

## İfosfamid ve Mifamurtid yüklenmiş Sementin Osteosarkom Hücrelerinin Canlılığına Etkisi

### The Effect of Ifosfamide and Mifamurtide Loaded Cement on The Viability of Osteosarcoma Cells

Ömer Bekçioğlu<sup>✉</sup>, Safiye Aktas<sup>✉</sup>, Melek Aydın<sup>✉</sup>, Nur Olgun<sup>✉</sup>

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü

Geliş / Received: 30.08.2021 Kabul / Accepted: 18.11.2021 Online Yayın / Published Online: 16.12.2021

Cite as: Bekçioğlu Ö., Aktas S., Aydın M., Olgun N. İfosfamid ve Mifamurtid Yüklenmiş Sementin Osteosarkom Hücrelerinin Canlılığına Etkisi  
 Turk J Hip Surg 2021;1(3):90-5

#### Öz

**Amaç:** Osteosarkom tedavisinde kullanılan neo-adjuvan kemoterapilerin olumlu sonuçlarına karşın, post-operatif gelişen rekürrensler ortak bir sorun olarak varlığını korumaktadır. Post-operatif hastalarda, rekürrensi önleyecek ve sistemik kemoterapi uygulamasının dezavantajlarını ortadan kaldıracak yeni yaklaşım arayışları önem taşımaktadır. Çalışmanın amacı in vitro olarak sement içine emdirilmiş kemoterapötik (ifosfamid) ve immunoterapötik (mifamurtid) ajanların, osteosarkom hücre hattı olan K7M2 canlılığı üzerine etkilerini incelemektir.

**Yöntem:** K7M2 osteosarkom hücre hattı kültüre edilip, sonrasında hücreler tutunup %70 konfluent hale geldiğinde; hücrelerin kaybedilmemesine dikkat edilerek üst fazlar uzaklaştırılmıştır. İfosfamidin (10 ug/ml, 20 ug/ml, 40 ug/ml) ve mifamurtidin (0,25 ug/ml, 0,5 ug/ml, 1 ug/ml) farklı dozları, tek başına ve sement ile birlikte mononükleer hücreler ile ko-kültür yapılarak verilmiştir. Kontrol grubu olarak sadece sement uygulaması yapılmıştır. Plate, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C inkübatörde, 24 saat ve 48 saatlik periyotlarla inkübasyona bırakılmış ve sonrasında WST ile hücre canlılığı tayini yapılmıştır.

**Bulgular:** 24. saatte, sement içerisinde lokal ifosfamid ve mifamurtid uygulamasının; osteosarkom hücrelerinde sementsiz olarak sadece ilaçların kullanımına kıyasla daha fazla sitotoksik etkiye yol açtığı saptanmıştır. 48. saatte mifamurtidinde artmış etki görülürken; ifosfamid art, sement grubunda tek başına ifosfamid grubuna göre saptanamadı.

**Sonuç:** Bulgularımız, kemik çimentosu içinde lokal ifosfamid ve mifamurtid uygulamasının; cerrahi uygulama sonrası osteosarkomun lokal nüksünü önlemede eksizyon cerrahileri sonucu oluşan kemik defektlerini doldururken etkili olabileceğini desteklemektedir. Postoperatif biyomalzemeler içinde lokal tedavi, direkt ve mikro-çevre ile etkileşerek osteosarkomda rekürrensi önlemede tedavi seçeneği olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Osteosarkom, mifamurtid, ifosfamid, sement

#### ABSTRACT

**Purpose:** Despite the good results of neoadjuvant chemotherapy used in the treatment of osteosarcoma, post-operative recurrences continue to be a common problem. It is important to seek new approaches to prevent recurrence in post-operative patients and to eliminate the disadvantages of systemic chemotherapy. The study aims to examine the effects of chemotherapeutic (ifosfamide) and immunotherapeutic (mifamurtide) agents, which are adsorbed into cementum in vitro, on the viability of the osteosarcoma cell line K7M2.

**Methods:** After the K7M2 osteosarcoma cell line was cultured, the cells were adhered to and became 70% confluent, and the supernatants were removed, taking care not to lose the cells. Different doses of ifosfamide (10 ug/ml, 20 ug/ml, 40 ug/ml) alone and with cement; Different doses of mifamurtide (0.25 ug/ml, 0.5 ug/ml, 1 ug/ml) were given by co-culture with mononuclear cells alone and with cement. Cement was used as the control group. Cell viability was determined by WST after the plate was placed in a 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator for 24 hours and 48 hours.

**Results:** It was determined that ifosfamide and mifamurtide in cementum were released into the environment compared to the agent alone, causing more cytotoxic effects in osteosarcoma cells at 24 hours. While an increased effect at 48 hours was observed in mifamurtide, it was not detected in the ifosfamide plus cement group compared to the ifosfamide group alone.

**Conclusion:** Our findings support that local application of ifosfamide and mifamurtide in bone cement may be effective in preventing local recurrence of osteosarcoma after surgery; while filling bone defects resulting from excision surgeries. Among post-operative biomaterials, local therapy may be an additive treatment option in preventing recurrence in osteosarcoma by interacting directly and with the microenvironment.

**Keywords:** Osteosarcoma, mifamurtide, ifosfamide, cement

#### Sorumlu Yazar / Corresponding Author:

Ömer Bekçioğlu ✉ [omerbekcioglu35@gmail.com](mailto:omerbekcioglu35@gmail.com)

Ö. Bekçioğlu  
S. Aktas

0000-0003-2423-0161  
0000-0002-7658-5565

M. Aydın  
N. Olgun

0000-0002-9009-2433  
0000-0001-9591-0207

## GİRİŞ

Osteosarkomlar nadir görülen, katı, kötü huylu kemik tümörleridir. Kemik oluşturan hücrelerin malign transformasyonu sonucu ortaya çıkarlar.<sup>(1)</sup> Direkt olarak kemik dokusu kaynaklı olduklarından, primer kemik tümörleri olarak da adlandırılır. Osteosarkomlar ilk olarak kemik ve ilikte görülür ancak sıklıkla ilerler ve bağ, kas, yağ ve sinir dokularına da invaze olurlar. Kemoterapötik tedavi planlamalarında tümör ve çevresi bir arada göz önüne alınmaktadır.<sup>(2,3)</sup>

Osteosarkom tedavisinde iyi bilinen etkinliğe sahip dört kemoterapötik ajan vardır: Doksorubisin, sisplatin, lökovorin ile yüksek doz metotreksat ve ifosfamid.<sup>(4-6)</sup> Yüksek dereceli, metastatik olmayan osteosarkom hastalarının % 60-70'inde bu ajanlardan üç veya dördünün kullanımı ile; neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi rejimleri sonrasında uzun süreli, hastaliksız sağkalım sağlanmaktadır<sup>(7)</sup>. Standart kemoterapinin yanı sıra; çeşitli çalışmaların, çok etkenli kemoterapinin biyolojik cevap modifikatörlerinin ve immün aktivatörlerle kombinasyonun sağladığı ek tedavi faydaları da önerilmektedir<sup>(8,9)</sup>.

Bir immüno-adjuvan terapi olan mifamurtid, osteosarkomda son zamanlarda gelişen terapötik ilerlemelerdendir. Mifamurtid ile aktive olan monositler ve makrofajlar, serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 düzeylerinde artışı ve diğer bağışıklık hücrelerinin etkilenmesini sağlarlar. Yukarıda belirtildiği gibi, bu sitokinler, kemik mikro çevresi içindeki normal ve patolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir. Aynı zamanda farelerle yapılan çalışmalar sonucu; IL-6'nın osteosarkomun gelişiminde hız sınırlayıcı rol oynadığı bulunmuştur.<sup>(10,11)</sup>

Ifosfamid (IFS), bir DNA-alkilleyici ajan ve siklofosfamidin bir yapısal analogudur. Ön ilaç olarak davranır ve metabolizması ağırlıklı olarak hepatositlerde bulunan CYP3A4 ve CYP2B6 enzimleri ile düzenlenir.<sup>(12,13)</sup>

Polimetil metakrilat (PMMA) kemik çimentosu olarak adlandırılır ve çeşitli ortopedi ve travma cerrahilerinde implant fiksasyonu için yaygın olarak kullanılır. PMMA, iki steril bileşenin karıştırılmasıyla oluşturulan bir akrilik polimerdir. Sıvı haldeki bileşen MMA monomerken, 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 reaksiyona bağlı olarak ısı üretilir.<sup>(14,15)</sup>

Sement 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.

Bu çalışmanın amacı; ifosfamid ve mifamurtidin sement içine emdirilerek hazırlanmış formunun, osteosarkom hücrelerine olan canlılık etkisini araştırmaktır. Salınım ve antitümör etkisinin saptanması, tümör cerrahisi sonrası ilaç karıştırılmış sementin lokal uygulanmasının rekürrensi önlemede mikro-çevre ile ilişkisini anlamamız için öncü bulgu olacaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

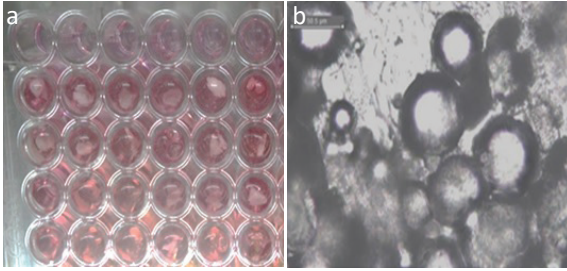
### Hücre Kültürü

Osteosarkom K7M2 hücreleri (BALB/c farelerinin akciğer metastazındaki K7 hücrelerinden)<sup>(16)</sup>, %10 fetal bovin serum (FBS) içeren DMEM ortamında (%1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisinli) kültüre edildikten sonra; 37°C, %5 CO<sub>2</sub> koşulları sağlayan inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler yaklaşık 2x10<sup>6</sup> 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. Hücrelerin tutunduğu görüldükten sonra hücrelerin kalkmamasına dikkat edilerek üst fazlar uzaklaştırılmış, ifosfamidin (10 ug/ml, 20 ug/ml, 40 ug/ml) ve mifamurtidin (0,25 ug/ml, 0,5 ug/ml, 1 ug/ml) farklı dozları tek başına ve sement ile birlikte verilmiştir. Plate, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra WST ile hücre canlılığı tayini yapılmıştır. Kontrol olarak ajan eklenmemiş, medium emdirilen sement kullanılmıştır.

### Sement Hazırlığı

Hücre, kültüründe 3 milimetre çapında küçük parçalar halinde kullanılacağından; sıvı bileşen (MMA monomer) ve katı haldeki bileşenin (güçlendirilmiş bir MMA stiren kopolimer toz [Biomet Bone Cement]) her biri 1/100 oranında kullanılmıştır. Her bir kuyucu-

ğa eklenecek ilaç miktarı hesaplanarak 6 kuyucuk için 100 mikrolitre ilaç sıvı ve katı fazlarla medium içinde karıştırılmış, hızla 3 milimetre çaplı uzun silindir hazırlanarak 3 milimetrelik aralıklarla steril bistüri ile 6 parçaya kesilmiş ve her biri katılaştıktan sonra bir kuyucuğa yerleştirilmiştir (Resim 1a). Sement ile karıştırılan ajan, sement sertleştikten sonra kuyucuklara konmuş ve ayrı bir ajan eklenmemiştir. Hücre canlılığına etkisi, sementsiz olarak tek başına ajanlar eklenen gruplarla karşılaştırılmıştır. İnverted mikroskopta sement içi sıvı içeren ortalama 50 mikrometre çapında porlar gözlemlenmiştir (Resim 1b).



Resim 1.

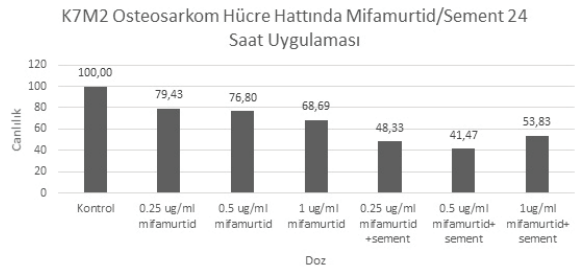
### Hücre Canlılık Testi

WST-1 (Sigma Aldrich) ile hücre proliferasyonunun tayini için, hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu plate içinden boş bir kuyucuğa yalnızca ortam konularak kör olarak kullanılmıştır. 100 µl/kuyucuk hücre için her kuyucuğa 10 µl/kuyucuk WST-1 hücre proliferasyon reaktifi eklenmiştir (1:10 dilüsyon). Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Plate çalkalayıcıda bir dakika çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 420- 480 nanometrede okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 600 nanometreden fazlası (630 nm) seçilmiştir. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edilip diğer absorbanslar ile karşılaştırılarak hücre canlılık yüzdeleri tayin edilmiştir.

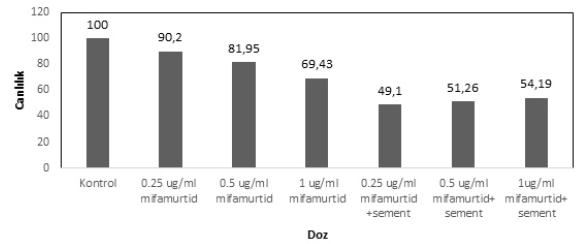
## BULGULAR

### WST-1 ile *in vitro* Proliferasyon Bulguları:

In vitro olarak K7M2 osteosarkom hücrelerine 24 ve 48 saatlik periyotlarda mifamurtid emdirilmiş sement uygulandığında, tek başına aynı dozlarda (0.25,0.5, 1µg) mifamurtid uygulanmasına kıyasla daha fazla sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 1-2).

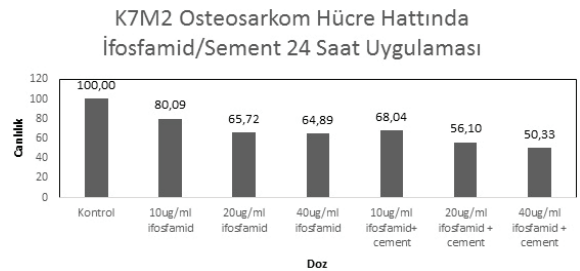


Şekil 1: In vitro mifamurtid ve sementin 24 saatlik uygulamasının K7M2 hücrelerinin canlılığına etkisi

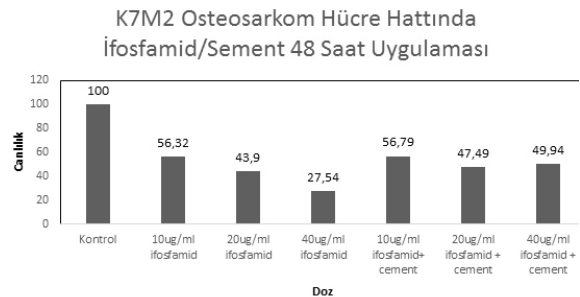


Şekil 2: In vitro mifamurtid ve sementin 48 saatlik uygulamasının K7M2 hücrelerinin canlılığına etkisi

In vitro olarak K7M2 osteosarkom hücrelerine 24 saat ifosfamid emdirilmiş sement uygulandığında, tek başına ifosfamid uygulanmasına kıyasla her üç dozda da (10-20-40 µg) daha fazla sitotoksik etki görülmüştür. Fakat bu etki 48. saatte saptanmamıştır (Şekil 3-4).



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



Şekil 4: In vitro ifosfamid ve sementin 48 saatlik uygulamasının K7M2 hücrelerinin canlılığına etkisi

## TARTIŞMA

Proksimal femur da dahil olmak üzere, uzun kemiklerin osteosarkomlarının tedavisinde geniş kemik eksizyonlarına ikincil oluşan defektler çoğu zaman akut olarak sementle doldurulur.<sup>(17)</sup> Fakat geniş rezeksiyonlar ve sistemik kemoterapilere rağmen lokal nüksler görülmektedir. Bu yüzden antineoplastik ilaçla yüklü kemik çimentosu uygulaması lokal salınımla lokal nüksleri engellerken, oluşan defektleri de doldurup internal fiksasyon implantlarının gücünü artırarak ikili fayda sağlayabilir.

Osteosarkom tedavisinde kullanılan neoadjuvan kemoterapilerin uygulanması sonucunda klinik tedavi başarısında belirgin bir iyileşme görülmüştür. Buna karşın postoperatif gelişen rekürrensler ortak bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bu nedenle postoperatif hastalarda rekürrensi önleyecek ve sistemik kemoterapi uygulamasının dezavantajını ortadan kaldıracak yeni yaklaşımlar arayışları önem taşımaktadır. Bu amaçla farklı ilaçların, taşıyıcı malzemeler içerisinde lokal olarak uygulanması üzerine çalışmalar yapılmaktadır.<sup>(18,19)</sup>

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.<sup>(20)</sup> 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 anti-neoplastik ilaçların kemik çimentosundan salınabildiği ve tümör hücreleri üzerine inhibitör bir etki yaptıkları bildirilmiştir.<sup>(21)</sup> Biz de yaptığımız bu çalışmada, 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 salınım süresini uzattığını ve kemiğe entegrasyonu daha başarılı bir şekilde sağladığını bildirmişlerdir.<sup>(22)</sup>

Kemik çimentosu içerisine metotreksat uygulayarak SaOS 2 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 anlamlı şekilde azaldığı ve bir haftanın sonunda neredeyse hiç görülmediğini bildirmişlerdir<sup>(23)</sup>. Metotreksatın kemik çimentosuyla meme kanseri hücrelerine uygulandığı çalışmalarda, Maccauro ve ark. da ilaç salınımının ilk gün en fazla olduğunu, zaman içerisinde azaldığını bildirmişler; ayrıca çalışmalarına ekledikleri biyomekanik testler ile eklenmiş olan metotreksatın kemik çimentosunun kompresif direncini azaltmadığını ortaya koymuşlardır.<sup>(24)</sup>

Özben ve ark. cisplatin ekledikleri kemik çimentosunun hem mekanik özelliklerine hem de *in vitro* osteosarkom hücreleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Doza bağlı olarak 15. güne kadar etki görülmüş, çimentoğun gücünde de azalma saptanmamıştır. Bu araştırmanın bizim çalışmamızdan farklı olan tek özelliği ise, cisplatin uygulanan bir kontrol grubunun olmamasıdır.<sup>(18)</sup>

Fare osteosarkom modeli ile yapılan bir diğer çalışmada, osteoblast apoptozunu arttıran kadmiyum yüklenmiş kemik çimentosu uygulanan intralezyonel eksizyon grubunda, lokal nüksün sadece çimento uygulanan intralezyonel eksizyon veya geniş eksizyon yapılan gruplara göre daha az olduğu bildirilmiştir.<sup>(25)</sup>

Ifosfamidin tümör hücrelerine etki mekanizması, DNA'nın iki sarmalını çapraz alkilleyerek ve DNA sarmalının ayrılmasını engelleyerek replikasyonu önler. Tümör hücreleri normal hücrelere göre daha hızlı çoğaldıklarından, hücrelerde bu etki de daha fazla görülmektedir. Diğer mekanizma ise hücre içi glu-

tathion seviyelerinin düşürülmesiyle, glutathionun DNA koruyucu özelliğinin kaybolmasıdır. Üçüncü mekanizma, acrolein sayesinde DNA'nın tek sarmalında kırılmalar oluşturmaktadır.<sup>(26)</sup>

İfosfamid, osteosarkomda en yüksek tek-ajan aktivitesine sahip gruptadır ve nüks vakalarda yüksek doz kullanımını (etkisi doza bağlı olduğundan) ilk sırada öneren çalışmalar mevcuttur.<sup>(27,28)</sup> Mifamurtid ise proinflatuar sitokinleri salgılatarak tümör hücrelerine sitotoksite gösterir. Aynı zamanda yapılan klinik çalışmalarda metastaz riskini azalttığı da gösterilmiştir.<sup>(29,30)</sup>

İfosfamidin, lipid core nano kapsül veya PLGA-dekstran gibi lokal taşıyıcılarla kullanıldığında daha fazla lokal konsantrasyon sağladığı, böylece *in vitro* olarak osteosarkom hücrelerine daha fazla sitotoksite gösterdiği bulunmuştur.<sup>(31)</sup> Yaptığımız çalışmada bu veriler 24. saatte sağlanırken, 48. saatte sağlanmadı. Çimentodaki porların çapı, çimentonun yüzey alanı gibi faktörlerin bunun üzerinde etken olduğu düşünülmektedir.

Mifamurtidin lipozomal lokal taşıyıcılarla kullanılarak hasta bölgelerdeki konsantrasyonunun artırılmasının amaçlanması şeklinde yapılan araştırmalar da mevcuttur.<sup>(32)</sup>

Biz de başarılı literatür sonuçları doğrultusunda PMMA kemik çimentosu ile birlikte kemoterapötik ve immünoterapötik ajan kullanımının lokal etkisini araştırmayı amaçladık.

Araştırmanın kısıtlılıkları arasında *in vitro* hücre kültüründe yalnızca tümör hücreleri üretilmesi sebebiyle mifamurtidin immün hücrelerle etkileşiminin araştırmada yer almaması bulunmaktadır.

Ayrıca, yükleme yapılan çimentonun mekanik gücüne bakılmaması ve uygulamanın *in vivo* 'denek' ile yapılmamış olması da araştırmanın kısıtlılıkları arasında sayılabilir. Son olarak, sadece ajan veya sadece çimento kullanılan kontrol grupları olmasına karşın çimentodan kemoterapötiklerin salınım kinetiği ölçülmemiştir.

Çalışmamızda uyguladığımız yöntem ile osteosarkomun klinikte yapılan cerrahi rezeksiyonu sonrasında

immünoterapötik ve kemoterapötik ajan ile hazırlanmış kemik çimentosu uygulamasının bir tedavi seçeneği olabileceği gözlenmiştir. Bir sonraki çalışmamızda deney hayvanı osteosarkom modelinde *in vivo* olarak sement içerisinde emdirilmiş ajanların reaksiyon sonrası etkilerini araştırmayı planladık.

## REFERANSLAR

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. <https://doi.org/10.3390/cancers5020591>
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. Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol*, 2014;16C:15-23. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.02.002>
4. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand. *Eur J Cancer*. 2011;47:2431-2445. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.05.030>
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. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.827171>
6. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, et al. Osteosarcoma: the addition of romidepsin to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2008;26:633–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.14.0095>
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. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq223>
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. <https://doi.org/10.1023/a:1008391103132>
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. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s5688>
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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090795>
12. Kumar MK, Shah MH, Ketkar A, et al. Effect of drug solubility and different excipients on floating behaviour and release from glyceryl monooleate matrices. *Int J Pharm*. 2004;272:151–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.025>

13. Tricker WJ, Nagvekar AA, Dash AK. A novel nanoparticle formulation for sustained paclitaxel delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9:486–93. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9063-7>
14. Kuhn KD. Bone cement. Berlin: Springer; 2000, p. 38.
15. He S, Scott C, Higham P. Mixing of acrylic bone cement: effect of oxygen on setting properties. *Biomaterials*. 2003 Dec;24(27):5045-8. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00406-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00406-x)
16. Mohseny AB, Hogendoorn PC, Cleton-Jansen AM. Osteosarcoma models: from cell lines to zebrafish. *Sarcoma*. 2012;2012:417271. <https://doi.org/10.1155/2012/417271>
17. Villemagne T, Bonnard C, Accadbled F, L'kaissi M, de Billy B, Sales de Gauzy J. Intercalary segmental reconstruction of long bones after malignant bone tumor resection using primary methyl methacrylate cement spacer interposition and secondary bone grafting: the induced membrane technique. *J Pediatr Orthop*. 2011 Jul-Aug;31(5):570-6. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e31821ffa82>
18. Özben H, Eralp L, Baysal G, Cort A, Sarkalkan N, Özben T. Cisplatin loaded PMMA: mechanical properties, surface analysis and effects on Saos-2 cell culture. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2013;47(3):184-92. <https://doi.org/10.3944/aott.2013.2828>
19. Rosa MA, Maccauro G, Sgambato A, Ardito R, Falcone G, De Santis V, Muratori F. Acrylic cement added with antitumorals in the treatment of bone metastases. Ultrastructural and *in vitro* analysis. *J Bone Joint Surg Br*. 2003 Jul;85(5):712-6.
20. 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.
21. 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. <https://doi.org/10.1080/17434440.2018.1456336>
22. Liu BM, Li M, Yin BS, et al. Effects of incorporating carboxymethyl chitosan into PMMA bone cement containing methotrexate. *PLoS One*. 2015;10:e0144407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144407>
23. 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. <https://doi.org/10.1007/s002640100293>
24. 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. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0036-7>
25. Demirkıran ND, Aktaş S, Erçetin Özdemir AP, Bekçioğlu Ö, Aydın M, Havıtcıoğlu H. Cadmium in bone cement induces necrosis and decreases the viability of residual osteosarcoma cells: A xenograft study. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2020 Jul;54(4):445-452. <https://doi.org/10.5152/j.aott.2020.20247>
26. 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 Jan;40(1):41-62. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140010-00004>
27. Chou AJ, Geller DS, Gorlick R. Therapy for osteosarcoma: where do we go from here? *Paediatr Drugs*. 2008;10(5):315-27. <https://doi.org/10.2165/00148581-200810050-00005>
28. Palmerini E, Setola E, Grignani G, D'Ambrosio L, Comandone A, Righi A, Longhi A, Cesari M, Paioli A, Hakim R, Pierini M, Marchesi E, Vanel D, Pignochino Y, Donati DM, Picci P, Ferrari S. High dose ifosfamide in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma patients: a retrospective series. *Cells*. 2020 Oct 31;9(11):2389. <https://doi.org/10.3390/cells9112389>
29. Múdry P, Kyr M, Rohleder O, Mahdal M, Staniczková Zambó I, Ježová M, Tomáš T, Štěrba J. Improved osteosarcoma survival with addition of mifamurtide to conventional chemotherapy - Observational prospective single institution analysis. *J Bone Oncol*. 2021 Apr 7;28:100362. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2021.100362>
30. Taçyıldız N, Unal E, Dinçaslan H, Çakmak HM, Köse K, Tanrıyıldız G, Kartal Ö. Muramyl Tripeptide Plus Chemotherapy Reduces Metastasis in Non-Metastatic Osteosarcoma: A Single-Center Experience. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020 Mar 1;21(3):715-720. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.3.715>
31. Chen B, Yang JZ, Li-Feng Wang LF, Zhang YJ, Lin XL. Ifosfamide-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA-dextran polymeric nanoparticles to improve the antitumor efficacy in osteosarcoma. *BMC Cancer*. 2015 Oct 21;15:752. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1735-6>
32. Signorell RD, Luciani P, Brambilla D, Leroux JC. Pharmacokinetics of lipid-drug conjugates loaded into liposomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018 Jul;128:188-199. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.04.003>