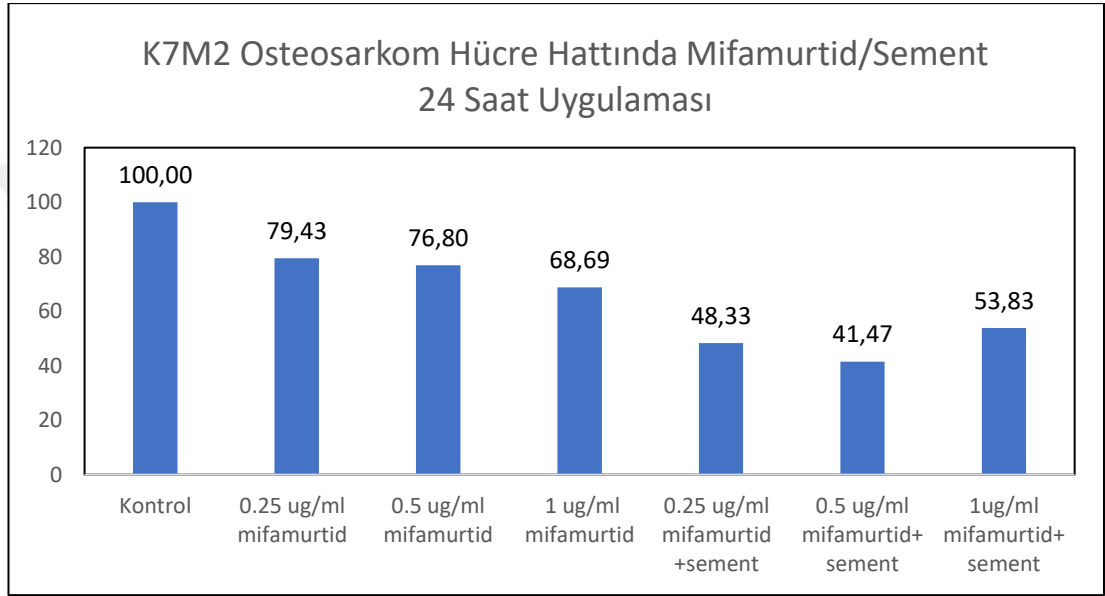
Tüm çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Hayvan Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 10/2018 protokol no'lu 11/03/2018 sayılı 06 Şubat 2018 tarihli etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

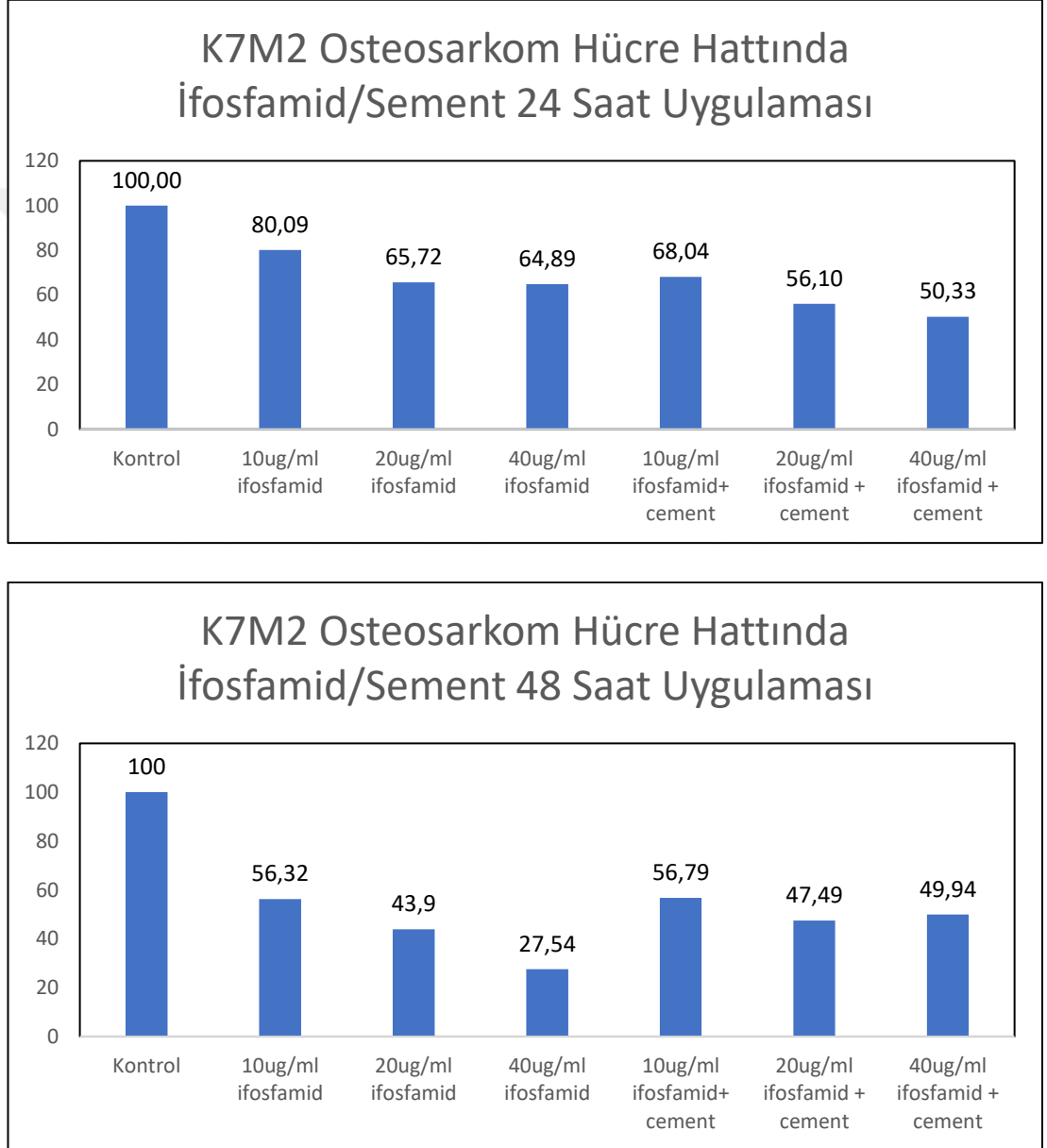
4.1. WST-1 ile in vitro Proliferasyon Bulguları

In vitro olarak K7M2 osteosarkom hücrelerine 24 ve 48 saatlik mifamurtid emdirilmiş sement uygulandığında tek başına mifamurtid uygulanmasına kıyasla sement içine emdirilerek uygulandığında daha fazla sitotoksik etki gösterdi. Buna göre 0,5 ug/ml mifamurtid ve sementin 24 saatlik uygulanması sonucu %41,7 canlılık tespit edildi (Şekil 2).



Şekil 2. In vitro mifamurtid ve sementin 24 ve 48 saatlik uygulamasının K7M2 hücrelerinin canlılığına etkisi

In vitro olarak K7M2 osteosarkom hücrelerine 24 ve 48 saatlik ifosfamid emdirilmiş sement uygulandığında tek başına ifosfamid uygulanmasına kıyasla daha fazla sitotoksik etki gösterdi. Buna göre 20 ug/ml ifosfamid ve sementin 48 saatlik uygulanması sonucu %47,49 canlılık tespit edildi (Şekil 3).

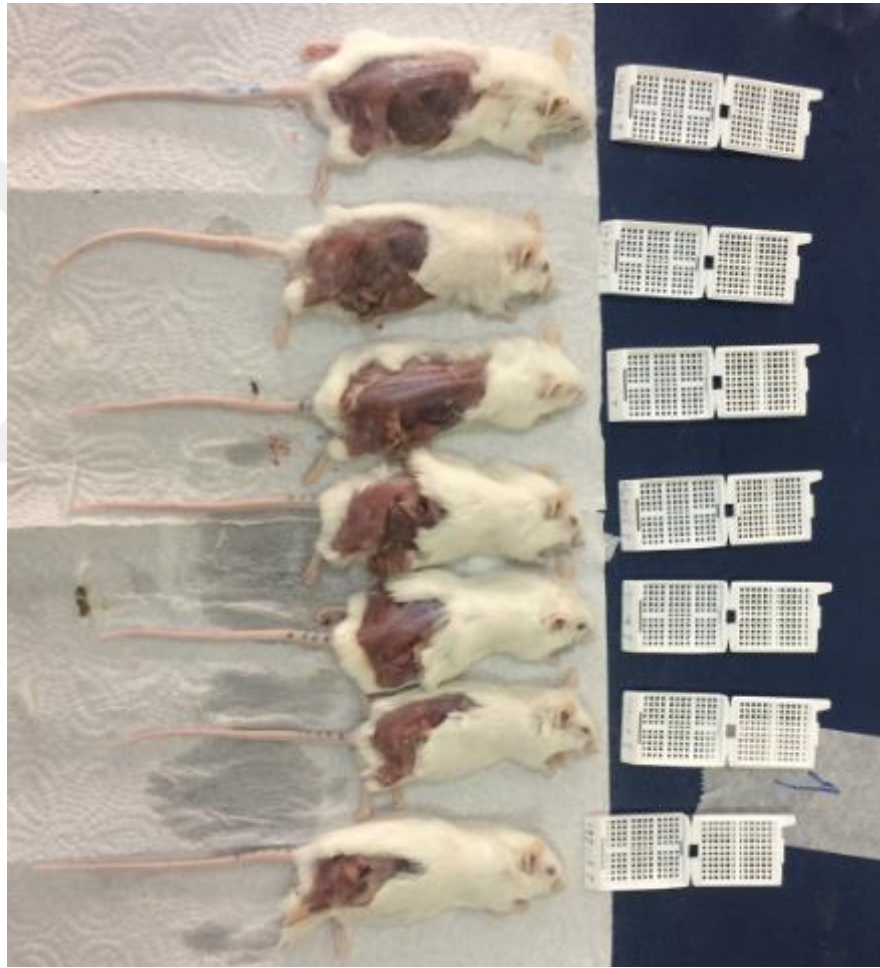


Şekil 3. In vitro ifosfamid ve sementin 24 ve 48 saatlik uygulamasının K7M2 hücrelerinin canlılığına etkisi

4.2. Histopatoloji İmmünohistokimya Bulguları

K7M2 osteosarkom hücrelerinin subkutan enjekte edildiği Balb/c farelerde tümör oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4). Ancak hücrelerin enjekte edildiği alana sement, ifosfamid ve/ veya mifamurtid yerleştirilerek inflamatuvar ve immün yanıt değerlendirilmiştir.

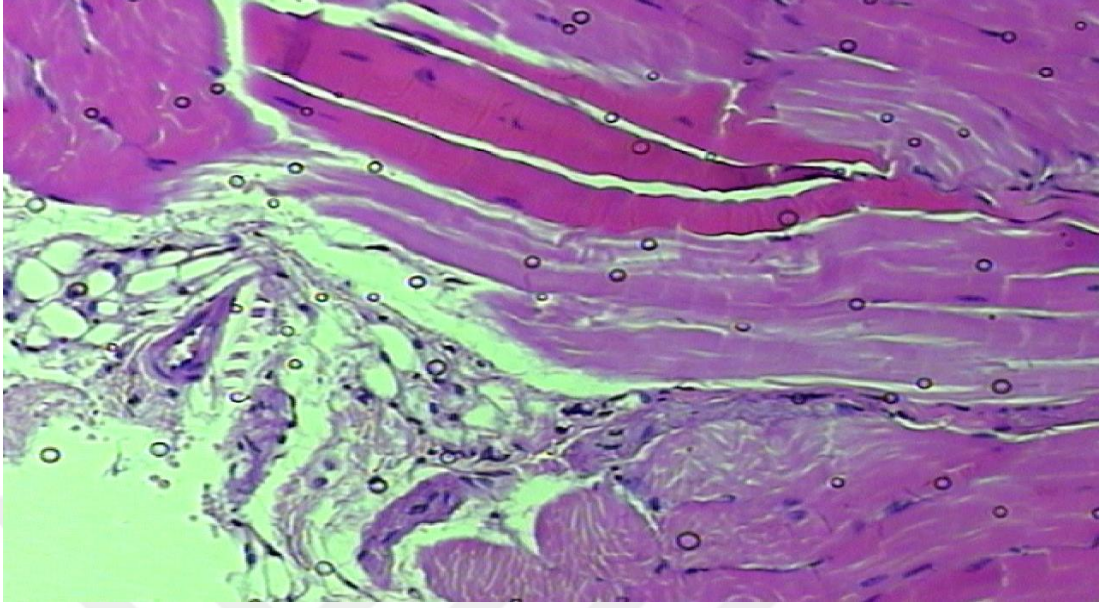
Atimik nude farelerde ise, K7M2 enjekte edilen bölgede tümör oluşumu gözlenmiştir. Tümör rezeksiyonu ardından yukarıda belirtilen gruplar oluşturularak, sakrifikasyon ardından histopatolojik ve immünokimyasal analizler yapılmıştır.



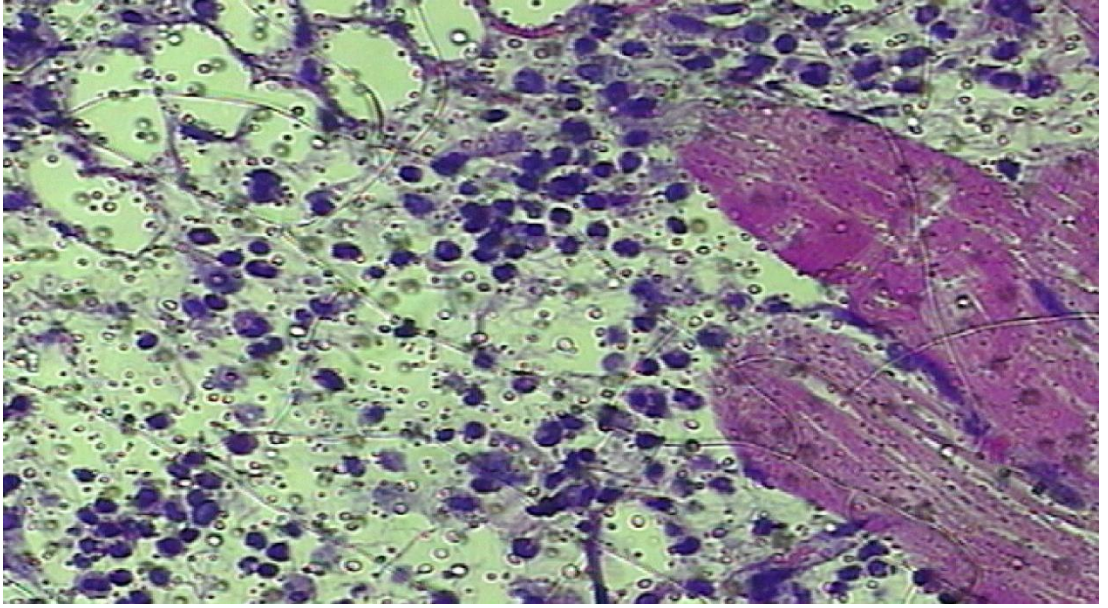
Şekil 4. Balb/c farelerin kontrol grubunda osteosarkom hücrelerinin enjekte edildiği ve tümör oluşumunun gözlenmediği alanlar

4.2.1. Balb/c osteosarkom fare modeli histopatoloji bulguları

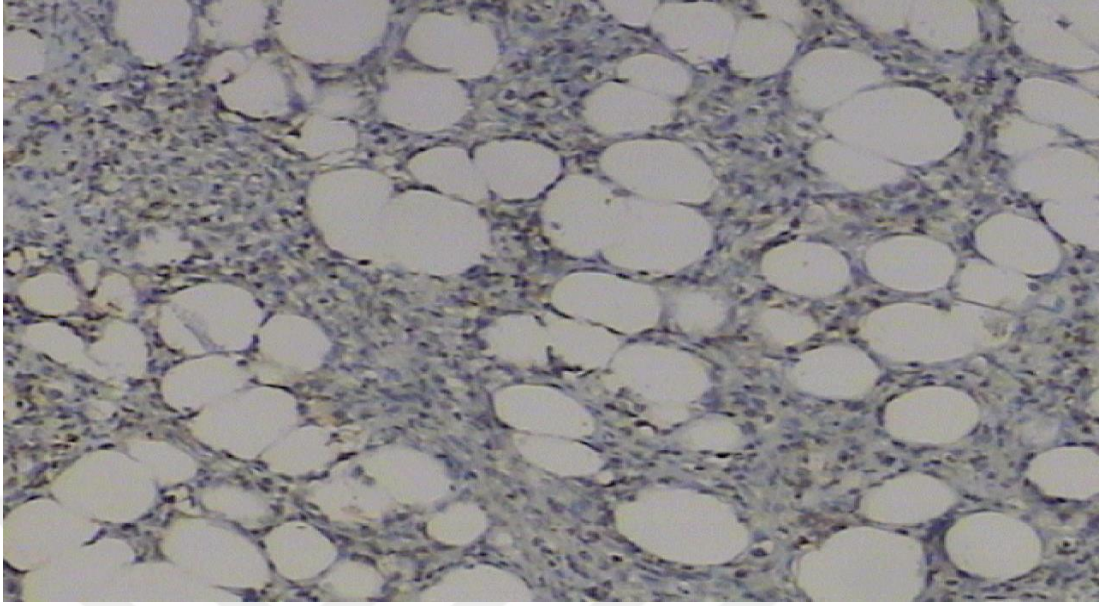
Sement+SF grubunda ve SF+Mifamurtid grubunda kontrol grubuna göre; inflamasyon, nötrofil ve histiyosit sayısı daha yüksek olarak tespit edilmiştir.



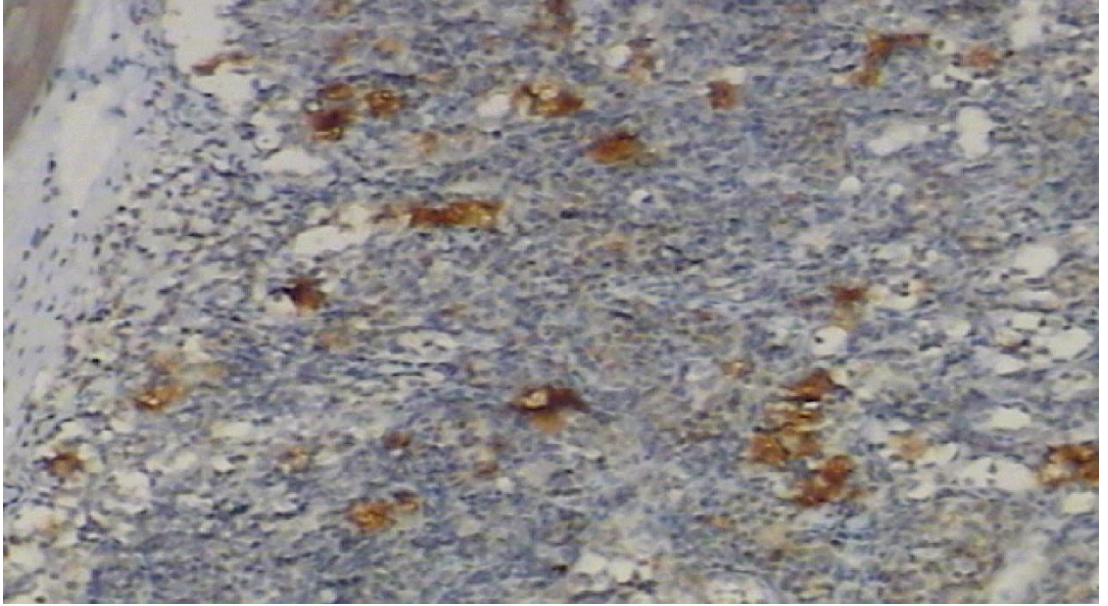
Şekil 5-a. 146- (Kontrol Grubu) inflamatuvar yanıt yok



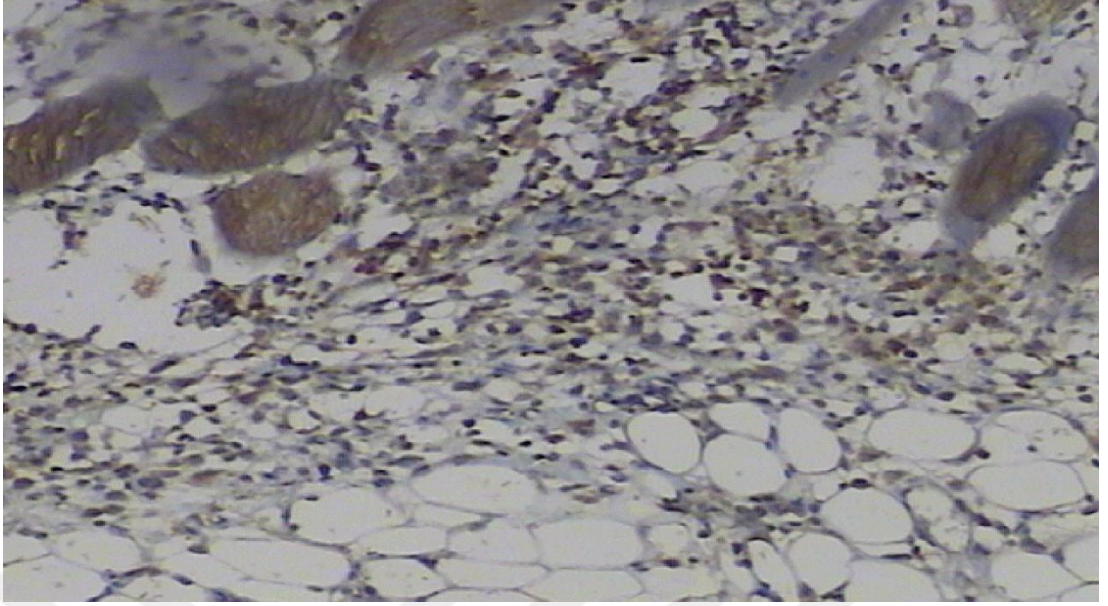
Şekil 5-b. 147-(Kontrol Grubu) İnflamatuvar yanıt düşük



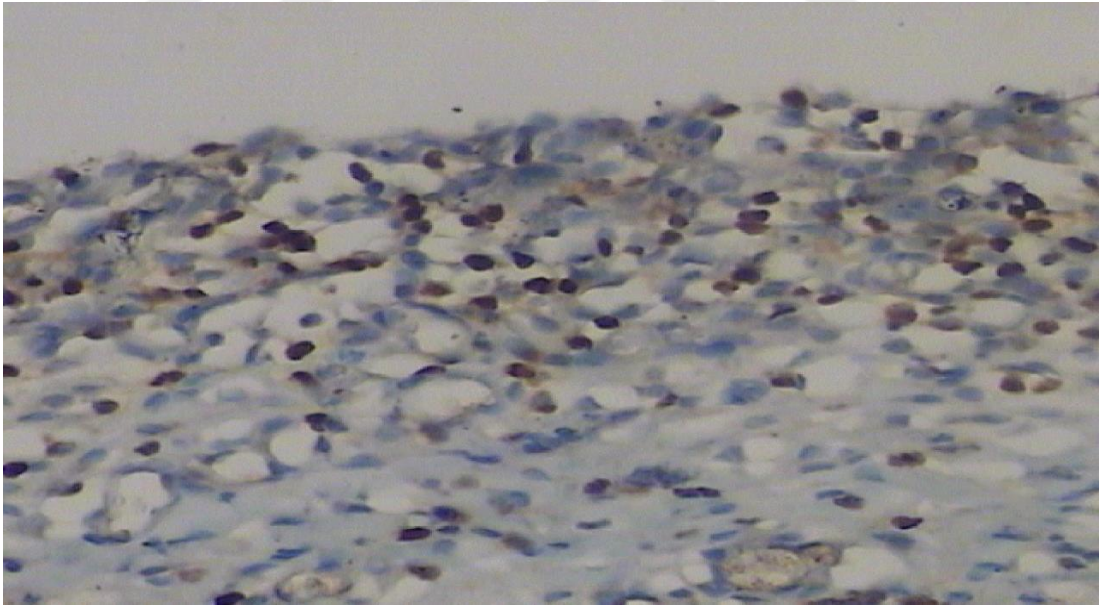
Şekil 5-c.152-CD64 (Kontrol Grubu) Seyrek Histiositler



Şekil 5-d.147-NCR1 (kontrol Grubu) Orta düzeyde Natural killer cell reseptör ekspresyonu



Şekil 5-e. 148-FAPA (kontrol Grubu) Artmış fibroblast activating protein ekspresyonu



160-CD8 (Sement+Mepact Grubu) Sitotoksik T lenfositlerin yakından görünümü

Kontrol grubunda inflamasyon %42,9 ‘unda düşük (n:3), %28,6 ‘sında orta (n:2) ve %28,6’sında yüksek (n:2) düzeydedir. Lenfosit düzeyleri %71,4 ‘ünde düşük (n:5), %28,6 ‘sında orta (n:2) ‘dır. Nötrofiller %71,4’ünde düşük (n:5), %28,6 ‘sında (n:2) düşük düzeydedir. Histiosit açısından tüm tümörlerde düşük düzeydedir (n:7, %100). Dev hücre düzeyleri %71,4 ‘ünde düşük (n:5), %28,6 ‘sında orta (n:2) ‘dır.

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda CD4 pozitif lenfosit düzeyi, CD8 pozitif lenfosit düzeyi, CD20 pozitif B lenfositler tümünde düşüktür (n:7, %100). CD64 pozitif makrofaj hücreler %14,3 ‘ünde yok (n:1), %71,4 ‘ünde düşük (n:5) ve %14,3 ‘ünde orta (n:1) düzeydedir. NCR1 pozitif NK hücreler %57,1’inde (n:4) bulunmamakta, %42,9 ‘unda düşük düzeydedir (n:3). FAPA pozitif hücreler %28,6’sında bulunmamakta (n:2), %28,6’sında düşük (n:2) ve %42,9 ‘unda orta düzeydedir (n:3).

İnflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre, CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonlarının Balb/c farelerde kontrol gruplarda immünohistokimyasal değerlendirme bulguları Tablo 5 ‘de yer almaktadır.

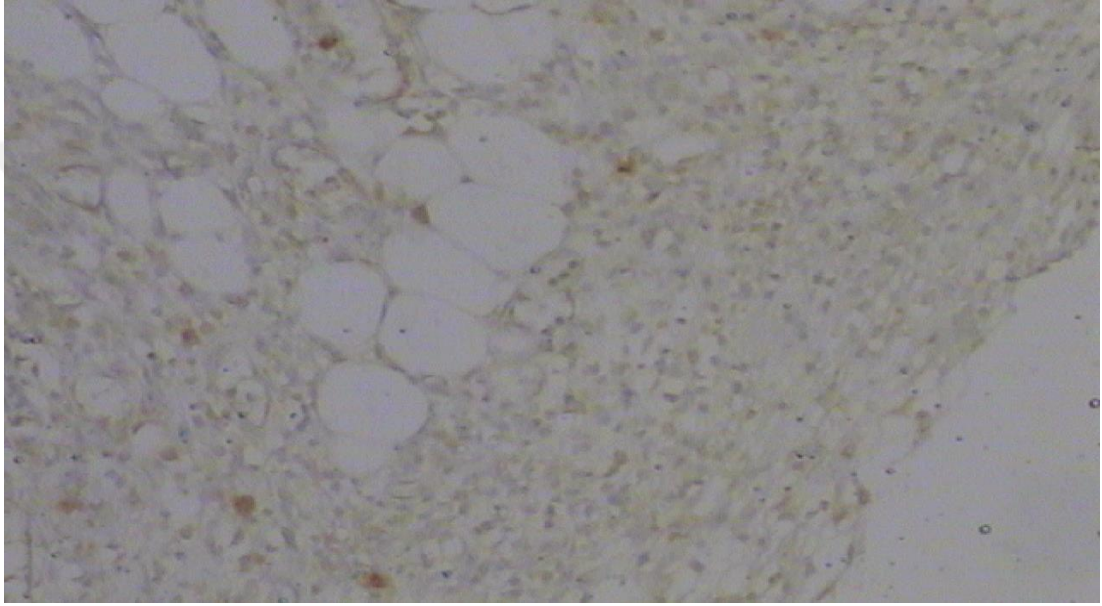
Tablo 5. Balb/c osteosarkom fare modeli kontrol grubunda inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları

İNFLAMASYON	LENFOSİT	NÖTROFİL	HİSTİOSİT	DEV HÜCRE	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
1	1	0	1	0	↓	↑	↓	1	0	1
1	1	0	1	1	↓	↑	↓	1	1	1
2	1	0	1	1	↓	↑	↓	2	1	2
2	1	0	1	0	↓	↓	↓	1	0	0
1	1	0	1	0	↓	↑	↓	0	0	0
3	2	1	1	0	↓	↑	↓	1	1	2
3	2	1	1	0	↓	↑	↓	1	0	2

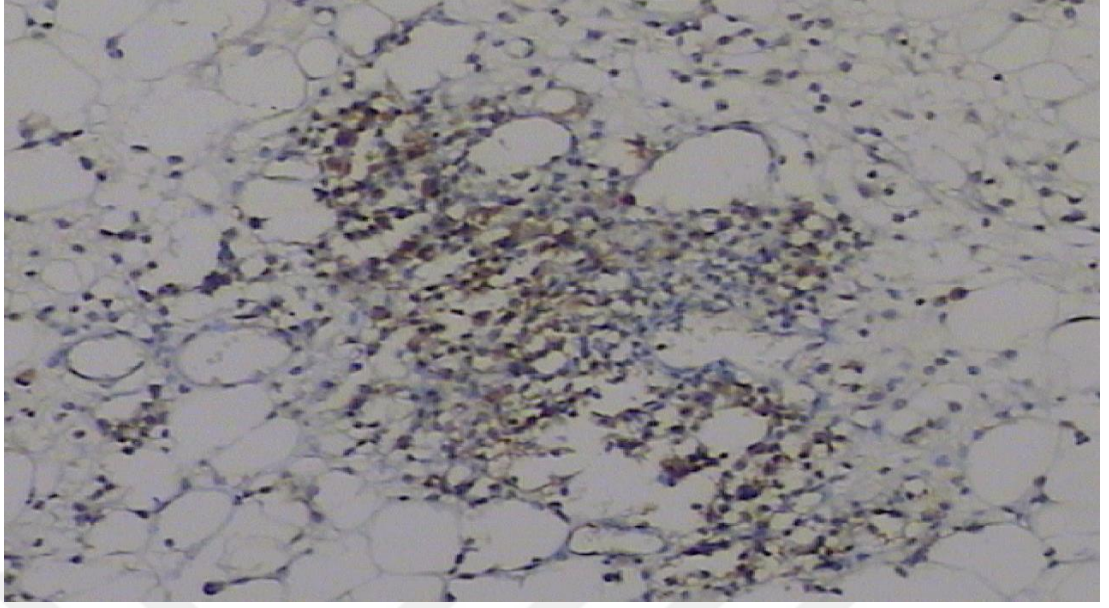
(0: ekspresyon yok 1: ekspresyon var 2: yüksek düzeyde ekspresyon var; yukarı ok: yüksek ekspresyon var, aşağı ok: düşük ekspresyon var)

4.2.2. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve serum fizyolojik grubu immünohistokimya bulguları

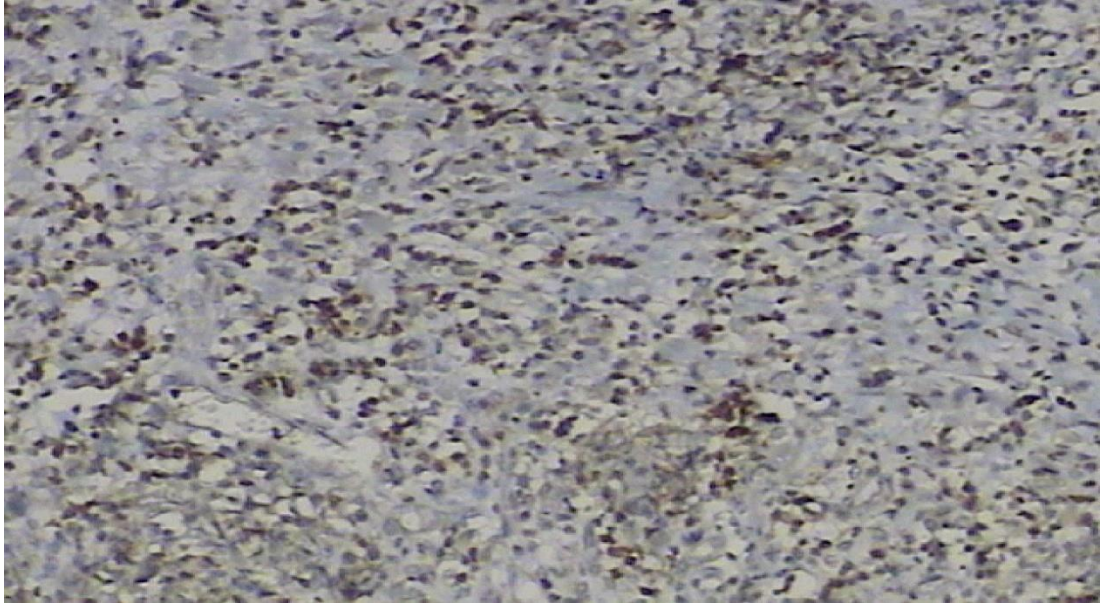
Sementin SF ile hazırlanarak deney hayvanlarına implantasyonu sonrasında çıkarılan dokularda inflamasyon ve nötrofil seviyelerinde artış görülmüştür. CD8 antikor seviyesi diğer antikorlara göre daha belirgin olarak göze çarpmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6.a. Balb/c osteosarkom fare modelinde sement ve serum fizyolojik kombinasyon immünohistokimya görüntüleri 154-CD20 (Sement+ SF Grubu) Az sayıda CD 20 eksprese eden B lenfositler



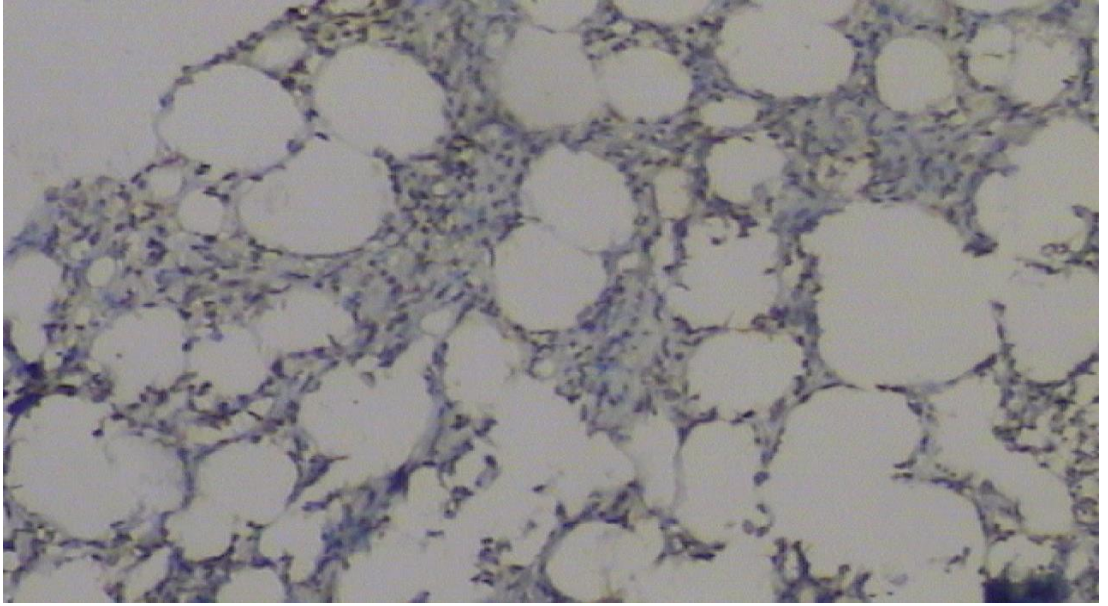
Şekil 6.b.158-CD4 (Sement+ SF Grubu) Artmış T helper hücreler



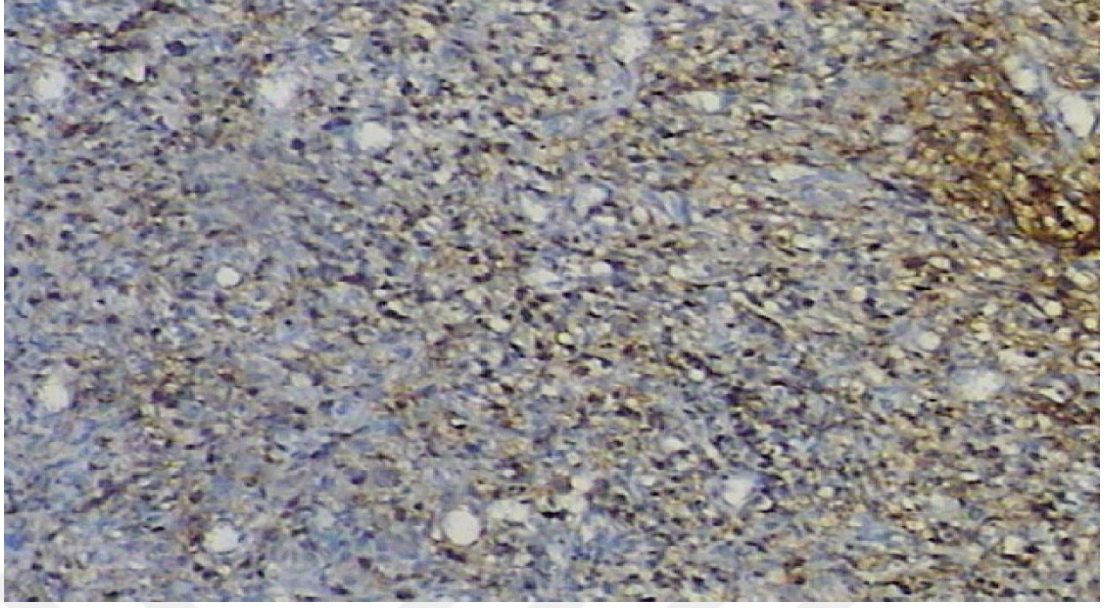
Şekil 6.c.156-CD64 (Sement+ SFGrubu) orta düzeyde histiositler



Şekil 6.d.156-NCR1 (Sement+ SF Grubu) düşük düzeyde Natural killer cell reseptör ekspresyonu



Şekil 6.e.154-CD4 (Sement+ Sf Grubu) Yağ dokusu içinde fibroblastlar ve inflamatuvar hücreler arasında kavrerenkli boyanmış T helper lenfositler



Şekil 6.f.153-CD8 (Sement+ SF Grubu) Çok sayıda sitotoksik T lenfositler

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda SF ile hazırlanan sement uygulanan CD4 pozitif lenfosit düzeyi, CD8 pozitif lenfosit düzeyi, CD20 pozitif B lenfositler tümünde düşüktür (n:7, %100). CD64 pozitif makrofaj hücreler %14,3 'ünde yok (n:1), %71,4 'ünde düşük (n:5) ve %14,3 'ünde orta (n:1) düzeydedir. NCR1 pozitif NK hücreler %57,1'inde (n:4) bulunmamakta, %42,9 'unda düşük düzeydedir (n:3). FAPA pozitif hücreler %28,6'sında bulunmamakta (n:2), %28,6'sında düşük (n:2) ve %42,9 'unda orta düzeydedir (n:3).

İnflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre, CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonlarının Balb/c farelerde sement ve serum fizyolojik verilen grupta immünohistokimyasal değerlendirme bulguları Tablo 6 'da yer almaktadır.

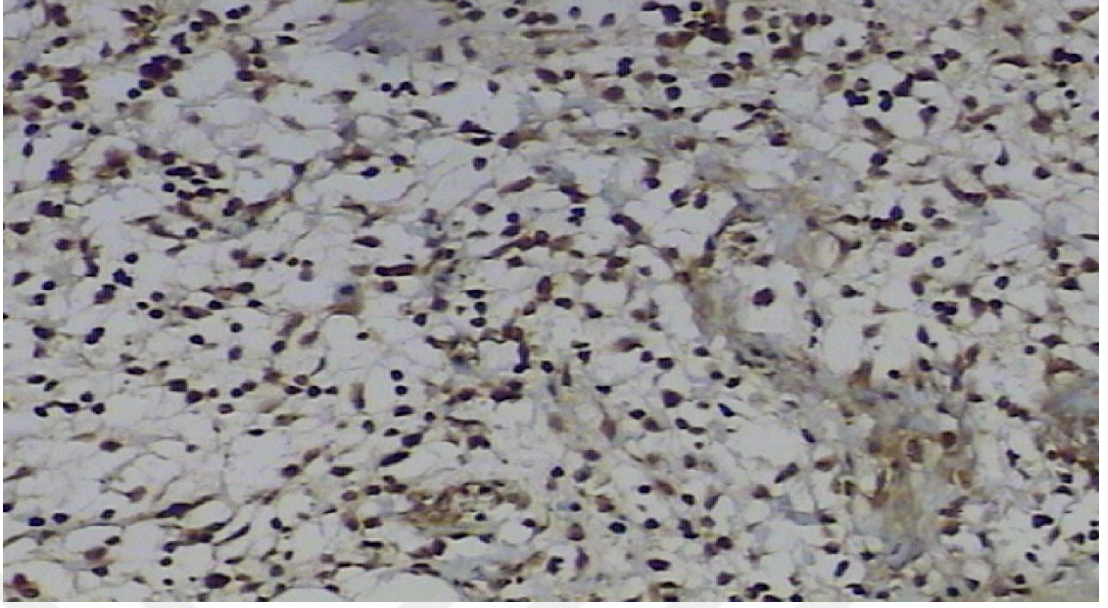
Tablo 6. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve serum fizyolojik verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları

İNFLAMASYON	LENFOSİT	NÖTROFİL	HİSTOOSİT	DEV HÜCRE	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
3	↓	3	1	0	↓	↑	↓	1	0	1
3	↓	3	1	0	↓	↑	↓	1	1	1
3	↓	3	1	0	↓	↑↑	↓	1	0	1
3	↓	3	1	0	↑	↑↑	↓	2	1	2
2	↓	1	0	0	↓	↑	↓	1	1	1
3	↓	3	0	0	↓	↑↑	↓	1	0	1
3	↓	3	0	0	↓	↑↑	↓	1	1	1

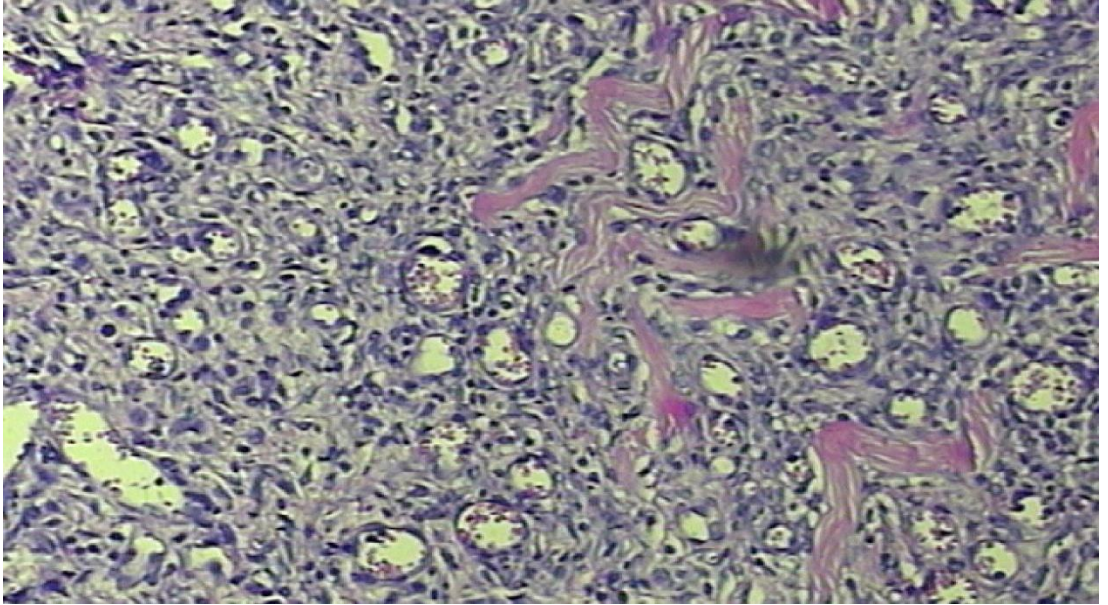
(0: ekspresyon yok 1: ekspresyon var 2: yüksek düzeyde ekspresyon var; yukarı ok: yüksek ekspresyon var, aşağı ok: düşük ekspresyon var)

4.2.3. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve mifamurtid grubu immünohistokimya bulguları

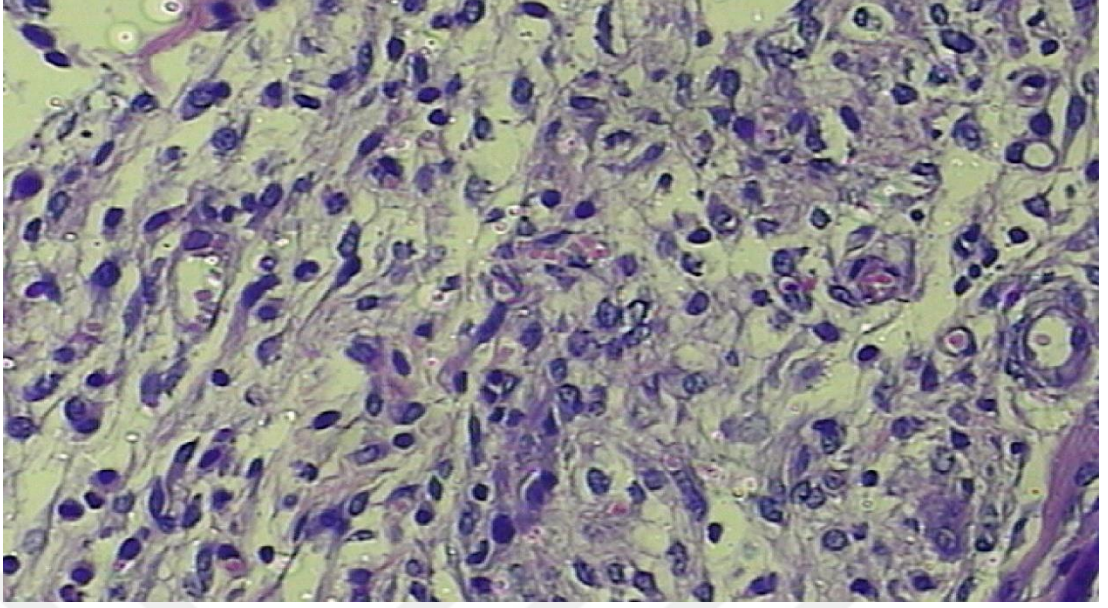
Sementin mifamurtid ile hazırlanarak deney hayvanlarına implantasyonu sonrasında çıkarılan dokularda CD64 ve FAPA antikor seviyeleri belirgin olarak göze çarpmaktadır. Sementin dokularda inflamasyona ve histiosit seviyesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 7).



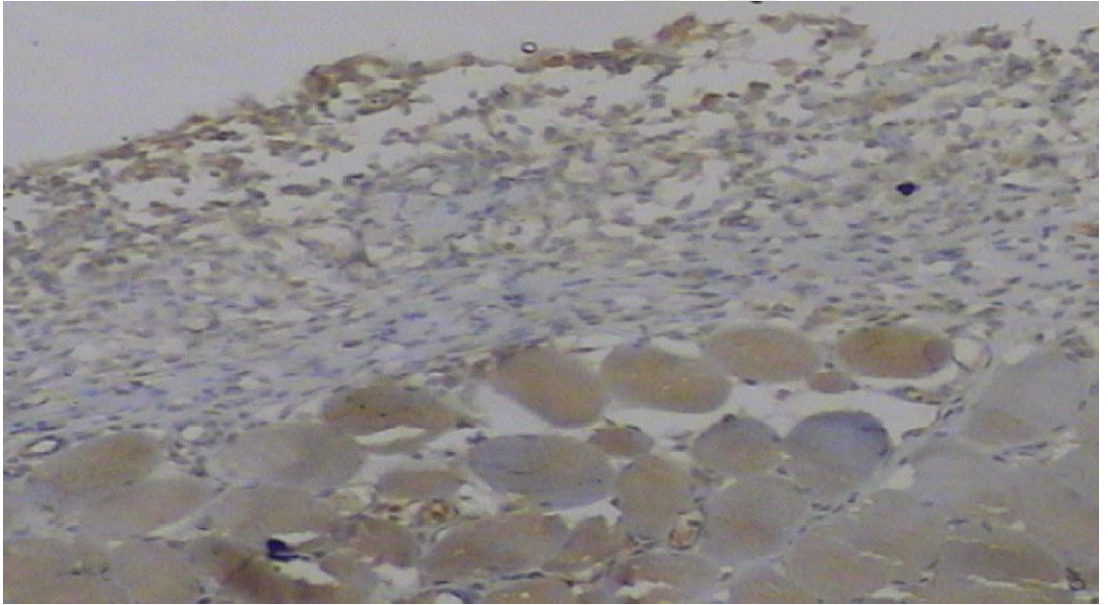
Şekil 7.a Balb/c osteosarkom fare modelinde mifamurtid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası immünohistokimya görüntüleri 161-CD64 (Sement+Mifamurtid Grubu) Çok sayıda histiositler



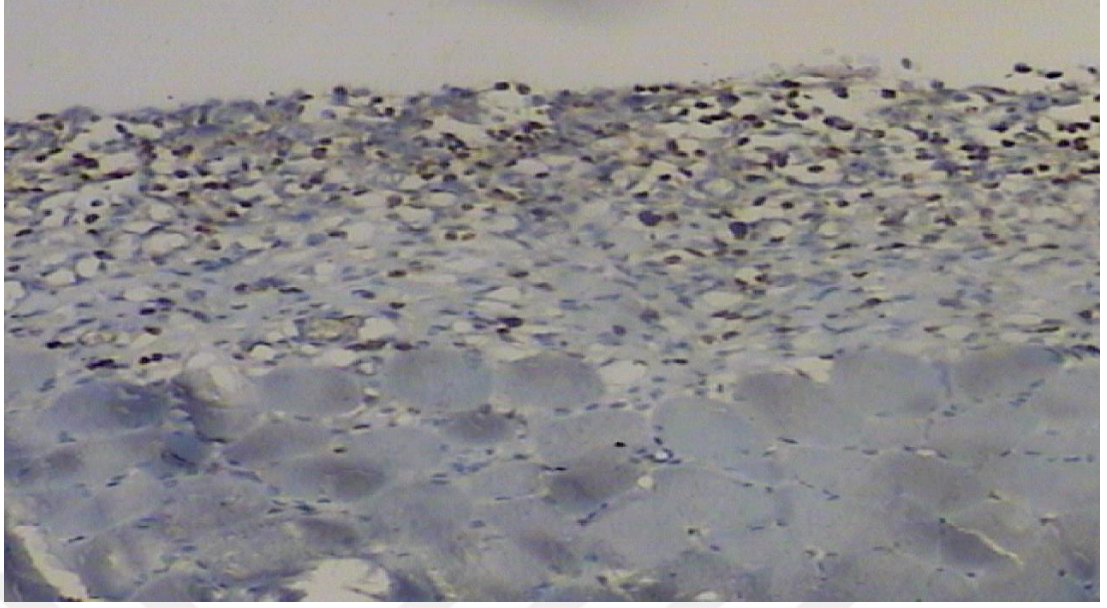
Şekil 7.b.161- (Sement+Mifamurtid Grubu) İnflamatuvar yanıt belirgin, monosit ve histiositler daha fazla, anjiogenez var



Şekil 7.c.165- (Sement+Mifamurtid Grubu) İnflamatuvar yanıt belirgin, monosit ve histiositler daha fazla



Şekil 7.d. 160-CD20 (Sement+Mifamurtid Grubu) B lenfosit dikkati çekmedi.



Şekil 7.e.160-CD8 (Sement+Mifamurtid Grubu) Artmış sitotoksik T lenfositler

Mifamurtid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası grubunda inflamasyon %42,9 ‘unda düşük (n:3), %28,6 ‘sında orta (n:2) ve %28,6’sında yüksek (n:2) düzeydedir. Lenfosit düzeyleri tümünde düşük düzeydedir(n:5). Nötrofiller %57,1’inde düşük (n:4), %28,6 ‘sında (n:2) düşük ve %14,3 ‘ünde yüksek (n:1) düzeydedir. Histiosit açısından %42,9 ‘u düşük düzeyde (n:3), %57,1 ‘i orta düzeydedir (n:4). Dev hücre düzeyleri ise hiçbir hayvanda bulunmamıştır (n:7, %100).

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda mifamurtid ile hazırlanmış sement uygulanan grupta CD4 pozitif lenfosit düzeyi %85,7 ‘sinde düşük (n:6) olup %14,3 ‘ünde hiç bulunmamıştır (n:1). CD8 pozitif lenfosit düzeyi %85,7’sinde orta (n:6), %14,3 ‘ünde yüksek düzeydedir (n:1). CD20 pozitif B lenfositler %85,7’sinde düşük (n:6), %14,3 ‘ünde orta düzeydedir (n:1). CD64 pozitif makrofaj hücreler %42,9 ‘unda orta (n:3), %57,1 ‘inde yüksek (n:4) düzeydedir. NCR1 pozitif NK hücreler %57,1’inde (n:4) düşük düzeyde, %42,9 ‘unda hiç bulunmamaktadır (n:3). FAPA pozitif hücreler %57,1’inde (n:4) yüksek düzeyde, %42,9 ‘unda orta düzeydedir (n:3).

İnflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre, CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonlarının Balb/c farelerde sement ve mifamurtid verilen grupta immünohistokimyasal değerlendirme bulguları Tablo 7 'de yer almaktadır.

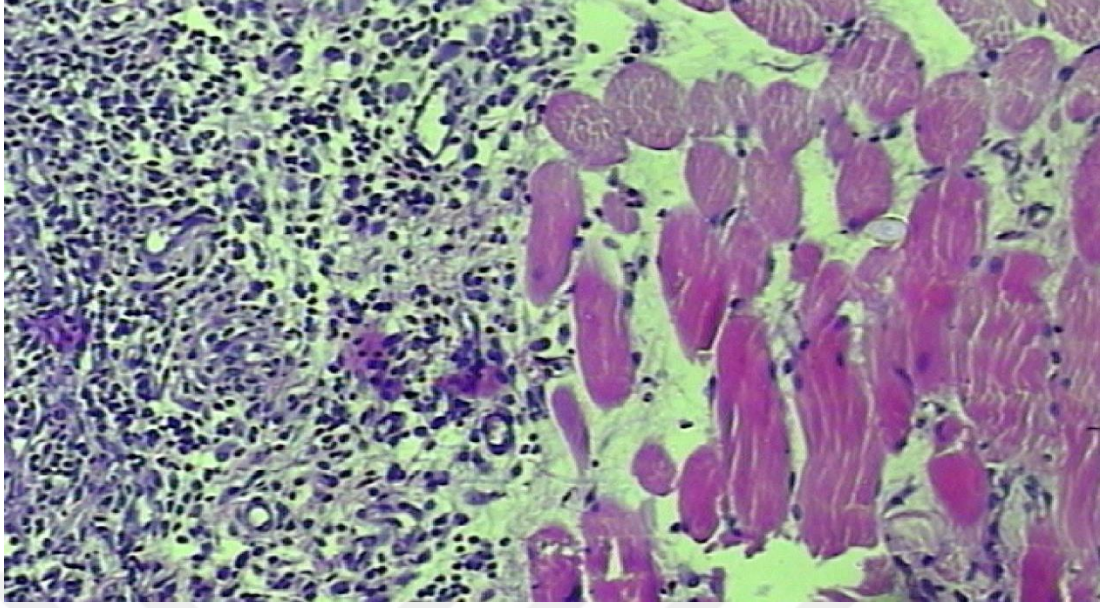
Tablo 7. Balb/c osteosarkom fare modeli mifamurtid ve sement verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları

İNFLAMASYON	LENFOSİT	NÖTROFİL	HİSTOOSİT	DEV HÜCRE	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
2	↓	1	2	0	1	2	2	2	1	2
3	↓	2	2	0	1	3	1	3	1	3
2	↓	1	1	0	1	2	1	3	1	2
1	↓	1	1	0	1	2	1	3	1	2
1	↓	3	1	0	0	2	1	2	0	3
2	↓	2	2	0	1	2	1	3	0	3
2	↓	1	2	0	1	2	1	2	0	3

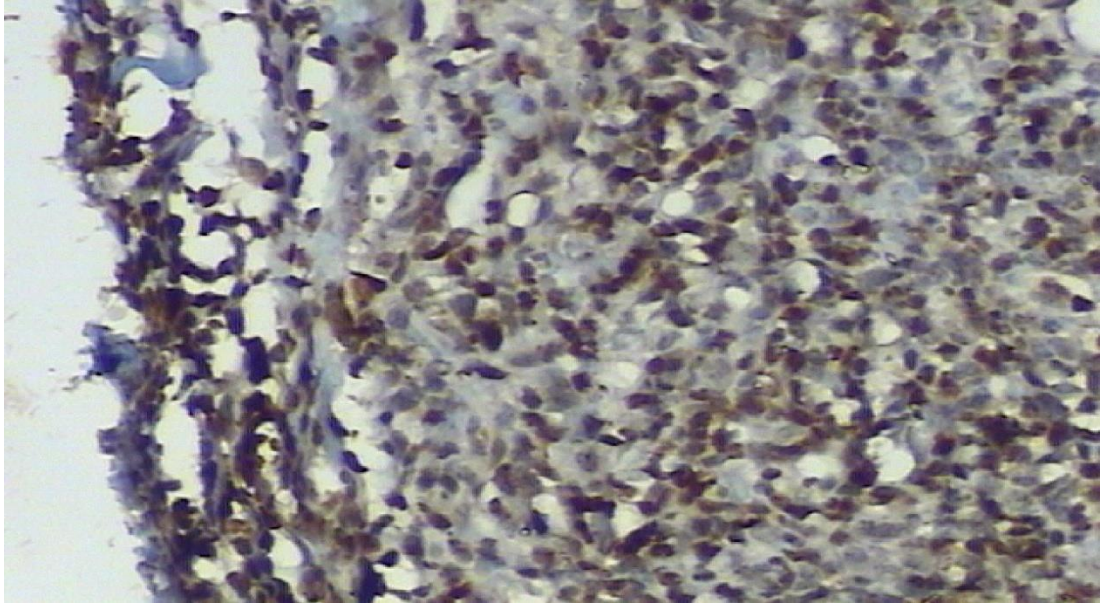
(0: ekspresyon yok 1: ekspresyon var 2: yüksek düzeyde ekspresyon var)

4.2.4. Balb/c osteosarkom fare modeli sement ve ifosfamid grubu immünohistokimya bulguları

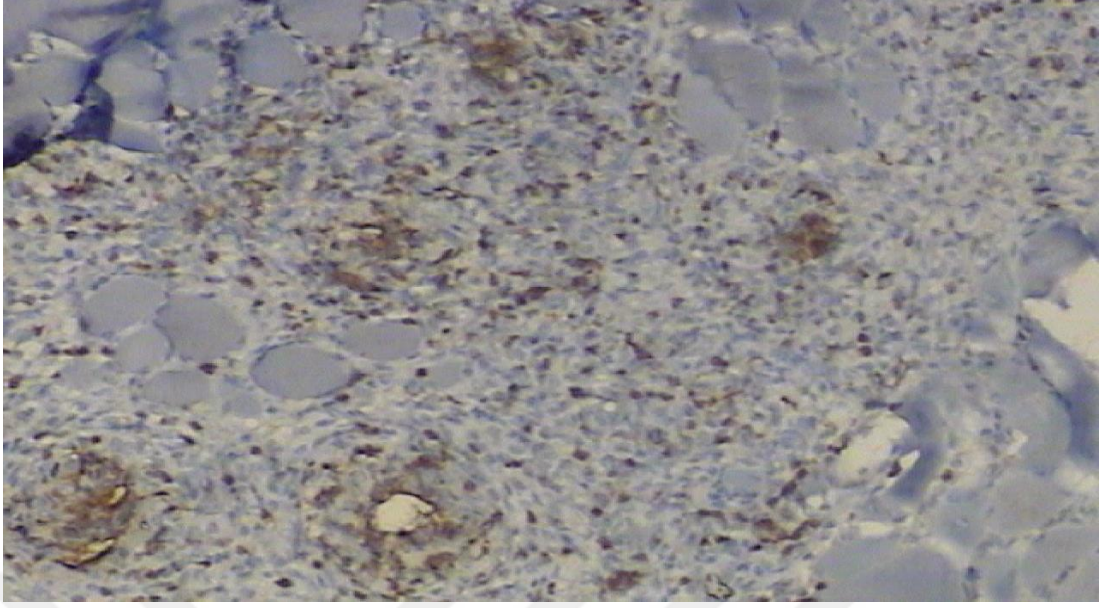
Sementin ifosfamid ile hazırlanarak deney hayvanlarına implantasyonu sonrasında çıkarılan dokularda lenfosit ve nötrofil seviyeleri belirgindir. CD8, CD64 ve FAPA antikor seviyeleri de diğer antikor seviyelerine göre daha belirgindir. (Şekil 8).



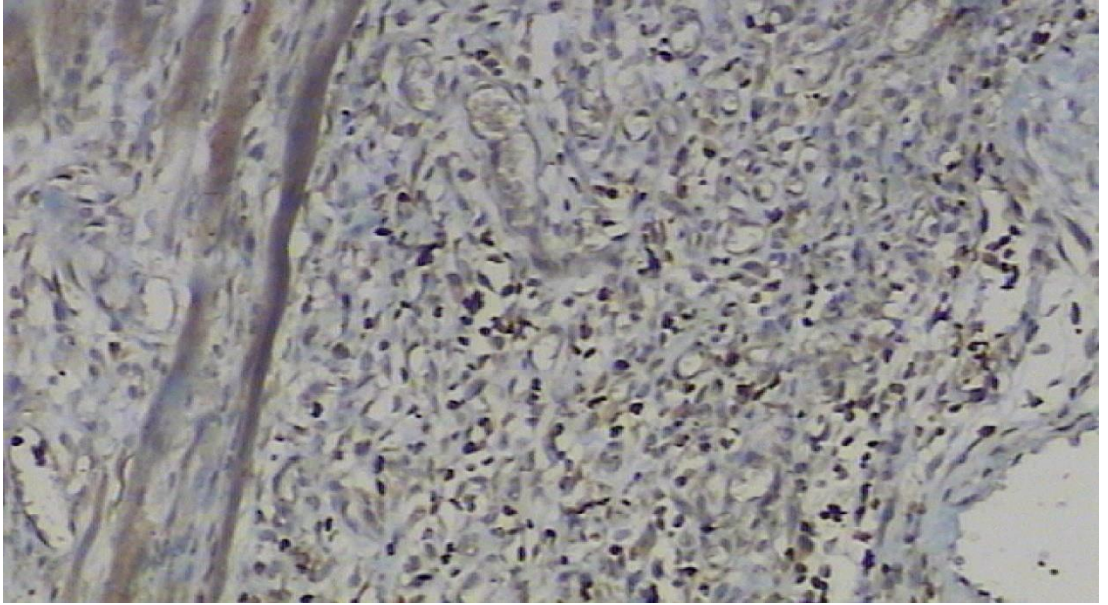
Şekil 8. a. 171-(Sement+İfosfamid Grubu) Yoğun inflammatuar infiltrasyon



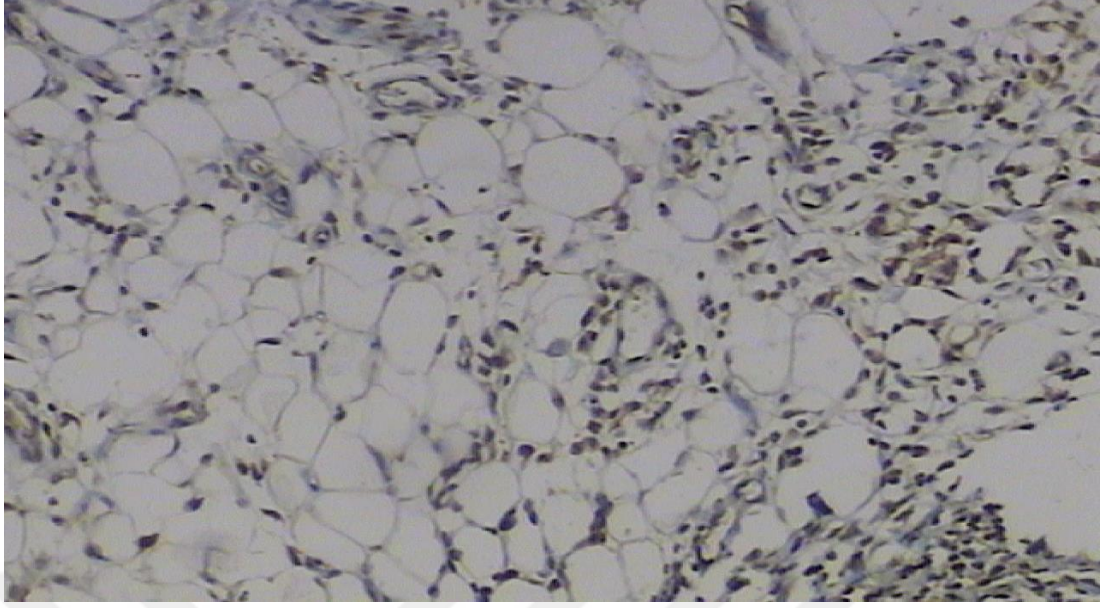
Şekil 8. b. 172-CD64 (sement+ifosfamid grubu) Artmış histiositler



Şekil 8. c. 170-CD8 (siment+ifosfamid grubu) Orta düzeyde Sitotoksik T lenfositler



Şekil 8. d. 169-FAPA(siment+ifosfamid grubu) Orta düzeyde fibroblast activating protein ekspresyonu



Şekil 8. e. 167-CD64 (sement+ifosfamid grubu) Düşük orta düzeyde histiositler

Şekil 8. Balb/c osteosarkom fare modelinde ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası immünohistokimya görüntüleri

Ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası grubunda inflamasyon %14,3 'ünde düşük (n:1), %85,7 'sinde orta (n:6) düzeydedir. Lenfosit düzeyleri %14,3 'ünde düşük (n:1), %85,7 'sinde orta (n:6) düzeydedir Nötrofiller %14,3'ünde bulunmamakta (n:1), 71,4 'ünde (n:5) düşük ve %14,3 'ünde orta (n:1) düzeydedir. Histiosit ve dev hücreler hiçbir hayvanda gözlenmemiştir (n:7, %100).

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulanan grupta CD4 pozitif lenfosit düzeyi %85,7 'sinde düşük (n:6) olup %14,3 'ünde orta düzeydedir (n:1). CD8 pozitif lenfosit düzeyi %57,1'inde orta (n:4), %28,6'sında düşük ve %14,3 'ünde yüksek (n:1) düzeydedir. CD20 pozitif B lenfositler %85,7'sinde düşük düzeyde (n:6), %14,3 'ünde bulunmamaktadır (n:1). CD64 pozitif makrofaj hücreler %57,1'inde orta (n:4), %14,3 'ünde yüksek (n:1) ve %28,6 'sında düşük (n:2) düzeydedir. NCR1 pozitif NK hücreler %85,7'sinde (n:6) bulunmamakta, %14,3 'ünde düşük düzeydedir (n:1). FAPA pozitif hücreler %85,7'sinde (n:6) düşük, %14,3 'ünde orta düzeydedir (n:1).

İnflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonlarının Balb/c farelerde ifosfamid ile

hazırlanan sement uygulanan grupta immünohistokimyasal değerlendirme bulguları Tablo 8 'de yer almaktadır.

Tablo 8. Balb/c osteosarkom fare modeli ifosfamid ve sement verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları

İNFLAMASYON	LENFOSİT	NÖTROFİL	HİSTİOSİT	DEV HÜCRE	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
2	2	1	0	0	1	2	1	1	0	1
1	2	1	0	0	1	2	1	1	0	1
1	2	1	0	0	1	2	1	2	0	2
1	2	1	0	0	2	1	1	2	1	1
2	2	2	0	0	1	2	1	2	0	1
1	2	1	0	0	1	3	1	3	0	1
0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	1

(0: ekspresyon yok 1: ekspresyon var 2: yüksek düzeyde ekspresyon var)

4.2.5. Balb/c osteosarkom fare modeli mifamurtid, ifosfamid ve sement grubu immünohistokimya bulguları

Sementin ifosfamid+mifamurtid ile hazırlanarak deney hayvanlarına implantasyonu sonrasında çıkarılan dokularda inflamasyon ve nötrofil seviyeleri yüksektir (Şekil 9).

Şekil 9. Balb/c osteosarkom fare modelinde mifamurtid ve ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası immünohistokimya görüntüleri

Mifamurtid ve ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulaması sonrası grubunda inflamasyon %33,3 'ünde düşük (n:3), %33,3 'ünde orta (n:3) ve %33,3 'ünde yüksek (n:3) düzeydedir. Lenfosit düzeyleri %11,1 'inde orta (n:1), %88,9 'unda düşük (n:7) düzeydedir. Nötrofiller %22,2'sinde bulunmamakta (n:2), %44,4 'ünde (n:4) düşük ve %33,3 'ünde orta (n:3) düzeydedir. Histiosit hücreleri %66,7 'sinde düşük (n:6) ve %33,3 'ünde orta (n:3) düzeydedir. Dev hücreler %88,9 'unda bulunmamakta (n:8) ve %11,1 'inde düşük düzeydedir (n:1).

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda mifamurtid ve ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulanan grupta CD4 pozitif lenfosit bulunmamaktadır (n:9, %100). CD8 pozitif lenfosit düzeyi %77,8'inde orta (n:7), %22'2 sinde düşük düzeydedir. CD20 pozitif B lenfositler %77,8'inde düşük (n:7), %22'2 sinde orta düzeydedir (n:2). CD64 pozitif makrofaj hücreler %22,2'sinde düşük (n:2), %33,3 'ünde orta (n:3) ve %44,4 'ünde (n:4) yüksek düzeydedir. NCR1 pozitif NK hücreler %11,1 'inde (n:1) bulunmamakta, %88,9 'unda düşük düzeydedir (n:8). FAPA pozitif hücreler %33,3'ünde (n:3) düşük, %66,7 'sinde orta düzeydedir (n:6).

İnflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonlarının Balb/c farelerde mifamurtid ve ifosfamid ile hazırlanan sement uygulanan grupta immünohistokimyasal değerlendirme bulguları Tablo 9'da yer almaktadır.

Tablo 9. Balb/c osteosarkom fare modeli mifamurtid ve ifosfamid ile hazırlanan sement verilen grupta inflamasyon, lenfosit, nötrofil, histiosit, dev hücre yüzdeleri ile CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyonları

İNFLAMASYON	LENFOSİT	NÖTROFİL	HİSTİOSİT	DEV HÜCRE	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
3	1	2	1	0	1	2	1	2	1	1
2	1	1	2	0	1	2	1	3	1	2
1	1	1	1	0	1	2	1	2	1	2
3	1	2	2	0	1	2	2	3	1	2
3	1	2	2	0	1	2	2	3	1	2
2	1	1	1	0	1	2	1	2	1	2
2	2	1	1	0	1	2	1	3	1	2

(0: ekspresyon yok 1: ekspresyon var 2: yüksek düzeyde ekspresyon var)

Sement+mifamurtid grubu, sement+ifosfamid grubuna göre daha fazla (2-3 kat) oranda hesaplanmıştır. İnflamasyon,nötrofil,histiosit, CD8,CD64,NCR1 ve FAPA düzeylerine neden olmuştur. Mifamurtidin uyardığı immün yanıtı sement bozmamıştır. Hiçbir grupta dev hücre görülmemiştir.

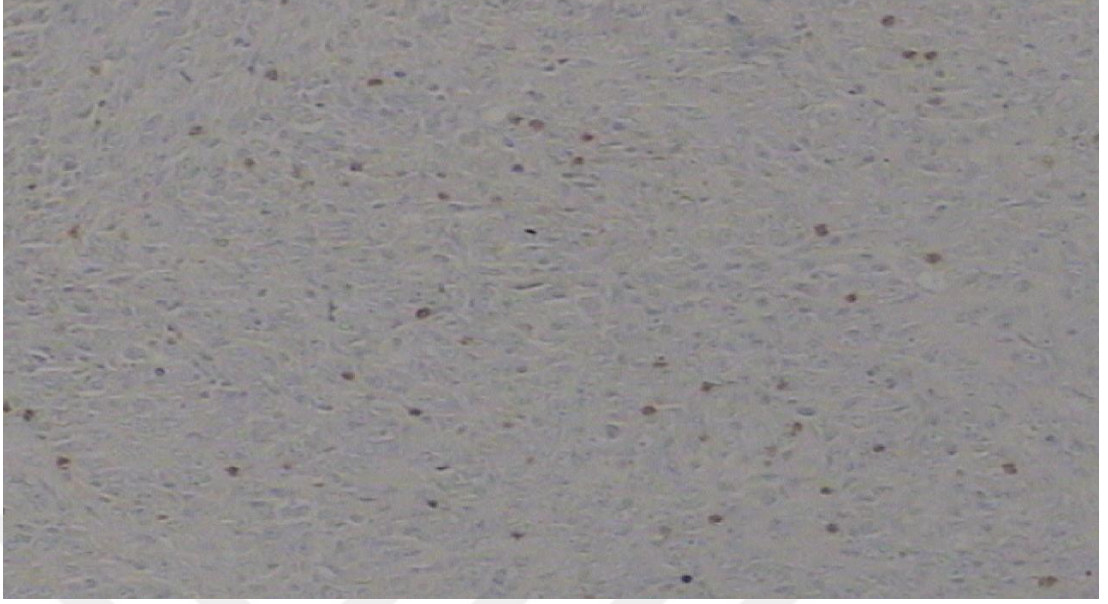
4.2.6. Atimik Nude Fare Kontrol Grubunda İmmünohistokimya Bulguları

Sadece tümör oluşumu sağlanan atimik nude fare kontrol grubunda tümörde CD4 %75'inde düşük düzeyde (n:8, %100), %50 'sinde düşük düzeyde CD8 (n:2), CD20 %50 'sinde düşük düzeyde (n:2), tümünde düşük CD64 (n:4), NCR1 tümünde orta düzeyde (n: 4) ve %75 'inde orta düzeyde FAPA (n:3) görülmüştür (Tablo 10).

Tablo 10. Atimik nude fare kontrol grubunda CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri

CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
2	3	2	1	2	2
1	3	1	1	2	2
1	2	1	1	2	2
1	2	2	1	2	1

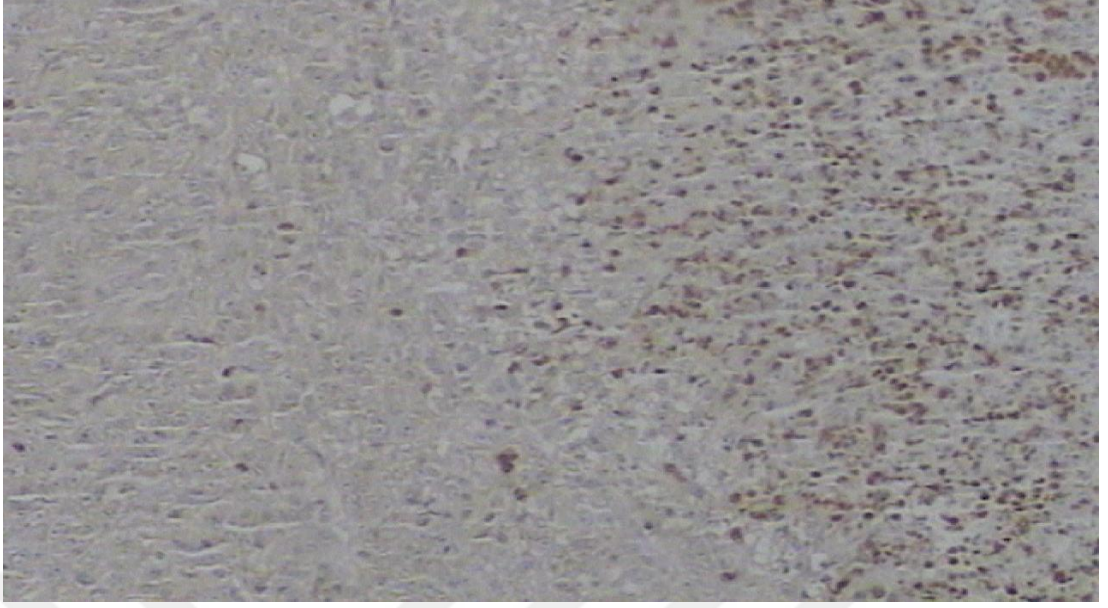
(1: düşük ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 3: yüksek ekspresyon)



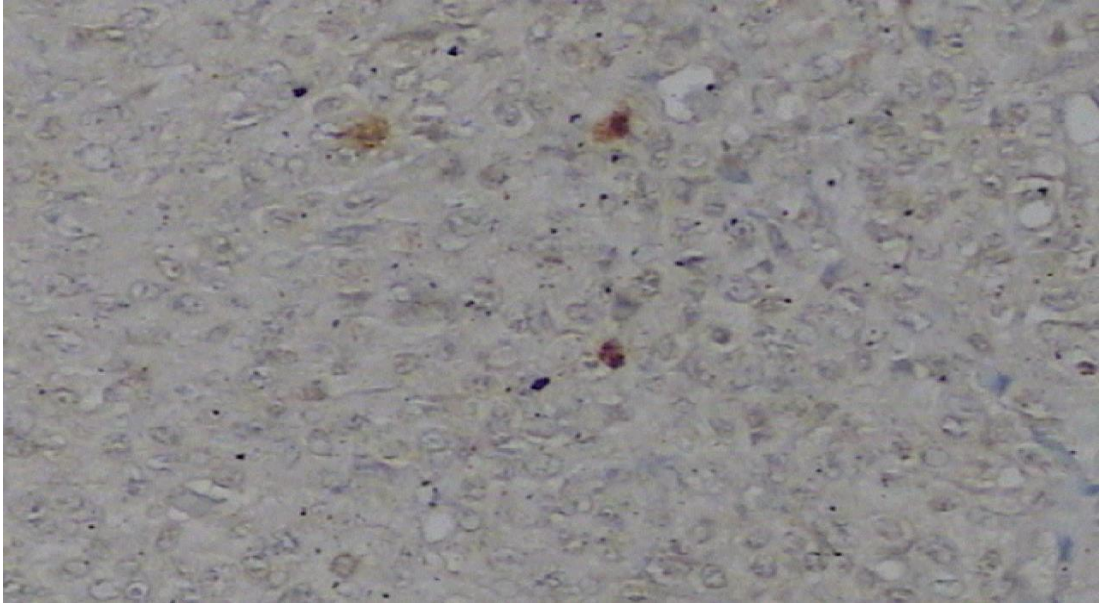
Şekil 10.a.98-CD8 (Kontrol Grubu) orta düzeyde sitotoksik T lenfositler



Şekil 10.b. 97-CD4(Kontrol Grubu) T helper lenfositler negatif ekspresyon



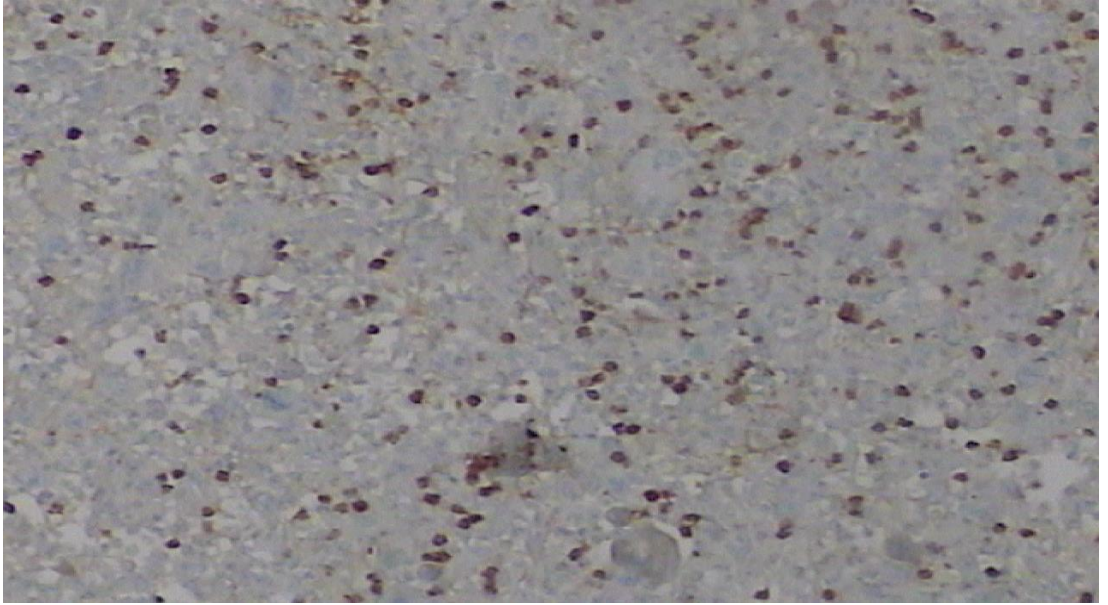
Şekil 10.c.98-FAPA (Kontrol Grubu) Tümör çevresi fibroblast activating protein ekspresyonu



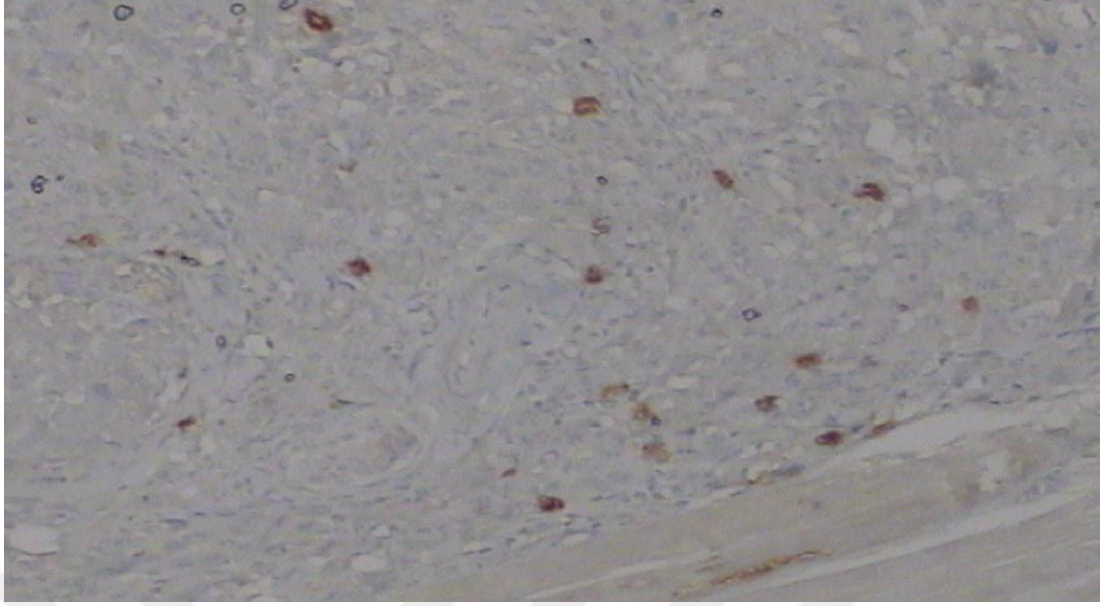
Şekil 10.d.98-CD64 (Kontrol Grubu) tek tük histiosit tümör içi



Şekil 10.e.97-NCR1 (Kontrol Grubu) tümör içi seyrek Natural killer hücreler



Şekil 10.f.100-CD8 (Kontrol Grubu) Tümör içi çok sayıda sitotoksik T lenfositler



Şekil 10.g.100-CD20 (Kontrol Grubu) Tümör içi az sayıda B lenfositler

4.2.7. Atimik Nude Farede Serum Fizyolojik İle Hazırlanan Sement Uygulanan Grubun İmmünohistokimya Bulguları

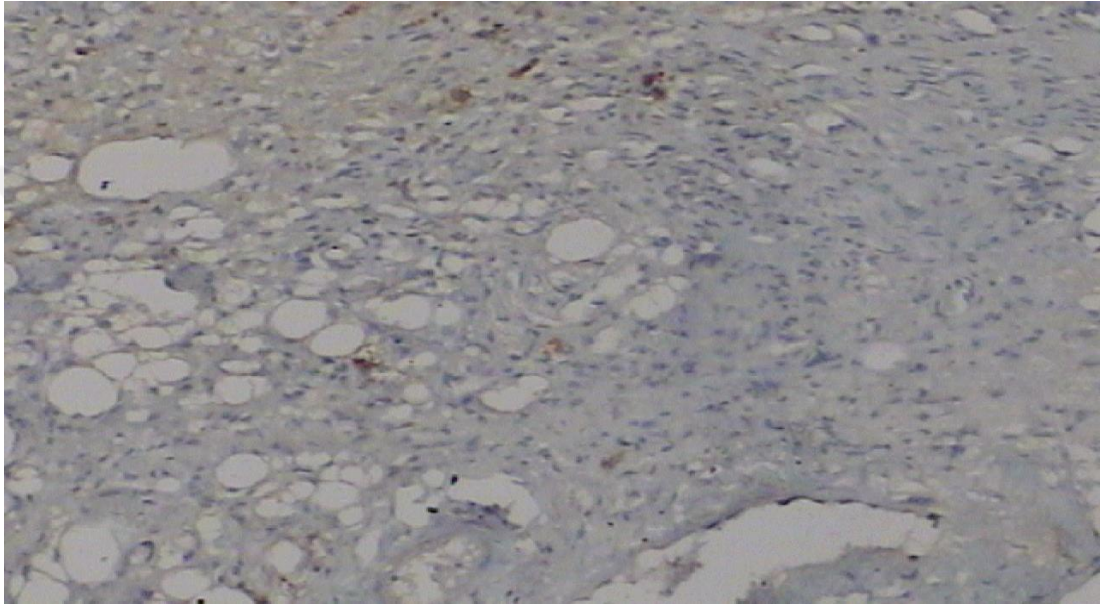
Serum fizyolojik ile hazırlanan sement uygulanan nude farelerde, cerrahi öncesi tümörde tüm hayvanlarda düşük düzeyde CD4 (%100, n:7); %28,6 ‘sında düşük CD8 (n:2), %42,9 ‘unda orta düzeyde CD20 (n:3) ve %28,6 ‘sında yüksek düzeyde NCR1 (n:2) tespit edilmiştir. Cerrahi sonrası serum fizyolojik ile hazırlanmış sement uygulanan hayvanlarda ise %57,1 ‘inde CD8 orta düzeyde (n:4), CD20 %71,4 ‘ünde düşük düzeyde (n:5), %85,7 ‘sinde orta düzeyde CD64 (n:6), NCR1 %71,4 ‘ünde orta düzeyde (n: 5) ve %57,1 ‘inde düşük düzeyde FAPA (n:4) görülmüştür (Tablo 11).

Tablo 11. Atimik nude fare serum fizyolojik ile hazırlanan sement uygulanan grubun tümör rezeksiyonu önce ve sonrası CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri

Tümör Rezeksiyon Öncesi						Tümör Rezeksiyon Sonrası					
CD4	CD8	CD20	CD64	NCR1	FAPA	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR1	FAPA
1	2	1	1	3	2	1	2	1		2	2

1	3	1	2	2	1	1	1	2	2	2	1
1	1	2	2	2	2	1	3	1	2	1	
1	3	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2
1	2	1	2	3	1	1	3	1	2	1	1
1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1
1	2	1		2	2	1	2	1	2	2	1

(0: ekspresyon yok, 1: düşük ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 3: yüksek ekspresyon)

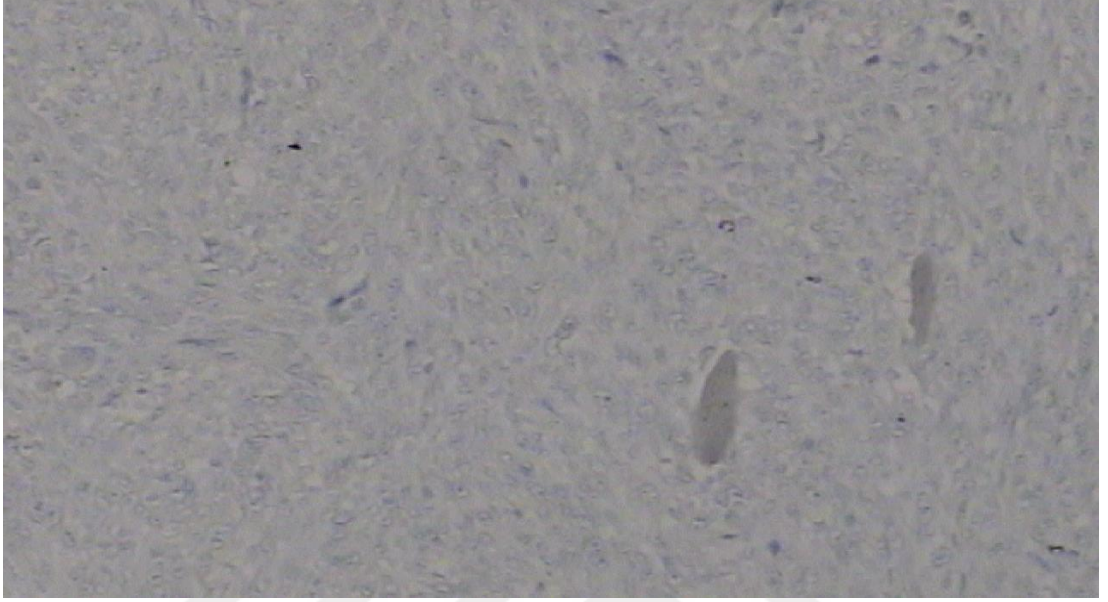


Şekil 11.a.23-CD64 (Sement+Sf Grubu) seyrek histiositler

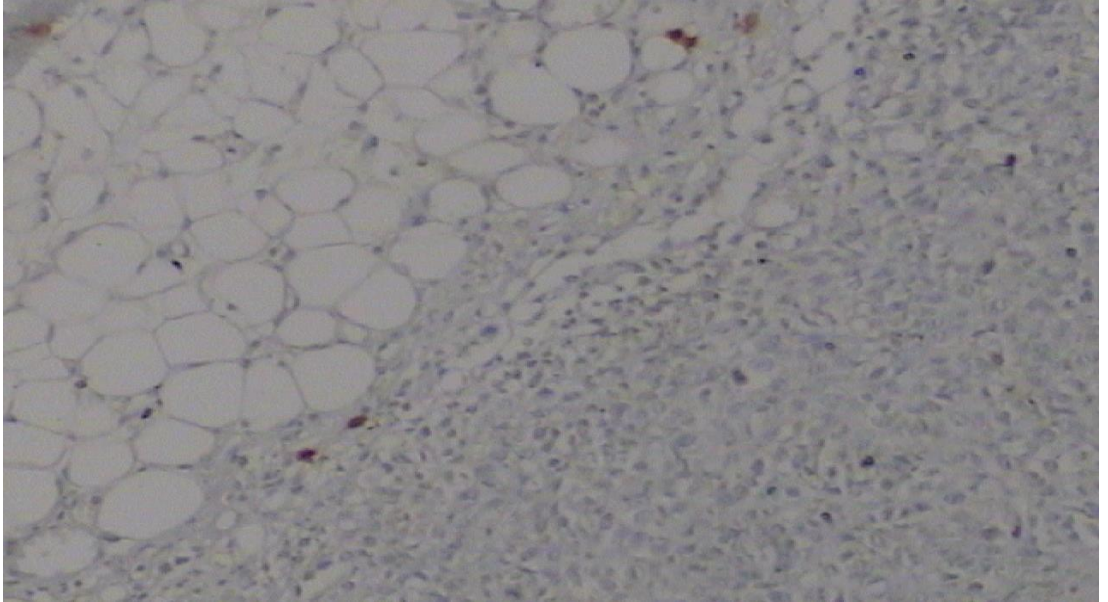
4.2.8. Atimik Nude Farede İfosfamid İle Hazırlanan Sement Uygulanan Grubun İmmünohistokimya Bulguları

Serum fizyolojik ile hazırlanan sement uygulanan nude farelerde, cerrahi öncesi tümörde %85,7'sinde düşük düzeyde CD4 (n:6); %71,4'ünde orta düzeyde CD8 (n:5), %71,4 'ünde orta düzeyde CD20 (n:5) ve %71,4 'ünde yüksek düzeyde NCR1 (n:5) ve %42,9 'unda orta düzeyde FAPA (n:4) tespit edilmiştir. Cerrahi sonrası ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulanan hayvanların tümünde CD4 düşük düzeyde (n:7, %100), %57,1 'inde orta düzeyde CD8 (n:4), CD20 %71,4 'ünde düşük düzeyde

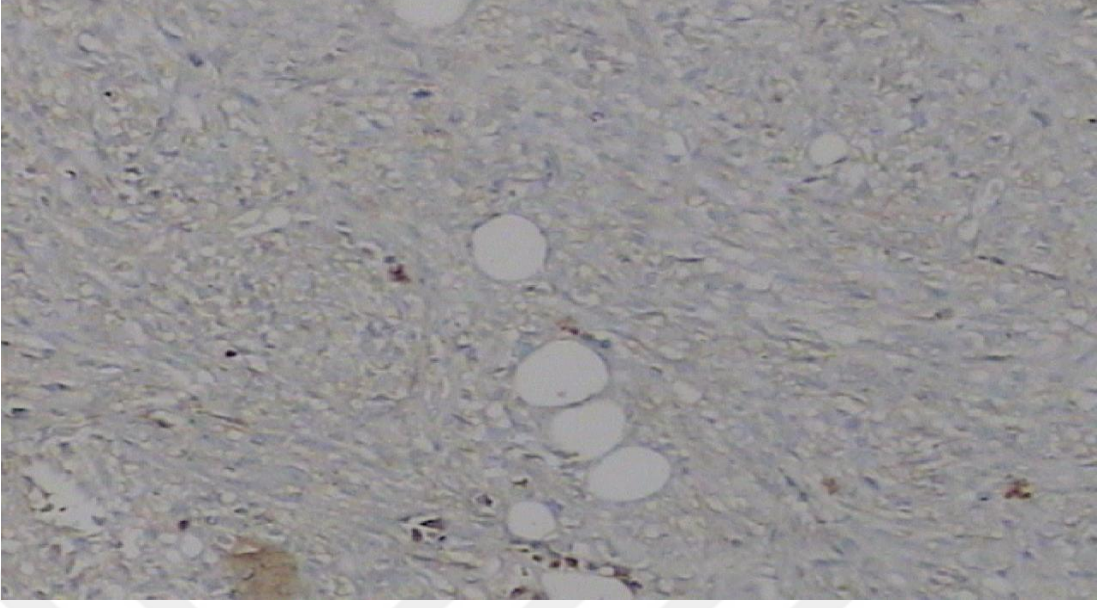
(n:5), %71,4 'ünde orta düzeyde CD64 (n:5), NCR1 tümünde orta düzeyde (n: 7, %100) ve %57,1 'inde düşük düzeyde FAPA (n:4) görülmüştür (Tablo 12).



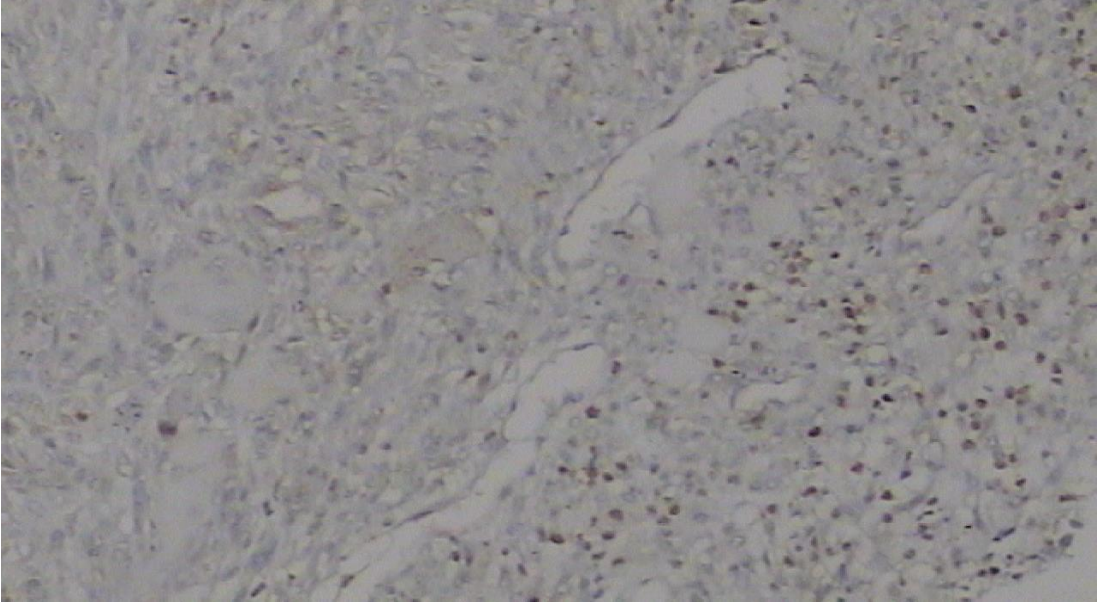
Şekil 12.a.111-CD64 T1(sement+ifosfamid grubu) Tümör içi histiosit yok



Şekil 12.b. 111-CD64 T2 tümör çevresi seyrek histiosit



Şekil 12.c.11FAPA T1 seyrek aktive fibroblastlar



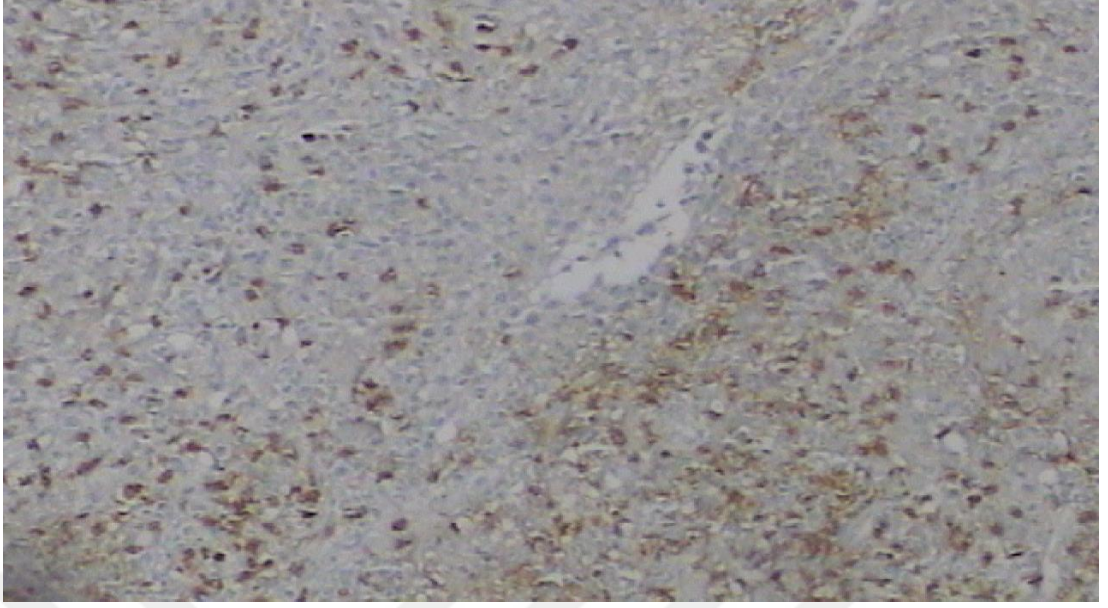
Şekil 12.d.111-FAPA T2 tümör çevresi artmış aktive fibroblastlar



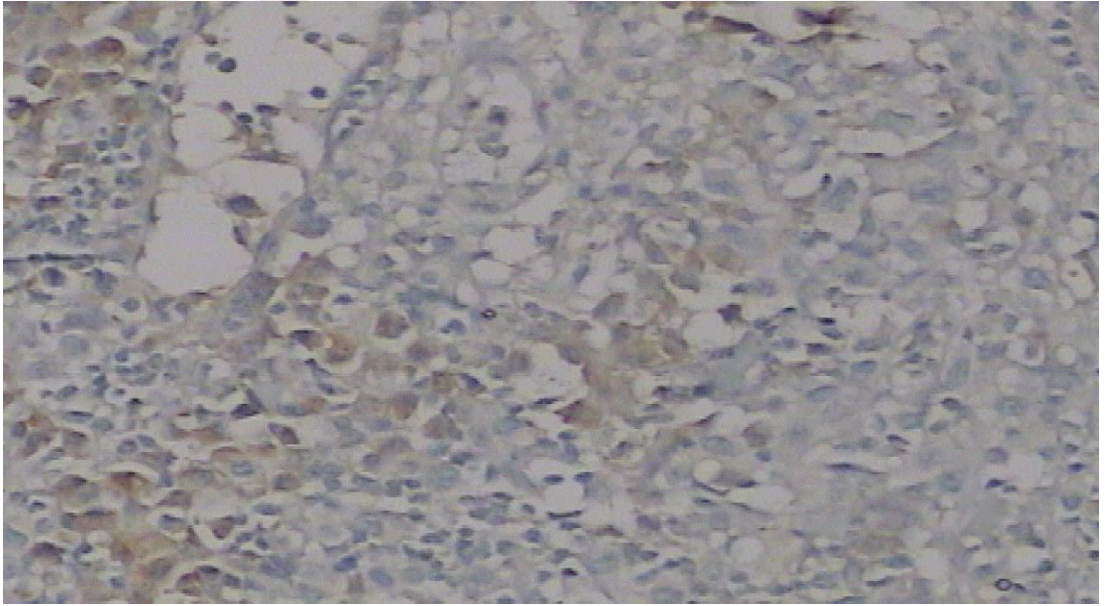
Şekil 12.e.112-CD4 T1 tümör çevresi az sayıda T helper lenfositler



Şekil 12.f.112-CD4 T2 seyrek t helper lenfositler tümör yok



Şekil 12.g.112-CD8 T1 tümör içi yoğun sitotoksik T lenfositler



Şekil 12.h.112-CD20 T1 Tümör içi seyrek B lenfositler

Tablo 12. Atimik nude fare ifosfamid ile hazırlanan sement uygulanan grubun tümör rezeksiyonu önce ve sonrasında CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri

Tümör Rezeksiyon Öncesi						Tümör Rezeksiyon Sonrası					
CD4	CD8	CD20	CD64	NCR1	FAPA	CD4	CD8	CD20	CD64	NCR1	FAPA
1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	3
2	3	2	2	3	2	1	1	2	2	2	2
1	2		1	1	2	1	2		2	2	2
1	2	1	2	2		1	2	1	2	2	
1	2	1	1	2		1	2	1	1	2	
1	2	1	1	2		1	2	1	1	2	
1	2	1	2	2	2	1	3	1	2	2	2

(0: ekspresyon yok, 1: düşük ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 3: yüksek ekspresyon)

4.2.9. Atimik nude farede serum intraperitoneal ifosfamid uygulanan grubun immünohistokimya bulguları

İntraperitoneal ifosfamid uygulanan nude farelerde, cerrahi sonrası ifosfamid ile hazırlanmış sement uygulanan hayvanların tümünde CD4 düşük düzeyde (n:8, %100), %75 ‘inde orta düzeyde CD8 (n:6), CD20 %50 ‘sinde düşük düzeyde (n:4), %62,5 ‘inde orta düzeyde CD64 (n:5), NCR1 t%62,5 ‘inde orta düzeyde (n: 5) ve %37,5 ‘inde orta düzeyde FAPA (n:3) görülmüştür (Tablo 13).

Tablo 13. Atimik nude fare intraperitoneal ifosfamid uygulanan grubun CD4, CD8, CD20, CD64, NCR1 ve FAPA ekspresyon düzeyleri

CD4	CD8	CD20	CD64	NCR	FAPA
1	1	1	2	3	1
1	2	2	2	3	1
1	2	1	2	2	
1	2	2	2	2	
1	2		2	3	2
1	3		2	2	2
1	2	1	1	2	3
1	2	1	1	2	2

(1: düşük ekspresyon, 2: orta ekspresyon, 3: yüksek ekspresyon)

4.3. Balb/c fare bulgularının istatistiksel analizi

4.3.1. Kontrol grubu ile serum fizyolojik ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması

NÖTROFİL

			grup		
			sadece tümör	sement+SF	Total
nötroortaveyüksek	yok veya düşük	Count	7	1	8
		% within grup	100,0%	14,3%	57,1%
	orta veya yüksek	Count	0	6	6
		% within grup	0,0%	85,7%	42,9%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	10,500 ^b	1	,001		
Continuity Correction ^c	7,292	1	,007		
Likelihood Ratio	13,380	1	,000		
Fisher's Exact Test				,005	,002
Linear-by-Linear Association	9,750	1	,002		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,00.

c. Computed only for a 2x2 table

CD8

Crosstab^a

			grup		
			sadece tümör	sement+SF	Total
CD8ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	7	3	10
		% within grup	100,0%	42,9%	71,4%
	orta veya yüksek	Count	0	4	4
		% within grup	0,0%	57,1%	28,6%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	5,600 ^b	1	,018		
Continuity Correction ^c	3,150	1	,076		
Likelihood Ratio	7,191	1	,007		
Fisher's Exact Test				,070	,035
Linear-by-Linear Association	5,200	1	,023		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,00.

c. Computed only for a 2x2 table

4.3.2. Kontrol grubu ile mifamurtid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması

LENFOSİT

Crosstab^a

			grup		Total
			sadece tümör	sement+Mifamurtid	
lenfortaveyüksek	yok veya düşük	Count	5	7	12
		% within grup	71,4%	100,0%	85,7%
	orta veya yüksek	Count	2	0	2
		% within grup	28,6%	0,0%	14,3%
Total	Count		7	7	14
	% within grup		100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	2,333 ^b	1	,127		
Continuity Correction ^c	,583	1	,445		
Likelihood Ratio	3,107	1	,078		
Fisher's Exact Test				,462	,231
Linear-by-Linear Association	2,167	1	,141		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,00.

c. Computed only for a 2x2 table

HİSTİOSİT

Crosstab^a

			grup		
			sadece tümör	sement+Mifamurtid	Total
histortaveyüksek	yok veya düşük	Count	7	3	10
		% within grup	100,0%	42,9%	71,4%
	orta veya yüksek	Count	0	4	4
		% within grup	0,0%	57,1%	28,6%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	5,600 ^b	1	,018		
Continuity Correction ^c	3,150	1	,076		
Likelihood Ratio	7,191	1	,007		
Fisher's Exact Test				,070	,035
Linear-by-Linear Association	5,200	1	,023		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,00.

c. Computed only for a 2x2 table

CD8

Crosstab^a

			grup		
			sadece tümör	sement+Mifamurtid	Total
CD8ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	7	0	7
		% within grup	100,0%	0,0%	50,0%
	orta veya yüksek	Count	0	7	7
		% within grup	0,0%	100,0%	50,0%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	14,000 ^b	1	,000		
Continuity Correction ^c	10,286	1	,001		
Likelihood Ratio	19,408	1	,000		
Fisher's Exact Test				,001	,000
Linear-by-Linear Association	13,000	1	,000		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,50.

c. Computed only for a 2x2 table

CD64

Crosstab^a

			grup		
			sadece tümör	sement+Mepact	Total
CD64ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	6	0	6
		% within grup	85,7%	0,0%	42,9%
	orta veya yüksek	Count	1	7	8
		% within grup	14,3%	100,0%	57,1%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	10,500 ^b	1	,001		
Continuity Correction ^c	7,292	1	,007		
Likelihood Ratio	13,380	1	,000		
Fisher's Exact Test				,005	,002
Linear-by-Linear Association	9,750	1	,002		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,00.

c. Computed only for a 2x2 table

FAPA

Crosstab^a

			grup		
			sadece tümör	sement+Mifamurtid	Total
FAPAortaveyüksek	yok veya düşük	Count	4	0	4
		% within grup	57,1%	0,0%	28,6%
	orta veya yüksek	Count	3	7	10
		% within grup	42,9%	100,0%	71,4%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	5,600 ^b	1	,018		
Continuity Correction ^c	3,150	1	,076		
Likelihood Ratio	7,191	1	,007		
Fisher's Exact Test				,070	,035
Linear-by-Linear Association	5,200	1	,023		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,00.

c. Computed only for a 2x2 table

4.3.3. Kontrol grubu ile ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması

CD8

Crosstab^a

			grup		
			sadece tümör	sement+Ifos	Total
CD8ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	7	2	9
		% within grup	100,0%	28,6%	64,3%
	orta veya yüksek	Count	0	5	5
		% within grup	0,0%	71,4%	35,7%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	7,778 ^b	1	,005		
Continuity Correction ^c	4,978	1	,026		
Likelihood Ratio	9,873	1	,002		
Fisher's Exact Test				,021	,010
Linear-by-Linear Association	7,222	1	,007		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,50.

c. Computed only for a 2x2 table

4.3.3. Kontrol grubu ile mifamurtid+ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması

CD8

Crosstab^a

		grup		Total
		sadece tümör	sement+ifos+mepa ct	
CD8ortaveyüksek yok veya düşük	Count	7	0	7
	% within grup	100,0%	0,0%	50,0%
	Count	0	7	7
	% within grup	0,0%	100,0%	50,0%
Total	Count	7	7	14
	% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	14,000 ^b	1	,000		
Continuity Correction ^c	10,286	1	,001		
Likelihood Ratio	19,408	1	,000		
Fisher's Exact Test				,001	,000
Linear-by-Linear Association	13,000	1	,000		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,50.

c. Computed only for a 2x2 table

CD64

Crosstab^a

			sadece tümör	grup sement+ifos+mepa ct	Total
CD64ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	6	0	6
		% within grup	85,7%	0,0%	42,9%
	orta veya yüksek	Count	1	7	8
		% within grup	14,3%	100,0%	57,1%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Crosstab^a

			sadece tümör	grup sement+ifos+mepac t	Total
CD64ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	6	0	6
		% within grup	85,7%	0,0%	42,9%
	orta veya yüksek	Count	1	7	8
		% within grup	14,3%	100,0%	57,1%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

4.3.4. SF+Sement grubu ile mifamurtid+ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması

CD8

Crosstab^a

			sement+SF	grup sement+ifos+mepa ct	Total
CD8ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	3	0	3
		% within grup	42,9%	0,0%	21,4%
	orta veya yüksek	Count	4	7	11
		% within grup	57,1%	100,0%	78,6%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	3,818 ^b	1	,051		
Continuity Correction ^c	1,697	1	,193		
Likelihood Ratio	4,988	1	,026		
Fisher's Exact Test				,192	,096
Linear-by-Linear Association	3,545	1	,060		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,50.

c. Computed only for a 2x2 table

CD64

Crosstab^a

			sement+SF	grup sement+ifos+mepac t	Total
CD64ortaveyüksek	yok veya düşük	Count	6	0	6
		% within grup	85,7%	0,0%	42,9%
	orta veya yüksek	Count	1	7	8
		% within grup	14,3%	100,0%	57,1%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	10,500 ^b	1	,001		
Continuity Correction ^c	7,292	1	,007		
Likelihood Ratio	13,380	1	,000		
Fisher's Exact Test				,005	,002
Linear-by-Linear Association	9,750	1	,002		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,00.

c. Computed only for a 2x2 table

FAPA

Crosstab^a

			sement+SF	grup sement+ifos+mepa ct	Total
FAPAortaveyüksek	yok veya düşük	Count	6	1	7
		% within grup	85,7%	14,3%	50,0%
	orta veya yüksek	Count	1	6	7
		% within grup	14,3%	85,7%	50,0%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	7,143 ^b	1	,008		
Continuity Correction ^c	4,571	1	,033		
Likelihood Ratio	7,925	1	,005		
Fisher's Exact Test				,029	,015
Linear-by-Linear Association	6,633	1	,010		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,50.

c. Computed only for a 2x2 table

4.3.5. İfosfamid+Sement grubu ile mifamurtid+ifosfamid ile hazırlanan sement uygulamasının karşılaştırılması

FAPA

Crosstab^a

			grup		
			sement+lfos	sement+ifos+mepact	Total
FAPAortaveyüksek	yok veya düşük	Count	6	1	7
		% within grup	85,7%	14,3%	50,0%
	orta veya yüksek	Count	1	6	7
		% within grup	14,3%	85,7%	50,0%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	7,143 ^b	1	,008		
Continuity Correction ^c	4,571	1	,033		
Likelihood Ratio	7,925	1	,005		
Fisher's Exact Test				,029	,015
Linear-by-Linear Association	6,633	1	,010		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,50.

c. Computed only for a 2x2 table

4.3.6. Mifamurtid+Sement grubu ile ifosfamid+sement uygulamasının karşılaştırılması

LENFOSİT

Crosstab^a

			grup		
			sement+Mepact	sement+lfos	Total
lenfortaveyüksek	yok veya düşük	Count	7	1	8
		% within grup	100,0%	14,3%	57,1%
	orta veya yüksek	Count	0	6	6
		% within grup	0,0%	85,7%	42,9%
Total		Count	7	7	14
		% within grup	100,0%	100,0%	100,0%

a. hayvan = Balbc

Chi-Square Tests^a

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	10,500 ^b	1	,001		
Continuity Correction ^c	7,292	1	,007		
Likelihood Ratio	13,380	1	,000		
Fisher's Exact Test				,005	,002
Linear-by-Linear Association	9,750	1	,002		
N of Valid Cases	14				

a. hayvan = Balbc

b. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,00.

c. Computed only for a 2x2 table

5. TARTIŞMA

Osteosarkom tedavisinde geçmişte genellikle amputasyon seçeneği ön planda tutulmaktaydı. Günümüzde ise indüksiyon ve adjuvan kemoterapi protokollerinin gelişmesi, cerrahi teknikler ve radyolojik evreleme çalışmalarındaki ilerlemelerle hastaların %90-95'i artık ekstremité koruyucu rezeksiyon ve rekonstrüksiyon ile tedavi görmektedir. Bu hastaların uzun dönem yaşama şansı ve kür oranı, lokalize (metastaz olmayan) hastalıklarda, %60-80'e yükselmiştir (1). Osteosarkom 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 kemoterapi veya fenolizasyon gibi uygulamalar nüksü azaltmak için denenmektedir (64). Ancak Osteosarkom gibi malign tümörlerin geniş rezeksiyonu sonrası daha büyük defektler oluşmakta ve hem bu boşlukların doldurulmasında, hem de rekonstrüksiyonu sırasında uygulanan ortopedik implantın kemiğe tutunmasında PMMA çimentolar yaygın olarak klinik kullanımdadır. Bu nedenle de *in vivo* ve *in vitro* 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 (65). Biz de başarılı literatür sonuçları doğrultusunda PMMA kemik çimentosu ile birlikte kemoterapötik ve immünoterapötik ajan kullanımının lokal etkisini araştırmayı amaçladık.

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 (66). Danorubisin katılmış kemik çimentosunun atimik nüde fareler ve wistar cinsi sıçanlar üzerinde incelendiği bir diğer çalışmada ise karışıma mannitol eklenmesinin hem *in vivo*, hem de *in vitro* ilaç salınımını %90'lara varan oranda arttırabileceği gösterilmiştir (67). Kendi çalışmamız da ise immunoterapötik ve kemoterapötik ajanların PMMA içerisine eklenmesiyle birlikte lokal etkileşimlerin meydana geldiğini gözlemlemiş olduk. İfosfamid ve mifamurtid ile hazırladığımız kemik çimentosunu lokal olarak tümör oluşan bölgeye implante edip sonrasında bu tümör bölgesini immünohistokimyasal olarak analiz ettik.

Çalışmamızda uyguladığımız yöntem ile osteosarkomun klinikte yapılan cerrahi rezeksiyonu sonrasında immünoterapötik ve kemoterapötik ajan ile hazırlanmış kemik çimentosu uygulamasının bir tedavi seçeneği olacağını gözlemlemiş olduk.

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 tespit edilebilen canlı tümör hücrelerinin üçüncü günden sonra namlı şekilde azaldığı ve bir haftanın sonunda neredeyse hiç rastlanmadığını bildirmişlerdir(68).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 (69).

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 düşeyine 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

araştırılabilmektedir (70). Mestiri ve ark. ise çalışmalarında sisplatinin invitro ve tavşan hücrelerinde salınımını incelemiştir. Ancak yine tümör modeli içermeyen çalışmada sadece ilacın çimentodan yeterli miktarda salındığı ortaya konmuştur (71). Sisplatinin kemik çimentosu içerisinde 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 (72).

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 (73). 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 (74). 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 (75). 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 literatürde yer alan çalışmalardan en yenilikçi yönü osteosarkom tümör modelinde PMMA içerisindeki ifosfamid ve mifamurtidin hem lokal olarak tümör hücrelerine etkinliğinin ortaya konmuş olmasıdır. Çalışmanın sonucunda cerrahi olarak subtotal rezeksiyon sonrası lokal olarak bu bölgeye konulan kemik çimentosu içindeki ifosfamid ve mifamurtidin tümör mikroçevresine T hücre sayısını ve B lenfosit çektiği gözlenmiştir. Sement içerisindeki kemoterapötik ve immünoterapötik ajan salınımı ile tümör hücreleri sayısı azalmıştır. Bu çalışma ile cerrahi işlem uygulanan bölgeye ifosfamid ve mifamurtid ile hazırlanmış sementin yeni bir tedavi seçeneği oluşturacağı düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın ilk basamağında in vitro koşullarda ifosfamid ve mifamurtid ile hazırlanan sementin osteosarkom hücre hattı olan K7M2 ile canlılık testleri yapıldı.

In vitro olarak K7M2 osteosarkom hücrelerine 24 ve 48 saatlik mifamurtid emdirilmiş sement uygulandığında tek başına mifamurtid uygulanmasına kıyasla sement içine emdirilerek uygulandığında daha fazla sitotoksik etki gösterdi. Buna göre 0,5 ug/ml mifamurtid ve sementin 24 saatlik uygulanması sonucu %41,7 canlılık tespit edildi.

In vitro olarak K7M2 osteosarkom hücrelerine 24 ve 48 saatlik ifosfamid emdirilmiş sement uygulandığında tek başına ifosfamid uygulanmasına kıyasla daha fazla sitotoksik etki gösterdi. Buna göre 20 ug/ml ifosfamid ve sementin 48 saatlik uygulanması sonucu %47,49 canlılık tespit edildi.

İfosfamid ve mifamurtid ile hazırlanan sementin well plate içinde salınım hızı ve oranı sebebiyle osteosarkom hücrelerine etkileri daha sitotoksik olmuştur. Tümör hücreleriyle etkileşimi daha fazla olan ilaç yüklenmiş sementin canlılık analizleri sonucunda uygun doz hesabı yapılarak çalışmanın in vivo deney hayvanları basamağına geçilmiştir. Deney hayvanı olarak iki farklı fare türünde çalışılmıştır. Balb/c fareler immün yanıtı olan ve nüde fareler de immün yanıtı olmayan deney hayvanlarıdır.

Deney hayvanları grupları:

Balb/c grupları

Grup I Kontrol grubu (n: 7) : Tümör enjekte edilen Balb-c grup

Grup II (n: 7) : Tümör enjekte edilip SF emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Grup III (n: 7) : Tümör enjekte edilip mifamurtid emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Grup IV (n: 7) : Tümör enjekte edilip ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Grup V (n:7) : Tümör enjekte edilip mifamurtid+ ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilen Balb-c grup

Nude fareler grupları

Grup I Kontrol grubu (n: 7) : Tümör oluşturulan grup

Grup II (n: 7) : Tümör oluşturulup subtotal rezeksiyon sonrası SF emdirilmiş sement yerleştirilen grup

Grup III (n: 7) : Tümör oluşturulup subtotal rezeksiyon sonrası ifosfamid emdirilmiş sement yerleştirilen grup

Grup IV (n: 7) : Tümör oluşturulup subtotal rezeksiyon sonrası sement yerleştirilip, IP ifosfamid verilen grup

Balb/c farelerde subkutan tümör enjeksiyonu sonucu(2 tekrar ve 1 ay beklenildi) tümör oluşumu gözlenmedi. Bu sebepten dolayı tümör hücresi verilen bölgeye steril koşullarda cerrahi işlem ile ifosfamid, mifamurtid ve serum fizyolojik ile hazırlanmış sementler implante edildi. 1 haftalık takip sonrası fareler sakrifiye edilip sement ve çevresindeki dokular çıkarılmıştır. Bu dokular patolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. CD4, CD8,CD20,CD64,FAPA ve NCR1 antikoru kullanıldı.

Yardımcı T lenfosit için CD4

Sitotoksik T lenfositler için CD8

B lenfosit için CD20

Natural killer hücreler için NCR1

Fibroblast için FAPA

Makrofaj oranı için CD64 antikoru

Nüde farelerde ise subkutan tümör enjeksiyonu sonucunda 1 ay içerisinde tümör oluşumu gözlemlendi. 1 haftalık takip sonrası fareler sakrifiye edilip sement ve çevresindeki dokular çıkarılmıştır.

Balb/c deney hayvanı gruplarında tümör enjeksiyonu sonucu gruplar arasında;

Grup 1 ve grup 2 arasında; CD8 açısından anlamlı fark grup 2 yönünden vardır($p=0,034$).

Grup 1 ve grup 3 arasında; CD8, CD64 ve FAPA açısından anlamlı fark grup 3 yönünden vardır($p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,035$).

Grup 1 ve grup 4 arasında; CD8 açısından anlamlı fark grup 4 yönünden vardır($p=0,01$).

Grup 1 ile grup 5 arasında; CD8 ve CD64 açısından anlamlı fark grup 5 yönünden bulunmuştur($p=0,01$ ve $p=0,02$). İfosfamid ve mifamurtid ile hazırlanan sementin tümör enjeksiyonu yapılan bölgesinde daha çok sitotoksik T lenfosit ve makrofaj oranı görülmüştür.

Grup 2 ve grup 3 arasında; CD64 ve FAPA açısından anlamlı fark grup 3 yönünde vardır($p=0,002$ ve $p=0,0021$).

Grup 2 ve grup 4 arasında; inflamasyon, lenfosit ve nötrofil seviyeleri açısından anlamlı fark vardır($p=0,015$, $p=0,002$, $p=0,01$).

Grup 2 ve grup 5 arasında; CD64 ve FAPA açısından istatistiksel fark ortaya çıkmıştır($p=0,002$ ve $p=0,015$).

Grup 3 ve grup 4 arasında; FAPA açısından anlamlı fark vardır($p=0,002$).

Grup 3 ve grup 5 arasında; anlamlı fark ortaya çıkmamıştır.

Grup 4 ve grup 5 arasında; lenfosit ve FAPA açısından anlamlı fark vardır($p=0,015$, $p=0,001$).

Nude mice gruplar

Kontrol grubu

kontrol grubu	apoptoz	nekroz	tm çapı	vaskülarizasyon
97	15	30	12	az, orta
98	15	40	16	az, orta
99	20	60	12	az, orta
100	3	10	10	az, orta
101	10	25	13	az, orta
102	2	3	6	az, orta
103	5	20	9	az, orta

Sement + sf grubu

sement+ifos	apoptoz	nekroz	tm çapı	vaskülarizasyon
111 T1	2	3	8	HAFİF
111 T2	10	50	13	HAFİF
112 T1	1	2	6	HAFİF
112 T2	0	0	0	YOK
113 T1	5	10	6	HAFİF
113 T2	5	30	11	HAFİF, ORTA
114 T1	0	0	6	HAFİF
114 T2	2	5	9	HAFİF
115 T1	5	30	7	HAFİF
115 T2	5	20	10	HAFİF
116 T1	1	2	7	HAFİF
116 T2	2	5	10	HAFİF
117 T1	6	10	8	HAFİF
117 T2	4	10	14	HAFİF

Sement+ifosfamid grubu

sement+ifos	apoptoz	nekroz	tm çapı	vaskülarizasyon
111 T1	2	3	8	HAFİF
111 T2	10	50	13	HAFİF
112 T1	1	2	6	HAFİF
112 T2	0	0	0	YOK
113 T1	5	10	6	HAFİF
113 T2	5	30	11	HAFİF, ORTA
114 T1	0	0	6	HAFİF
114 T2	2	5	9	HAFİF
115 T1	5	30	7	HAFİF
115 T2	5	20	10	HAFİF
116 T1	1	2	7	HAFİF
116 T2	2	5	10	HAFİF
117 T1	6	10	8	HAFİF
117 T2	4	10	14	HAFİF

IP ifosfamid grubu

IP ifosfamid	apoptoz	nekroz	tm çapı	vaskülarizasyon
118	0	0	0	yok
119	20	5	15	hafif
120	5	20	10	hafif
121	2	5	9	hafif
122	1	3	12	hafif
123	1	1	12	hafif
124	0	0	0	yok

A1- Sadece tümör grubu

A2-Sement+SF grubu(cerrahi öncesi)

A3-sement+sf grubu(cerrahi sonrası)

A4-sement+ifosfamid grubu(cerrahi öncesi)

A5-sement+ifosfamid(cerrahi sonrası)

A6-IP ifosfamid grubu

A1-A2 grubu istatikselsel karşılaştırma

CD64 $p=0,024$ anlamlı fark var

A2-A3 grubu istatikselsel karşılaştırma

CD4 $p=0,016$ anlamlı fark var

A4-A5 grubu istatikselsel karşılaştırma

NCR1 $p=0,031$ anlamlı fark var

A1-A6 grubu istatikselsel karşılaştırma

CD64 $p=0,03$ anlamlı fark var

7. KAYNAKLAR

1. 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.
2. 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.
3. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand. *Eur J Cancer*. 2011;47:2431-2445.
4. Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol*, 2014;16C:15-23.
5. Yamamoto N, Tsuchiya H. Chemotherapy for osteosarcoma - where does it come from? What is it? Where is it going?. *Expert Opin Pharmacother*. 2013; 14(16):2183-93.
6. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26:633–8.
7. Hogendoorn PC, Athanasou N, Bielack S, et al. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl. 5):v204–13.
8. Fuchs N, Bielack SS, Epler D, et al. Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group’s protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann Oncol* 1998;9:893–9.
9. Kobys VL, Konovalenko VF, Repin NV, et al. Treatment of large osteosarcoma in children: new approach. *Exp Oncol*. 2013; 35(2):105-8.
10. Kager L, Potschger U, Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther Clin Risk Manag*. 2010;6:279–86.
11. 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 model. PLoS One. 2014;9(3):e90795.
12. Yamamoto N, Tsuchiya H. Chemotherapy for osteosarcoma - where does it come from? What is it? Where is it going? Expert Opin Pharmacother. 2013; 14(16):2183-93.
 13. Biermann JS, Adkins DR, Agulnik M, Benjamin RS, Brigman B, Butrynski JE, Frassica FJ. Bone cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2013;11(6):688–723.
 14. SEER Stat Fact Sheets: Bone and Joint Cancer. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/bones.html>.
 15. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. Cancer. 2009;115:1531–43. doi:10.1002/cncr.1. 24121.
 16. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. Cancer. 1995;75:203–10. doi:10.1002/1097-0142(19950101) 75:1<203:AID-CNCR12820751308[3.0.CO;2-V.
 17. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. In: Pediatric and adolescent osteosarcoma. US: Springer; 2009. p. 3–13.
 18. Misaghi A, Goldin A, Awad M, Kulidjian AA. Osteosarcoma: a comprehensive review. SICOT J. 2018;4:12. doi:10.1051/sicotj/2017028
 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. Vormoor B, Knizia HK, Batey MA, Almeida GS, Wilson I, Dildey P, Sharma A, et al. Development of a preclinical orthotopic xenograft model of ewing sarcoma

and other human malignant bone disease using advanced in vivo imaging. *PLoS One*. 2014; 9 (1), e85128.

25. 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
26. Hau A, Kim I, Kattapuram S, Hornicek FJ, Rosenberg AE, Gebhardt MC, Mankin HJ. Accuracy of CT-guided biopsies in 359 patients with musculoskeletal lesions. *Skeletal Radiol* 2002;31: 349–353
27. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol* 2006;125:555–581.
28. Prater S, McKeon B. Cancer, Osteosarcoma. [Güncelleme 12 Kasım 2019]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549868/>
29. Bertrand TE, Cruz A, Binitie O, Cheong D, Letson GD. Do surgical margins affect local recurrence and survival in extremity, nonmetastatic, high-grade osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(3):677–83.
30. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;153:106–20.
31. Redondo A, Cruz J, Lopez-Pousa A, Baro'n F. SEOM clinical guidelines for the treatment of osteosarcoma in adults-2013. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(12):1037–1043.
32. Saeter G, Høie J, Stenwig AE, Johansson AK, Hannisdal E, Solheim ØP. Systemic relapse of patients with osteogenic sarcoma. Prognostic factors for long-term survival. *Cancer*. 1995;75(5):1084–93.
33. Bacci G, Mercuri M, Briccoli A, Ferrari S, Bertoni F, Donati D, Manfrini M. Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation. *Cancer*. 1997;79(2):245–54.
34. Briccoli A, Rocca M, Salone M, Bacci G, Ferrari S, Balladelli A, Mercuri M. Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2005;104(8):1721–5.

35. Chou AJ, Merola PR, Wexler LH, Gorlick RG, Vyas YM, Healey JH, Meyers PA. Treatment of osteosarcoma at first recurrence after contemporary therapy. *Cancer*. 2005;104(10): 2214–21.
36. McTiernan A, Meyer T, Michelagnoli MP, Lewis I, Whelan JS. A phase I/II study of doxorubicin, ifosfamide, etoposide and interval methotrexate in patients with poor prognosis osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46(3):345–50.
37. Lindsey BA, Markel JE, Kleinerman ES. Osteosarcoma overview. *Rheumatol Ther*. 2010;4:25-43.
38. Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010;8(10):705–18.
39. Kudawara I, Aoki Y, Ueda T, Araki N, Naka N, Nakanishi H, Kuratsu S. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy with high-dose ifosfamide, doxorubicin, cisplatin and high-dose methotrexate in non-metastatic osteosarcoma of the extremities: a phase II trial in Japan. *J Chemother*. 2013;25(1):41–8
40. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Egeler RM. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer*. 2011;47(16):2431–45.
41. Ferrari S, Ruggieri P, Cefalo G, Tamburini A, Capanna R, Fagioli F, Alberghini M. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-1. *J Clin Oncol JCO* 2011. 2012.
42. Marina N, Smeland S, Bielack S, et al. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to pre-operative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomized, phase 3, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(10): 1396–408.
43. Marina N, Smeland S, Bielack SS, Bernstein M, Jovic G, Hook JM, Teot L. MAPIE vs MAP as postoperative *Rheumatol Ther* (2017) 4:25–43 39 chemotherapy in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly-diagnosed osteosarcoma: results from EURAMOS-1 (Paper 032). 2014.
44. 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.

45. Gangireddy M, Nookala V. Ifosfamide. [Updated 2019 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542169/>
46. Sannu A, Radha R, Mathews A, Padmakumari Mony R, Prahladan A, James FV. Ifosfamide-Induced Malignancy of Ureter and Bladder. *Cureus*. 2017;9(8):e1594
47. Voelcker G. Influence of the alkylating function of aldo-Ifosfamide on the anti-tumor activity. *Anticancer Drugs*. 2018;29(1):75-79
48. Ifosfamide Pathway, Pharmacodynamics Overview
<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA2038>
49. Dechant KL, Brogden RN, Pilkington T, Faulds D. Ifosfamide/mesna. A review of its antineoplastic activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cancer. *Drugs*. 1991;42(3):428-67.
50. Kerbusch T, de Kraker J, Keizer HJ, van Putten JW, Groen HJ, Jansen RL, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ifosfamide and its metabolites. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(1):41-62
51. Klastersky J. Side effects of ifosfamide. *Oncology*. 2003;65 Suppl 2:7-10
52. Dupuis LL, Boodhan S, Holdsworth M, Robinson PD, Hain R, Portwine C, O'Shaughnessy E, Sung L., Pediatric Oncology Group of Ontario. Guideline for the prevention of acute nausea and vomiting due to antineoplastic medication in pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(7):1073-82
53. Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J. Clin. Oncol*. 2005;23(30):7685-96.
54. Miser JS, Kinsella TJ, Triche TJ, et al. Ifosfamide with mesna uroprotection and etoposide: an effective regimen in the treatment of recurrent sarcomas and other tumors of children and young adults. *J Clin Oncol*. 1987;5:1191–1198
55. Kung FH, Pratt CB, Vega RA, et al. Ifosfamide/etoposide combination in the treatment of recurrent malignant solid tumors of childhood. A Pediatric Oncology Group Phase II study. *Cancer*. 1993;71:1898–1903.

56. Fan XL, Cai GP, Zhu LL, Ding GM. Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5925–5932. Published 2015 Nov 4. doi:10.2147/DDDT.S91217
57. Anderson PM, McConnell K. Mifamurtide in osteosarcoma--a practical review. *Drugs of Today.* 2010; 46(5):327-337
58. Meyers PA. Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(8):1035–49.
59. Lascelles BD, et al. Improved survival associated with postoperative wound infection in dogs treated with limb-salvage surgery for osteosarcoma. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(12):1073–83.
60. Jeys LM, et al. Post operative infection and increased survival in osteosarcoma patients: are they associated? *Ann Surg Oncol.* 2007;14(10):2887–95.
61. Moore C, et al. Prognostic significance of early lymphocyte recovery in pediatric osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(6):1096–102.
62. Cluett J. What is Bone Cement? Available at: <http://orthopedics.about.com/b/2008/05/18/what-is-bone-cement.htm>
63. Chow L, Eanes ED, Kerger; Basel: (Octacalcium phosphate). *Monogr Oral Sci.* 2001; 18:148–163.
64. 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.
65. 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.
66. Liu BM, Li M, Yin BS, et al. Effects of incorporating carboxymethyl chitosan into PMMA bone cement containing methotrexate. *PLoS One.* 2015;10:e0144407.
67. 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.

68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 04/23/2017
Toplantı Tarihi : 26 Aralık 2017

Sayın, Prof.Dr.Hatice Nur OLGUN
DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

39/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğu "Kemik Kanserlerinde Kullanılan Kemo-İmmunoterapinin ve Graft Materyallerinin Mikroçevre İlişkisi" isimli; Safiye Aktaş, Hasan Havıtcıoğlu, Osman Yılmaz, H.Efsun Kolatan, Ömer Bekçioğlu, Pınar Erçetin, Ali İhsan Kılıç, Melek Aydın'ın araştırmacı olduğu 35 adet Balb-c'nin verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede, gönderilen belgeler incelenerek, protokol değişikliği bilgi edinilmiştir. İstenilen farklı soyda yeni hayvan talebi için yeni başvuru yapılması gereklidir.

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	Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Prof.Dr.Gülşin OKTAY	Prof.Dr.Günay KIRKIM
Prof.Dr.Tarkan ERTAY	Prof.Dr.Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU
Prof.Dr.Nergiz DIRMUS	Prof.Dr.Zehiye Sultan ALTUN
Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye (Topl.Katılmadı)	Doç.Dr.Orhan KALEMCİ Üye(Topl.Katılmadı)
Zehra KINAM Üye	Vet.Hekim Adnan SERPEN

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 11/03/2018
Toplantı Tarihi : 06 Şubat 2018

Sayın, Prof.Dr.Hatice Nur OLGUN
DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

10/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Kemik Kanserlerinde Kullanılan kemo-immunoterapinin ve greft materyallerinin mikroçevre ilişkisi" isimli; Nur Olgun, Safiye Aktaş, Hasan Havıçoğlu, Osman Yılmaz, Efsun Kolatan'ın araştırmacı olduğu, 28 adet Nude Mice adet verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

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.Gülşün OKTAY
Üye (Topl.Katılmadı)

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

Prof.Dr. Tünel ERTAY

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU

Prof.Dr. Nermin BURMUŞ

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye(Topl.Katılmadı)

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

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin proje başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-2: Özgeçmiş

ÖMER BEKÇİOĞLU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

Web Adresi

Öğrenim Bilgileri

01 Mart 2017 - Şu Anda (3 yıl 1 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.87 / 4.0

01 Eylül 2013 - 01 Ocak 2016 (2 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BIYOMEKANİK (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Yeni Bir Ayak Bileği Protezinin Geliştirilerek Biyomekanik Özelliklerinin
İncelenmesi Ve Optimizasyonu
Tez Konusu: Ayak Bileği Protez Tasarımı
Tarih: 2015
Tez Danışmanı: HASAN HAVİTÇİOĞLU

01 Eylül 2013 - 01 Haziran 2018 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, FİZİK BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

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

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Teknik Bilimler -- Makina Mühendisliği -- Mekanik -- Biyomekanik

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- İç Hastalıkları -- Onkoloji

Teknik Bilimler -- Kimya Mühendisliği ve Teknolojisi -- Biyoteknoloji -- Doku
Mühendisliği

Temel Bilimler -- Fizik -- Yoğun Madde 2:Elektronik Yapı, Elektrik, Manyetik ve
Optik Özellikler -- Manyetik özellikler ve malzemeler

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

B. BARAN, N. MERT ÖZÜPEK, N. YERLİ, E. ACAR, Ö. BEKÇİOĞLU & Y. BASKIN, Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature, GASTROENTEROLOGY RESEARCH, 2018, 1918-2813, 11, 4, 264-273.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, M. ÇALIŞIR, Ö. BEKÇİOĞLU, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Mesenchymal Stem Cell and Cisplatin Interference in Neuroblastoma Experimental Animal Model, PEDIATRIC BLOOD & CANCER, 2018, 1545-5009, 65, 2, 271-271.

Bildiriler

Ö. BEKÇİOĞLU, S. AKTAŞ, P. E. ÖZDEMİR, M. AYDIN, H. E. KOLATAN, A. İ. KILIÇ, H. HAVİTÇİOĞLU, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Examining Microenvironment In Osteosarcoma: Bone Graft Material Cement Does Not Interfere With Chemo And Immunotherapy In Osteosarcoma, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kanser Araştırm& 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. BEKÇİOĞLU, H. E. KOLATAN, Ö. GÖKBAYRAK, A. EROL, O. YILMAZ, Z. ALTUN & S. AKTAŞ, Ksenograft Farede Kanser Modellenmesinin Optimizasyonu, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma&1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

Ö. BEKÇİOĞLU, Kemik Kanserlerinde Kullanılan Kemo-immunoterapinin Ve Greft Materyallerinin Mikroçevre İlişkisi, Poster Sunumu, 1. Temel Onkoloji Sempozyumu, 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

Ö. BEKÇİOĞLU, S. AKTAŞ, M. AYDIN, P. E. ÖZDEMİR, H. E. KOLATAN, A. İ. KILIÇ, H. HAVİTÇİOĞLU, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Kemik Kanserlerinde Kullanılan Kemo-İmmünotrepinin ve Greft Materyallerinin Mikroçevre İlişkisi , Poster Sunumu, 1.Temel Onkoloji Sempozyumu , 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

S. AKTAŞ, A. P. E. ÖZDEMİR, M. AYDIN & Ö. BEKÇİOĞLU, Nöroblastom Deney Hayvani Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Ve Sisplatin Etkileşiminin Değerlendirilmesi, Sözlü Sunum, 1.temel Onkoloji? Sempozyumu, 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

Patentler

Elektromekanik Düşük Ayak Ortezi, Ortez-protez, Patent Başvurusu, Ulusal, Başvuru No: 2018.02BBF, 31 Ocak 2018

Yayımlar

5. Onkolojide Araştırma Uygulamaları Kursu, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 05 Nisan 2019.

1. Temel Onkoloji Sempozyumu, DÜZENLENEN ÇALIŞTAY, Ulusal, 09 Mayıs 2018 - 11 Mayıs 2018.

Şirketler

STARTUP ŞİRKET, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 06 Ekim 2015.