

İnsan Dil Kanseri Hücrelerinde Sisplatin ve Resveratrol Sinerjistik Kombinasyonu ile Parthanatos Sinyal Yolağının Aktivasyonu

Negar Taghavi POURIANAZAR
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,
İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul
negarpourianazar@aydin.edu.tr
ORCID : 0000-0003-3250-1427

ÖZET

Dil kanseri, dünya genelinde yaygın ve tedavi başarısı sınırlı bir oral kanser türüdür. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi mevcut tedavilere rağmen, yüksek invazyon ve metastaz oranları ile kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç, hastaların yaşam kalitesini ve sağkalımını olumsuz etkilemektedir. Özellikle sisplatin gibi temel kemoterapötik ajanlara karşı gelişen direnç, tedavi önündeki en büyük engellerden biridir. Bu direncin üstesinden gelmek için farklı etki mekanizmalarına sahip anti-kanser ajanlarının kombinasyon halinde kullanılması kritik bir stratejidir; zira tek ilaç tedavileri sıklıkla dirençli mutasyonlara ve tümör nüksetmesine yol açabilmektedir. Sisplatin, DNA hasarı ve apoptoz indüksiyonu yoluyla etki gösteren güçlü bir kemoterapötiktir, ancak yan etkileri ve direnç gelişimi kullanımını kısıtlar. Resveratrol ise üzüm gibi bitkilerde bulunan, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip doğal bir mikrobeseindir. Çeşitli kanser türlerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktivite gösterdiği, ayrıca çoklu ilaç direncine sahip tümör hücrelerine karşı da etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun OSC-19 insan dil kanseri hücre hattı üzerindeki sinerjistik sitotoksik etkileri ve bu etkilerin moleküler düzeyde parthanatos hücre ölümü yolağı ile olan ilişkisi kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

Hücre canlılığı üzerindeki etkiler MTT testi ile değerlendirilmiş; elde edilen veriler kombinasyon tedavisinin, tekli ilaç uygulamalarına kıyasla hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde inhibe ettiğini ve güçlü bir sinerjistik sitotoksik yanıt oluşturduğunu ortaya koymuştur. Moleküler mekanizmayı aydınlatmak amacıyla, parthanatos yolağının kilit bileşenleri olan PARP-1 ve AIF genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-

PCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bulgular, kombinasyon tedavisinin PARP-1 ve AIF gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığını ve parthanatos ile ilişkili moleküler sinyallerin transkripsiyonel düzeyde uyarıldığını göstermiştir. Parthanatos, klasik apoptozdan farklı olarak PARP-1 hiperaktivasyonu ve AIF'in mitokondriden çekirdeğe translokasyonu ile karakterize edilen, kaspaz bağımsız bir hücre ölümü formudur. Bu çalışma, sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun dil kanseri hücrelerinde parthanatosu indükleyerek kemoterapi direncini kırmada ve tedavi etkinliğini artırmada yeni ve etkili bir terapötik yaklaşım olabileceğini bilimsel verilerle ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: insan dil kanseri, sisplatin, resveratrol, sinerjistik etki, PARP-1

Activation of the Parthanatos Signaling Pathway by the Synergistic Combination of Cisplatin and Resveratrol in Tongue Cancer Cells

ABSTRACT

Tongue cancer is an aggressive oral malignancy with limited treatment success due to high invasion rates and chemotherapeutic resistance. Despite conventional therapies like surgery and radiotherapy, resistance to cornerstone drugs such as cisplatin remains a major obstacle, negatively impacting patient survival. Combining anti-cancer agents with distinct mechanisms is a critical strategy to overcome resistance and prevent tumor recurrence. Cisplatin induces DNA damage and apoptosis but is limited by systemic toxicity and acquired resistance. Resveratrol, a natural polyphenol with potent anticancer and antioxidant properties, has shown efficacy against various cancers, including multidrug-resistant cells. This study comprehensively investigated the synergistic cytotoxic effects of the cisplatin and resveratrol combination on the OSC-19 human tongue cancer cell line and its molecular relationship with the parthanatos cell death pathway.

Cell viability was evaluated using the MTT assay, revealing that the combination therapy significantly inhibited proliferation compared to single-agent treatments, generating a potent synergistic response. To elucidate the molecular mechanism, mRNA expression levels of PARP-1 and AIF, key components of the parthanatos pathway, were analyzed via real-time PCR (RT-PCR). Findings demonstrated that the combination significantly increased the mRNA expression levels of PARP-1 and AIF, suggesting transcriptional upregulation of parthanatos-associated molecular signals. Distinct from classical apoptosis, parthanatos is a caspase-

independent cell death form characterized by PARP-1 hyperactivation and the translocation of AIF from the mitochondria to the nucleus. This study provides scientific evidence that the cisplatin and resveratrol combination represents a novel and effective therapeutic approach to overcoming chemotherapy resistance in tongue cancer cells by inducing parthanatos.

Keywords: human tongue cancer, cisplatin, resveratrol, synergistic effect, PARP-1

GİRİŞ

İnsanlarda dil kanseri, oral kanser türleri arasında en yaygın olanlardan biridir ve dünya sağlık yükü açısından önemli bir yer tutmaktadır (Bray et al., 2022). Bu agresif kanser türünün tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır (Mosier et al., 2025). Ancak, cerrahi tekniklerdeki ilerlemelere rağmen, bazı durumlarda dilin tamamının veya bir kısmının çıkarılması gerekebilmekte, bu da hastaların konuşma ve yutma fonksiyonlarını ciddi şekilde etkileyerek yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkilemektedir (Villaret et al., 2008). Ayrıca, son yıllarda geliştirilen ileri tedavi stratejilerine rağmen, dil kanserinin yüksek lokal invazyon ve metastaz oranları nedeniyle hastaların genel sağkalım oranları düşüktür (Balachander et al., 2022). Kemoterapi, metastazın azaltılması ve tümör büyümesinin engellenmesi gibi klinik sonuçlara yol açtığı için dil kanseri tedavisinde etkili yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir (Georges et al., 2014). Ancak, bu hastalarda sıklıkla karşılaşılan çoklu ilaç direnci, kemoterapinin etkinliğini sınırlandıran önemli bir engeldir. İlaç dirençli tümörleri tedavi etmek için temel stratejilerden biri, anti-kanser ajanlarının kombinasyon halinde kullanılmasıdır (Baguley, 2002). Tek ilaç tedavileri, kanser hücrelerinde alternatif moleküler yolları tetikleyip güçlendirerek ilaca dirençli mutasyonlara ve tümör nüksetmesine yol açabilir (He et al., 2025). Buna karşılık, anti-kanser ilaçlarla kombinasyon tedavisinin genel olarak sinerjik ilaç etkilerini indüklediği ve ilaç direncinin başlamasını engellediği gösterilmiştir (Bayat Mokhtari et al., 2017; Holoye et al., 1978; Lu et al., 2022).

Sisplatin, mesane, meme, dil ve akciğer kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda insan kanserinin tedavisinde kullanılan, iyi bilinen bir kemoterapötik ilaçtır (Dasari & Tchounwou, 2014). Sisplatinin etkisi, DNA'daki pürin bazlarıyla çapraz bağlanmaya, DNA onarım mekanizmalarına müdahale etmeye, DNA hasarına neden olmaya ve ardından kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye dayanır (Makovec, 2019; Tanida et al., 2012). Ancak, ilaç direnci ve önemli yan etkileri nedeniyle, sisplatinin diğer kanser ilaçları ile kombinasyon halinde kullanılması, birçok insan kanserinde yeni terapötik stratejiler olarak uygulanmıştır (Keke et

al., 2024; Minerva et al., 2023). Örneğin, rahim ağzı kanserinde sisplatin tedavisi, poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1)'in önemli ölçüde aşırı ekspresyonunu ve hiperaktivasyonunu göstermiştir (Kotsopoulos et al., 2016). Başka bir çalışma, insan böbrek hücrelerine sisplatin uygulandığında mitokondride biriktiğini ve mitokondriyal hasara neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna indüklediğini ve diğer sitotoksik etkileri sebep olduğunu göstermiştir (Soni et al., 2018). ROS'un artışı ve PARP-1'in aşırı aktivasyonu, yeni bir hücre ölümü formu olan parthanatos ile yakından ilişkilidir. Parthanatos, kaspaz bağımsız bir hücre ölümü mekanizması olup, PARP-1'in aşırı aktivasyonu sonucu AIF (Apoptosis-Inducing Factor)'in mitokondriden salınarak çekirdeğe translokasyonu ile karakterizedir. Bu yolak, özellikle DNA hasarına yanıt olarak aktive olur ve apoptoza dirençli hücrelerde alternatif bir ölüm mekanizması sunar (Fatokun et al., 2014).

Üzüm, çilek, erik ve yer fıstığı gibi bitkilerde bulunan resveratrol, antikanser, iltihap önleyici ve antioksidan etkileri nedeniyle dikkat çeken doğal bir mikrobeseindir (Koushki et al., 2018; Kursvietiene et al., 2023). Daha önce yapılmış in vitro ve hayvan çalışmaları, resveratrolün melanoma (Wu et al., 2015), akciğer kanseri ve prostat kanseri (Li et al., 2020; Ye et al., 2020) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine (Elshaer et al., 2018) karşı anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak resveratrolün, çoklu ilaç direncine sahip tümör hücrelerine karşı anti-proliferatif aktivitesi belirlenmiştir (Huang et al., 2014).

Çeşitli kemoterapi ilaçlarının sisplatin ile kombinasyonunun sonuçları literatürde gösterildiğine rağmen, bugüne kadar sisplatin ve resveratrol kombinasyonun dil kanser hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Ayrıca, bu ilaç kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde apoptoz yolağındaki olası değişikliği ve alt mekanizmaları inceleyen hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu makalede, öncelikle OSC-19 dil kanseri hücre hattı laboratuvarımızda kültüre edilecek ve sisplatin ve resveratrolün uygun dozu belirlenmesinden sonra hücrelere uygulayıp her bir ilacın bu hücrelerin canlılığının üzerindeki etkisi MTT testi ile araştırılacaktır. Daha sonra, hücreler sisplatin ve resveratrol kombinasyonu ile muamele edilip sinerjistik etkisi incelenmesi hedeflenmiştir. Daha sonra, parthanatos hücre ölümü ile ilgili olan seçilmiş olan gen, PARP-1 ve AIF genlerinin mRNA ifade düzeyleri üzerinden parthanatos hücre ölümü yolağını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, yeni terapötik ilaç kombinasyonu ortaya konulması amaçlanmıştır. Projemizden elde edilen veriler, bu kombinasyon tedavisinin etkili olduğu takdirde, dil kanserin kemoterapi tedavisinin önündeki, ilaç direnci

olan büyük engelle mücadele etme fırsatı sunabilecek ve hastaların tedavisine katkı sağlayacaktır.

YÖNTEM

Bu çalışmada, dil kanseri tedavisinde sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun potansiyelini değerlendirmek amacıyla in vitro deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler, OSC-19 dil kanseri hücre hattı kullanılarak yürütülmüştür.

Hücre Kültürü

OSC-19 dil kanseri hücre hattı, %10 Fetal Sığır Serum (FBS; Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin (100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin; Gibco) ile takviye edilmiş DMEM besiyerinde kültürle edilmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de T75 flasklarda muhafaza edilmiştir. %80 konfluansa ulaşıldığında, hücreler %0,25 Trypsin-EDTA (Gibco) kullanılarak pasajlanmıştır. Resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve Sisplatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok çözelti oluşturulup deneyler için kültür ortamında istenen konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

Hücre Canlılığı Testi (MTT)

Hücre canlılığı, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Mazloun-Ardakani et al., 2019). OSC-19 hücreleri $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saat sonra, hücreler 24 ve 48 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda sisplatin (0-100 µM) ve resveratrol (0-200 µM) ile tedavi edilmiştir. Tedaviden sonra, MTT reaktifi, her bir kuyucuğa 5 mg/mL eklenmiş ve hücreler 37°C'de belirli 4 saat inkübe edilmiştir. Metabolik olarak aktif hücreler tarafından MTT'nin suda çözünür formazan tuzuna indirgenmesi sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, mikropilaka okuyucu kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Referans dalga boyu olarak 620 nm kullanılmıştır. Hücre canlılığı yüzdeleri, ilaç uygulanmamış kontrol grubuna normalize edilerek hesaplanmıştır. Sisplatin ve resveratrol için doz-yanıt eğrileri oluşturulmuş ve IC₅₀ değerleri (hücre canlılığının %50 oranında inhibe edildiği konsantrasyon) belirlenmiştir.

RNA İzolasyonu ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

Toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre TRIzol reaktifi (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) kullanılarak deney gruplarından izole edilmiştir. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak belirlenmiştir. ~2,0'lık bir A₂₆₀/A₂₈₀ oranı, saf RNA'nın göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Tamamlayıcı DNA (cDNA), OneScript™ Plus cDNA Synthesis Kit (Abcam, Cambridge, İngiltere; Kat. No. G236) kullanılarak 1 µg toplam RNA'dan sentezlenmiştir. Reaksiyon, aşağıdaki koşullar altında bir termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir: 50-55°C'de 15 dakika ve 85°C'de 5 dakika.

qRT-PCR, LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, İsviçre) üzerinde 2X SYBR Green Real Time PCR Master Mix (Nepenthe, NP0401021100) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PARP1, AIF ve housekeeping geni olan GAPDH için kullanılan spesifik primerler Tablo 1'de listelenmiştir. Hedef genlerin göreceli ekspresyonu, GAPDH'yi iç kontrol olarak kullanarak $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Tüm reaksiyonlar üç kez tekrarlanmıştır (Hervieu et al., 2025).

Tablo 1. qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.

Gen	Primer Yönü	Dizi (5'-3')	Ürün Uzunluğu (bp)
PARP1	Forward	GGCGATCTTGGACCGAGTAG	20
PARP1	Reverse	CCTTTGGGGTTACCCACTCC	20
AIF	Forward	GGCTTCCTTGGTAGCGAACTGG	22
AIF	Reverse	GTCCAGTTGCTGAGGTATTCGG	22
GAPDH	Forward	GGCCAAGATCATCCCCATGACAAC	23
GAPDH	Reverse	ACCAGGACATGACAGCTTGACAAGT	24

Sinerjik Etkilerin Değerlendirilmesi

Sisplatin ve resveratrolün sinerjik antitümör etkisi, kombinasyon indeksi (CI) değerlerini belirleyen Chou-Talalay yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Chou, 2010). Tek tek ilaçlar ve bunların kombinasyonları için doz-yanıt eğrileri, hücre canlılığı verilerinden oluşturulmuştur. CI değerleri, CalcuSyn yazılımı (Biosoft, Cambridge, İngiltere) kullanılarak hesaplanmıştır; burada CI <1 sinerjiyi, CI = 1 additif etkiyi ve CI >1 antagonizmi gösterir.

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler en az üç bağımsız deney (n = 3) olarak gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama ± standart sapma (mean ± SD) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel analizler GraphPad Prism (GraphPad Software, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Veri setlerinin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda eşleştirilmemiş (unpaired) Student's t-testi uygulanmıştır. Üç veya daha fazla grubun karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanılmış ve anlamlılık saptanan durumlarda Tukey çoklu karşılaştırma post-hoc testi uygulanmıştır.

Doz-yanıt eğrileri doğrusal olmayan regresyon (non-linear regression)

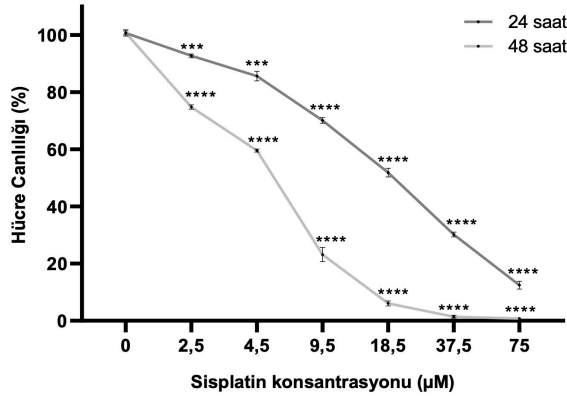
analizi ile oluşturulmuş ve IC50 değerleri bu analizden elde edilmiştir. İlaç kombinasyonlarının sinerjistik etkisi Chou–Talalay yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve kombinasyon indeksi (CI) değerleri Compusyn yazılımı ile hesaplanmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar

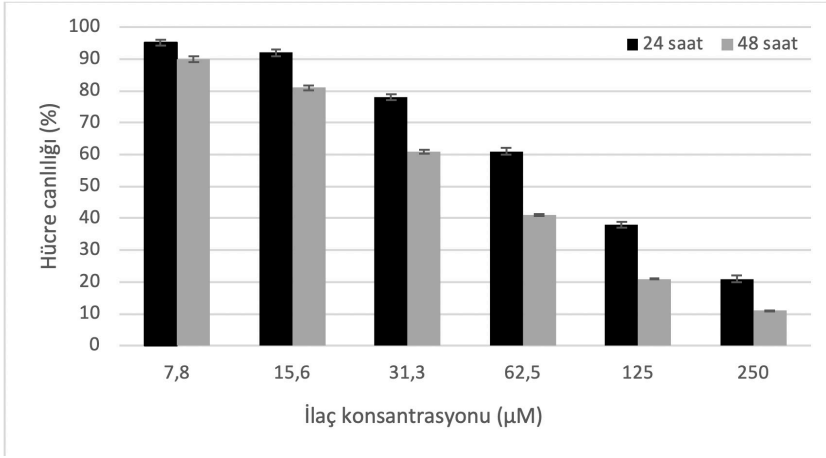
Bu çalışmada, OSC-19 dil kanseri hücre hattında sisplatin ve resveratrolün tek başına ve kombinasyon halinde hücre canlılığı ve apoptoz ile ilişkili gen ekspresyonları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen temel bulgular aşağıda özetlenmiştir:

Sisplatin ve Resveratrolün Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MTT testi sonuçlarına göre, hem sisplatin hem de resveratrolün OSC-19 hücre canlılığını doz ve zaman bağımlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir. Her iki bileşik için de 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonrasında IC50 değerleri belirlenmiştir. Sisplatin için 24 saatlik IC50 değeri 20 μM , 48 saatlik IC50 değeri 6,2 μM olarak bulunmuştur. Resveratrol için ise 24 saatlik IC50 değeri 82 μM , 48 saatlik IC50 değeri 45 μM olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, her iki ajanın da OSC-19 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. OSC-19 hücreleri üzerindeki sisplatin ilacının sitotoksik etkileri. Hücreler, 24 ve 48 saat boyunca farklı sisplatin miktarlarına maruz kaldıktan sonra MTT testi ile sitotoksik etkiler ölçülmüştür.

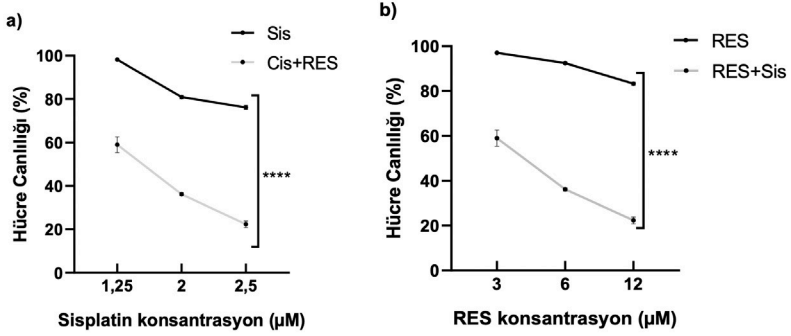


Şekil 2. OSC-19 hücreleri üzerindeki resveratrol ilacının sitotoksik etkileri. Hücreler, 24 ve 48 saat boyunca farklı resveratrol miktarlarına maruz kaldıktan sonra MTT testi ile sitotoksik etkiler ölçülmüştür.

Kombinasyon Tedavisinin Sinerjistik Etkisi

Sisplatinin resveratrol ile kombine edilmesinin OSC-19 hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu üzerindeki etkisini araştırmak için hücreleri farklı konsantrasyonda sisplatin ve resveratrol ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Tek başına tedavi edilen sisplatin veya RES ile karşılaştırıldığında, kombine gruptaki inhibitör etki, tek ilaç grubundan önemli ölçüde daha güçlü görünmektedir (Şekil 3).

MTT test verilerine göre RES ve sisplatinin olası sinerjistik etkisi Compusyn yazılımı kullanılarak CI hesaplanmıştır (Tablo 2). Tablo 2’de gösterildiği üzere, test edilen tüm sisplatin–RES kombinasyonlarında CI değerlerinin 1’in altında olduğu ve bu durumun iki ajan arasında sinerjistik bir etkileşime işaret ettiği belirlenmiştir. 1,25 µM sisplatin ile 12 µM RES kombinasyonu, yüksek etkilenen hücre fraksiyonu ($F_a \approx \%80$) ile birlikte orta düzey bir sinerji ($CI = 0,73$) oluşturmuştur. Dikkat çekici olarak, 2 µM sisplatin ve 6 µM RES kombinasyonu yaklaşık %50’lik F_a değeri ile güçlü bir sinerji ($CI = 0,52$) sergileyerek biyolojik ve farmakolojik açıdan anlamlı bir etkileşime işaret etmiştir. En düşük doz kombinasyonu olan 2,5 µM sisplatin ve 3 µM RES, daha düşük bir F_a değeri ($\approx \%29$) oluşturmasına rağmen en güçlü sinerjiyi göstermiştir ($CI = 0,34$), bu durum RES’in düşük konsantrasyonlarda dahi sisplatinin sitotoksik etkisini belirgin şekilde güçlendirebildiğini düşündürmektedir. Genel olarak elde edilen bulgular, resveratrolün OSC-19 hücrelerinde sisplatinin sitotoksik etkinliğini doza bağlı ve sinerjistik bir şekilde artırdığını ortaya koymaktadır.



Şekil 3. Sisplatin ile birleştirilen RES, OSC-19 hücrelerinin canlılığını etkili bir şekilde inhibe etmiştir. OSC-19 hücreleri 48 saat boyunca (a) 1,25, 2 ve 2,5 μM Sisplatin, (b) 3, 6 ve 12 μM RES veya her ikisi ile muamele edilip sitotoksikite MTT testi ile tespit edilmiştir (****p < 0.0001).

Tablo 2. OSC-19 hücrelerinde RES ile birleştirilmiş sisplatinin kombinasyon indeksi (CI) değerleri.

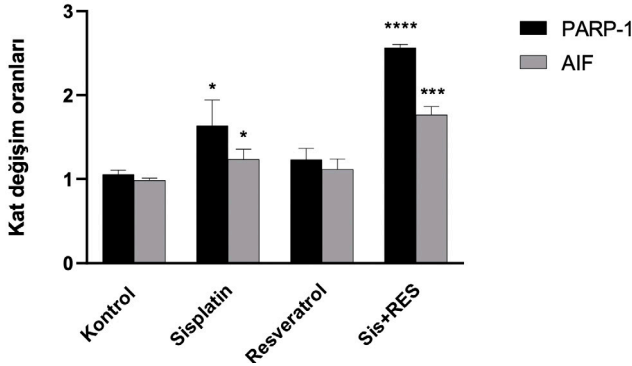
Sisplatin (μM) + RES (μM)	Fa/%	CI
1,25 + 12	80	0,73
2 + 6		
2,5 + 3		

qRT-PCR Analizi, Parthanatos ile İlişkili Genlerin Artan Ekspresyonunu Ortaya Çıkartıyor

Kombinasyon tedavisinin moleküler etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan qRT-PCR analizinde, PARP-1 ve AIF genlerinin ekspresyon seviyelerinde belirgin değişimler saptanmıştır. PARP-1, DNA hasarı yanıtında ve parthanatos hücre ölümü formunda kritik bir rol oynayan bir enzimdir. Çalışmamızda, sadece sisplatin uygulanan gruplarda PARP-1 mRNA ekspresyonunda doza bağımlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, sisplatinin DNA hasarına neden olarak PARP-1 aktivasyonunu tetiklediğini desteklemektedir. Sadece resveratrol uygulanan gruplarda PARP-1 ekspresyonunda hafif bir artış saptanmıştır. Sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun uygulandığı gruplarda ise, PARP-1 mRNA ekspresyon seviyeleri, tek başına sisplatin uygulanan gruplara kıyasla çok daha yüksek seviyelere ulaşmıştır.

AIF gen ekspresyonu incelendiğinde, kombinasyon tedavisi uygulanan gruplarda AIF mRNA düzeylerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, PARP-1 ile ilişkili hücre stres yanıtlarının transkripsiyonel düzeyde güçlenmiş olabileceğini

ve parthanatos ile ilişkili moleküler sinyallerin uyarıldığını düşündürmektedir. PARP1 proteini, hücrelerin kontrolsüz büyümesini önleyerek hücre bölünmesini düzenlemektedir. Tümör gelişimi açısından kritik olan bu genin ifadesi Sis, RES ve Sis+RES uygulanmış olan OSC-19 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmış olarak bulunmuştur (Şekil 4).



Şekil 4. İlaç uygulaması yapılmayan kontrol OSC-19 hücrelerinde ve sisplatin, RES ve sisplatin+RES ilaçları ile muamele görmüş OSC-19 hücrelerde PARP-1 ve AIF genlerinin GAPDH genine göre ekspresyon seviyesi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen bulgular, dil kanseri tedavisinde sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun potansiyelini, özellikle parthanatos hücre ölümü yolağı üzerinden ortaya koymaktadır. Kemoterapiye karşı gelişen direnç mekanizmalarının üstesinden gelme stratejileri bağlamında, bu kombinasyonun sinerjistik etkileri ve moleküler mekanizmaları büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda sisplatin ve resveratrolün OSC-19 dil kanseri hücrelerinde doz ve zaman bağımlı sitotoksik etki gösterdiği MTT testleri ile belirlenmiştir. Sisplatin için 48 saatlik IC₅₀ değeri 6,2 μ M, resveratrol için ise 45 μ M olarak saptanmıştır. Bu durum, her iki ajanın da tek başına anti-kanser potansiyeline sahip olduğunu doğrulamaktadır. Literatürde sisplatinin çeşitli kanser türlerinde DNA hasarı yoluyla apoptozu indüklediği yaygın olarak kabul edilmektedir (Makovec, 2019; Tanida et al., 2012). Benzer şekilde, resveratrolün de melanoma (Wu et al., 2015), akciğer (Li et al., 2020) ve prostat kanseri (Ye et al., 2020) gibi farklı kanser hücrelerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Elshaer et al., 2018).

Kombinasyon tedavisinin sinerjistik etkisi, bu çalışmanın en dikkat çekici bulgularından biridir. Sisplatin ve resveratrolün birlikte uygulanması, tek başına ilaçların etkilerini aşan bir hücre canlılığı azalmasına yol açmıştır. Yapılan CI analizi, test edilen tüm kombinasyonlarda ($CI < 1$) güçlü bir sinerji olduğunu kanıtlamıştır. Özellikle 2,5 μM sisplatin ve 3 μM resveratrol kombinasyonunun en güçlü sinerjiyi ($CI = 0,34$) göstermesi, resveratrolün düşük dozlarda dahi sisplatinin etkinliğini artırabildiğini ortaya koymaktadır. Bu sinerji, ilaç direncinin üstesinden gelmek için kombinasyon tedavilerinin önemini vurgulayan literatürdeki genel eğilimlerle uyumludur (Bayat Mokhtari et al., 2017; Holoye et al., 1978; Lu et al., 2022). Kanser hücreleri, tek bir kemoterapötik ajana karşı çeşitli adaptif mekanizmalar geliştirerek direnç kazanabilirken (He et al., 2025), farklı hedeflere etki eden ajanların kombinasyonu, bu adaptasyon yollarını bloke ederek veya birden fazla hücre ölüm yolağını aktive ederek direnci kırabilir.

PARP-1 ve AIF gen ekspresyon analizleri, kombinasyon tedavisinin parthanatos yolağını nasıl aktive ettiğine dair moleküler kanıtlar sunmaktadır. Sisplatinin DNA hasarı yapıcı etkisi, PARP-1 aktivasyonunu tetikleyerek parthanatos adı verilen hücre ölümü formunu indükleyebilir (Fatokun et al., 2014; Soni et al., 2018). Çalışmamızda sisplatinin PARP-1 ekspresyonunu artırması bu mekanizmayı desteklemektedir. Resveratrolün ise antioksidan özelliklerinin yanı sıra, DNA hasarını artırıcı veya onarım mekanizmalarını etkileyici rolleri de bulunmaktadır. Kombinasyon tedavisinde PARP-1 ekspresyonunun tekli uygulamalara göre çok daha yüksek seviyelere ulaşması, sisplatinin neden olduğu DNA hasarının resveratrol tarafından güçlendirildiğini veya resveratrolün PARP-1 aracılı hücre ölümü yolağını doğrudan aktive ettiğini düşündürmektedir. Bu durum, sisplatinin neden olduğu ROS oluşumunun resveratrol tarafından modüle edilmesiyle de ilişkili olabilir (Soni et al., 2018). Literatürde, ROS artışının ve PARP-1 aktivasyonunun parthanatos ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Fatokun et al., 2014).

En önemlisi, AIF ekspresyonundaki belirgin artış, parthanatos yolağının kilit bir bileşeni olan AIF'in mitokondriden salınımını ve çekirdeğe translokasyonunu işaret etmektedir. PARP-1'in aşırı aktivasyonu, NAD⁺ tükenmesine ve ATP azalmasına yol açarak mitokondriyal disfonksiyona neden olur. Bu durum, AIF'in mitokondriyal membrandan salınımını tetikler ve çekirdeğe geçişini kolaylaştırır. Çekirdekte AIF, DNA fragmentasyonuna katkıda bulunarak kaspaz bağımsız hücre ölümünü, yani parthanatosu indükler (Fatokun et al., 2014). Çalışmamızda gözlenen PARP-1 ve AIF gen ekspresyonundaki sinerjistik artış, sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun dil kanseri hücrelerinde parthanatos ile

ilişkili moleküler yanıtları transkripsiyonel düzeyde güçlendirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, parthanatos aktivasyonunun kesin olarak ortaya konulabilmesi için PARP-1 enzim aktivitesi ve AIF'in hücrel lokalizasyonunun protein düzeyinde doğrulanması gerekmektedir. Elde edilen bulgular, özellikle apoptoza dirençli kanser hücrelerinde alternatif hücre ölümü mekanizmalarının potansiyel olarak hedeflenebileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışma, dil kanseri tedavisinde sisplatin ve resveratrol kombinasyonunun yeni bir terapötik strateji olarak değerlendirilmesi gerektiğini önermektedir. Elde edilen sinerjistik sitotoksik etki ve PARP-1 ile AIF ekspresyonundaki artış, bu kombinasyonun ilaç direncini aşma ve tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Gelecekteki in vivo çalışmalar ve klinik araştırmalar, bu kombinasyonun klinik uygulamadaki yerini daha net bir şekilde belirleyecektir. Özellikle, kombinasyonun ROS üretimi ve mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkilerinin daha detaylı incelenmesi, etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Baguley, B. C. (2002). Novel strategies for overcoming multidrug resistance in cancer. *BioDrugs*, 16(2), 97–103.
- Balachander, K., Vijayashree Priyadharsini, J., & Paramasivam, A. (2022). Advances in oral cancer early diagnosis and treatment strategies with liquid biopsy-based approaches. *Oral Oncology*, 134, 106108.
- Bayat Mokhtari, R., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022–38043.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou–Talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.
- Elshaer, M., Chen, Y., Wang, X. J., & Tang, X. (2018). Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sciences*, 207, 340–349.

- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2000–2016.
- Georges, P., Rajagopalan, K., Leon, C., Singh, P., Ahmad, N., Nader, K., & Kubicek, G. J. (2014). Chemotherapy advances in locally advanced head and neck cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(5), 966–972.
- He, W., McCoy, M. D., Riggins, R. B., Beckman, R. A., & Yeang, C. H. (2025). Personalized cancer treatment strategies incorporating irreversible and reversible drug resistance mechanisms. *NPJ Systems Biology and Applications*, 11(1), 70.
- Hervieu, M., Legrand, A. J., Floquet, E., Idziorek, T., Spriet, C., Monté, D., Villeret, V., Aumercier, M., & Choul-Li, S. (2025). PARP-1 inhibition increases oxidative stress in Ets-1-expressing MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Reports*, 8(1), e70119.
- Holoye, P. Y., Byers, R. M., Gard, D. A., Goepfert, H., Guillaumondegui, O. M., & Jesse, R. H. (1978). Combination chemotherapy of head and neck cancer. *Cancer*, 42(4), 1661–1669.
- Huang, F., Wu, X. N., Chen, J., Wang, W. X., & Lu, Z. F. (2014). Resveratrol reverses multidrug resistance in human breast cancer doxorubicin-resistant cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), 1611–1616.
- Keke Li, Li, J., Li, Z., Men, L., Zuo, H., & Gong, X. (2024). Cisplatin-based combination therapies: Their efficacy with a focus on ginsenosides co-administration. *Pharmacological Research*, 203, 107175.
- Kotsopoulos, I. C., Kucukmetin, A., Mukhopadhyay, A., Lunec, J., & Curtin, N. J. (2016). Poly(ADP-ribose) polymerase in cervical cancer pathogenesis: Mechanism and potential role for PARP inhibitors. *International Journal of Gynecological Cancer*, 26(4), 763–769.
- Koushki, M., Amiri-Dashatan, N., Ahmadi, N., Abbaszadeh, H. A., & Rezaei-Tavirani, M. (2018). Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2473–2490.
- Kursvietiene, L., Kopustinskiene, D. M., Staneviciene, I., Mongirdiene, A., Kubová, K., Masteikova, R., & Bernatoniene, J. (2023). Anti-cancer properties of resveratrol: A focus on its impact on mitochondrial functions. *Antioxidants*, 12(12), 2056.

- Li, W., Li, C., Ma, L., & Jin, F. (2020). Resveratrol inhibits viability and induces apoptosis in the small-cell lung cancer H446 cell line via the PI3K/Akt/c-Myc pathway. *Oncology Reports*, 44(5), 1821–1830.
- Lu, L., Zhan, M., Li, X. Y., Zhang, H., Dauphars, D. J., Jiang, J., Yin, H., Li, S. Y., Luo, S., Li, Y., & He, Y. W. (2022). Clinically approved combination immunotherapy: Current status, limitations, and future perspective. *Current Research in Immunology*, 3, 118–127.
- Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, 53(2), 148–158.
- Mazloun-Ardakani, M., Barazesh, B., Moshtaghioun, S. M., & Sheikhha, M. H. (2019). Designing and optimization of an electrochemical substitute for the MTT cell viability assay. *Scientific Reports*, 9(1), 14966.
- Minerva, Bhat, A., Verma, S., Chander, G., Jamwal, R. S., Sharma, B., Katyal, T., Kumar, R., & Shah, R. (2023). Cisplatin-based combination therapy for cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 19(3), 530–536.
- Mosier, K. M., Graner, B. D., & Gray, B. R. (2025). Trends in head and neck cancer: Oral cavity carcinoma and what the radiologist needs to know. *Radiology: Imaging Cancer*, 7(6), e250154.
- Soni, H., Kaminski, D., Gangaraju, R., & Adebiyi, A. (2018). Cisplatin-induced oxidative stress stimulates renal Fas ligand shedding. *Renal Failure*, 40(1), 314–322.
- Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., Tsukamoto, H., Kamiya, T., Kataoka, H., Sakamuro, D., & Joh, T. (2012). Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: Potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. *International Journal of Surgical Oncology*, 2012, 862879.
- Villaret, A. B., Cappiello, J., Piazza, C., Pedruzzi, B., & Nicolai, P. (2008). Quality of life in patients treated for cancer of the oral cavity requiring reconstruction: A prospective study. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 28(3), 120–125.
- Wu, Z., Liu, B., E, C., Liu, J., Zhang, Q., Liu, J., Chen, N., Chen, R., & Zhu, R. (2015). Resveratrol inhibits the proliferation of human melanoma cells by inducing G1/S cell cycle arrest and apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, 11(1), 400–404.