

Çevresel *Acanthamoeba* Suşlarının Hücresiz Sıvılarının Metastatik Hücre Hatlarının Canlılığı Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Inhibition Effect of Cell-Free Supernatants of Environmental *Acanthamoeba* Strains on the Viability of Metastatic Cell-Lines

Zuhal ZEYBEK¹(ID), Çise KEBABCI²(ID), İlnur BUGAN GÜL³(ID), Fahri AKBAŞ⁴(ID)

¹ İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ İstanbul University Faculty of Science, Department of Biology, Division of Fundamental and Industrial Microbiology, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² İstanbul University Institute of Sciences, Department of Biology, İstanbul, Türkiye.

³ İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ İstanbul University Faculty of Sciences, Department of Biology, Division of General Biology, İstanbul, Türkiye.

⁴ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Bezmialem Vakıf University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, İstanbul, Türkiye.

*Bu çalışmanın bir bölümü, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje no: 118Z923).

Makale Atfı: Zeybek Z, Kebabcı Ç, Bugan Gül İ, Akbaş F. Çevresel *Acanthamoeba* suşlarının hücresiz sıvılarının metastatik hücre hatlarının canlılığı üzerindeki inhibisyon etkisi. *Mikrobiyol Bul* 2023;57(2):283-292.

ÖZ

Kanser hücrelerine karşı tedavi edici maddelerin bir kısmının bitki ve hayvanlar gibi doğal kaynaklardan izole edildiği bilinmektedir. Ancak günümüzde artan ilaç direnci nedeniyle yeni kaynakların keşfine yönelik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmada dört yerel *Acanthamoeba* suşunun farklı kanser hücre hatları (MDA-MB-231, PC3, MAT-LyLu) üzerindeki inhibisyon etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. 3T3 hücreleri normal hücre hattı olarak kullanılmıştır. Tüm *Acanthamoeba* suşları, ısıyla inaktive edilmiş *Escherichia coli* ATCC 25922 yayılmış, besleyici olmayan agar kullanılarak yeniden kültüre edilmiştir. Standart suş olarak *A.castellani* ATCC 50373 kullanılmıştır. Yerel *Acanthamoeba* suşlarının moleküler tanımlaması, özgül primer çiftleri (P-FLA-F, P-FLA-R, JDP-F, JDP-R) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ve DNA dizi analizi ile yapılmıştır. Tüm suşların aksenik kültürleri 25 cm²'lik doku kültürü flasklarında ve pepton maya ekstraktı glukoz (PYG) ortamında elde edilmiştir. Aksenik kültürlerden elde edilen hücresiz sıvıların farklı konsantrasyonlarının (%1, %2, %5, %10, %15) kanser hücre hatları ve 3T3 hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması, MTT yöntemine göre yapılmıştır. 3T3 hücrelerinin canlılığının hiçbir *Acanthamoeba* hücresiz sıvısından etkilenmediği saptanmıştır (p ≤ 0.05). Test edilen örneklerin tümünün, PC3 ve MAT-LyLu hücrelerinin (insan ve sıçan prostat kanseri hücre dizisi) canlılığı üzerinde önemli ölçüde inhibe edici etkiye sahip olduğu (p < 0.05) bulunmuştur. Ancak örneklerin hiçbirisi MDA-MB-231 (meme kanseri hücre dizisi)'in canlılığı üzerinde inhibe edici etki göstermemiştir. İki yerel *Acanthamoeba* hücresiz sıvısı %2 konsantrasyonda, referans suşa (%16) kıyasla PC3 hücrelerine karşı

daha yüksek inhibitör etki (%28 ve %21.9) göstermiştir. Benzer şekilde, aynı *Acanthamoeba* örneklerinin, MAT-LyLu hücrelerinin canlılığı üzerinde de referans suştan daha iyi bir inhibisyon potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. *Acanthamoeba* hücresiz sıvılarının inhibisyon potansiyelinin proteinler ve proteazlarla ilişkili olmayabileceği bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, ülkemizden izole edilen su ortamında yaşayan *Acanthamoeba* türlerinin test edilen kanser hücre hatlarına karşı potansiyel inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda, bitkiler ve hayvanlara ek olarak, *Acanthamoeba* hücresiz sıvıları, kanser hücrelerine karşı etkili olan doğal terapötik maddeler için bir kaynak olabilir. Ancak inhibisyon etkisi daha yüksek olan suşların saptanabilmesi için daha fazla suş kullanılarak yeni çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Acanthamoeba*; hücre canlılığı; hücresiz sıvı; polimeraz zincir reaksiyonu; kanser hücre hattı.

ABSTRACT

It is known that some of the therapeutic agents against cancer cells are isolated from natural sources such as plants and animals. However, due to increasing drug resistance, studies on the discovery of new sources are needed. In this study, it was aimed to investigate the inhibition effects of four native *Acanthamoeba* strains on different cancer cell lines (MDA-MB-231, PC3, MAT-LyLu). 3T3 cells were used as normal cell line. All strains were recultured by using non-nutrient agar spread by heat-inactivated *Escherichia coli* ATCC 25922. *A.castellanii* ATCC 50373 was used as the standard strain. Molecular identification of the native *Acanthamoeba* isolates was done by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequence analysis using specific primer pairs (P-FLA-F, P-FLA-R, JDP-F, JDP-R). Axenic cultures of all strains were obtained in 25 cm² tissue culture flasks and in peptone yeast extract glucose (PYG) medium. In order to investigate the effect of cell-free supernatants obtained from axenic cultures on cancer cell lines and 3T3 cell viability, MTT method was applied using different concentrations of cell-free supernatants (1%, 2%, 5%, 10%, 15%). It was determined that the viability of 3T3 cells was not affected by any *Acanthamoeba* cell-free supernatants ($p \leq 0.05$). All of the samples tested were found to have a significant inhibitory effect ($p < 0.05$) on the viability of PC3 and MAT-LyLu cells (human and rat prostate cancer cell line). However, none of the samples had an inhibitory effect on the viability of MDA-MB-231 (breast cancer cell-line). Two native *Acanthamoeba* cell-free supernatants showed higher inhibitory potency (28% and 21.9%) at 2% concentration against PC3 cells compared to the reference strain (16%). Similarly, the same *Acanthamoeba* samples were also shown to have a better inhibition potential on the viability of MAT-LyLu cells than the reference strain. It was found that the inhibitory potential of *Acanthamoeba* cell-free supernatants may not be related to proteins and proteases. The results obtained from this study showed that *Acanthamoeba* species living in the aquatic environment isolated from our country have a potential inhibitory effect against the tested cancer cell lines. In addition to plants and animals, *Acanthamoeba* cell-free supernatants can also be a source for natural therapeutic substances that act against cancer cells. However, it is necessary to carry out new studies using more strains in order to detect strains with higher inhibitory effects.

Keywords: *Acanthamoeba*; cell viability; cell-free supernatant; polymerase chain reaction; cancer cell-lines.

GİRİŞ

Kansere karşı doğal tedavi edici maddelerin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir. Ancak ilaç direnci sorunu nedeniyle yeni anti-tümör ajanlara halen gereksinim duyulmaktadır. Bu ajanların doğal kaynakları arasında bitkiler, amfibiler, sürüngenler ve küçük memeliler sınıfından canlılar yer almaktadır. Son yıllarda bazı omurgasızlar ve kuş türlerinin bağırsaklarında yaşayan bakterilerin de anti-tümör moleküllerin potansiyel kaynakları olduğu gösterilmiştir¹⁻³. Öte yandan, bir diğer mikroorganizma grubu olan serbest yaşayan amiplerin (SYA) kanser hücreleri üzerindeki etkisi hakkında bilgi eksikliği mevcuttur.

SYA, toprak, hava ve doğal suların yanı sıra musluk suları, yüzme havuzları gibi insan yapımı su sistemlerinde de yaşayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Bu grup mikroorganizmalar arasında yer alan *Acanthamoeba* cinsi mikroorganizmalar insan sağlığını tehdit eden enfeksiyonlara sebep olan ve en sık karşılaşılan fırsatçı patojenlerdendir⁴⁻⁶.

Acanthamoeba cinsi mikroorganizmaların iki yaşam formu vardır. Trofozoit formu uygun koşullarda akantapod ile beslenen, çoğalan ve hareket eden formdur. Yiyecek kıtlığında veya çevre koşulları elverişsiz olduğunda çift duvarlı kist formuna dönüşmektedirler⁵. *Acanthamoeba* cinsinin morfolojik kriterlere göre 24'ten fazla türü, 18S rDNA dizisindeki farklılıklara göre 22 genotipi bulunmaktadır. Birçok habitatta ve insan enfeksiyonlarında en çok karşılaşılan tipi T4 genotipidir^{5,7}.

Acanthamoeba türleri, sadece insandaki patojeniteleri ile değil, aynı zamanda patojenik bakterilerin yayılmasındaki rolleri ve habitattaki bakterilerle olan ilişkileri nedeniyle de uzun zamandır araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Bazı bakterilerin *Acanthamoeba* hücresi içerisindeyken olumsuz dış ortam koşullarına karşı korunabildiği, çoğalabildiği ve virülansını arttırabildiği gösterilmiştir^{8,9}. *Acanthamoeba*'nın bu rolüne ek olarak bazı bakterilere karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu da bilinmektedir^{10,11}. Bu çalışmada, *Acanthamoeba* suşlarının hücresiz sıvılarının prostat kanseri hücre hattı (Mat-LyLu, PC-3), meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) ve embriyonik fare fibroblast hücre hattı (3T3) canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

SYA Suşları

Bu çalışmada, ülkemizdeki yüzme havuzlarından önceki çalışmada⁶ izole edilmiş olan üç adet SYA suşu (A10, A13, A14), göl suyundan izole edilmiş olan bir adet SYA suşu (Ugöl), standart suş olarak *Acanthamoeba castellanii* ATCC 50373 kullanıldı. Tüm suşlar, ısı ile inaktive edilmiş *E.coli* ATCC 25922 yayılmış olan non-nutrient agarda (*E.coli*-NNA) yeniden üretildi¹².

Aksenik SYA Kültürlerinin Eldesi

Her bir SYA suşunun aksenik kültürü, penisilin ve streptomisin (0.5 mg/mL) ilave edilen pepton yeast ekstrakt glukoz (PYG) besiyeri kullanılarak elde edildi. Aksenik kültürlerdeki amip trofozoitlerinin sayımı ve canlılıkları Thoma lamı ve tripan mavisini (%0.4) kullanılarak gerçekleştirildi. Mavi renkli hücreler ölü, boyanmayanlar canlı olarak değerlendirildi^{10,12}.

SYA Hücresiz Sıvılarının Eldesi (SYA-ACM)

Her bir aksenik kültür 3000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Üst sıvı 0.22 mikrometre (μm) por çaplı steril filtreden (Merck, Almanya) geçirilerek SYA-hücresiz sıvısı (SYA-ACM) elde edildi^{10,11}.

SYA İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

SYA izolatlarının genomik DNA izolasyonu Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerisine göre yapıldı. PCR için özgül primer çiftleri kullanıldı: P-FLA-F (5'-CGC GGT AAT TCC AGC TCC AAT AGC-3'), P-FLA-R (5'-CAG GTT AAG GTC TCG TTC GTT AAC-3'), JDP-F (5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3') ve JDP-R (5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA-3')¹³.

PCR ürünleri etidyum bromür ile boyanarak %2'lik agaroz jelde görüntüldü, DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak üretici firma önerisine göre saflaştırıldıktan sonra dizi analizi gerçekleştirildi (Sentebiolab, Ankara). Dizileme sonuçları blast.ncbi.nlm.nih.gov adresinden BLAST analizi ile veri tabanındaki kayıtlı dizilerle karşılaştırıldı.

Hücre Hatları

Çalışmada, embriyonik fare fibroblastı (3T3), insan kökenli metastatik meme kanseri (MDA-MB-231), yüksek metastatik karakterli insan prostat kanseri (PC-3) ve yüksek metastatik karakterli sıçan prostat kanseri (Mat-LyLu) hücre hatları kullanıldı. Hücreler, FBS ilaveli DMEM:F12 ile RPMI-1640 (Gibco; Life Technologies) besiyerinde, 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi^{14,15}.

Hücre Canlılığı

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde, kolorimetrik MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi kullanıldı¹⁶. Normal taze besiyeri uygulanan kontrol grubu ve SYA suşlarının hücresiz sıvılarının (SYA-ACM) %1, %2, %5, %10, %15 konsantrasyonlarda uygulandığı deney gruplarının her biri için, 5 x 10³ hücre/kuyucuk ekildi ve her deney en az üç kez tekrarlandı.

Kırk sekiz saatlik sürenin sonunda mikropak okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan FC, ABD) ölçülen "absorbans/optic density" değerleri, "Hücre canlılığı %= (deney O.D/ kontrol O.D) x 100" formülü kullanılarak değerlendirildi ve kontrol grubunun ortalama absorbans değerleri %100 canlılık olarak kabul edildi.

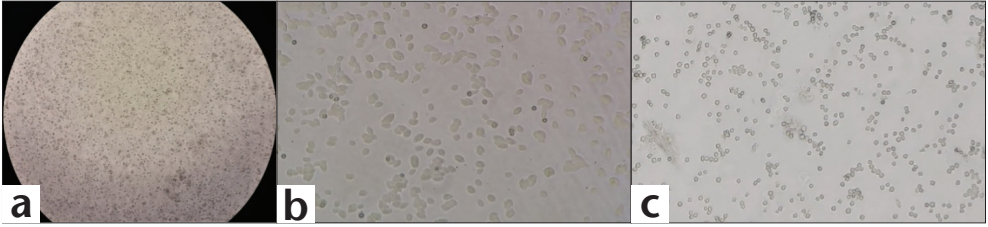
Ayrıca, SYA-ACM'deki proteinlerin veya proteazların olası inhibitör etkilerini araştırmak için her bir SYA-ACM, proteinaz K (100 µg/mL nihai konsantrasyonda) veya proteaz inhibitör kokteyli (AEBSE, Aprotinin, E 64, EDTA, Leupeptin, PMSF Bestatin) (Sigma, P-2714) ile birlikte inkübe edildi ve sonrasında hücre hatlarına uygulandı.

İstatiksel Analiz

Ortalama ± standart sarpma (SD) olarak verilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi Student's t testi ile yapıldı.

BULGULAR

SYA suşlarının aksenik kültürlerindeki (Şekil 1) canlı trofozoit sayıları *A.castellanii* ATCC 50373, A10, A13, A14 ve Uğöl için sırasıyla 8.6 x 10⁵ hücre/mL, 9.1 x 10⁵ hücre/mL, 8.4 x 10⁵ hücre/mL, 7.1 x 10⁵ hücre/mL, 4.5 x 10⁵ hücre/mL olarak saptanmıştır.



Şekil 1. SYA suşlarının mikroskopik görüntüsü a) Hücre kültürü flasksı (x 100); b) NNA-E.coli içeren petri kutularındaki trofozoit şekli (x 100); c) Hücre kültürü flaskındaki kist şekli (x 100).

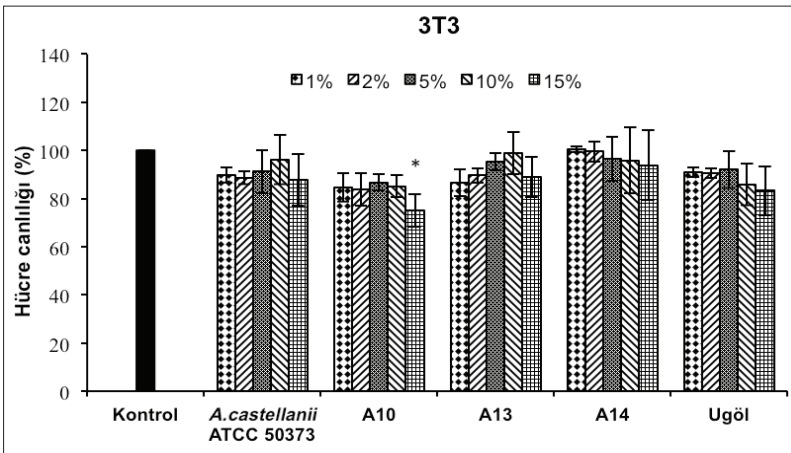
SYA suşlarının moleküler tanımlaması sonucu *Acanthamoeba* cinsine ait oldukları belirlenmiştir (Tablo I).

Acanthamoeba hüresiz sıvılarının (*Acanthamoeba*-ACM), denenen hücre hatlarındaki hücrelerin canlılığı üzerindeki etkilerinin değışkenlik gösterdiği saptanmıştır. Hücre canlılığının inhibisyonu olarak gözlenen bu etki, uygulanan konsantrasyondan bağımsız olarak veya doza bağılı olarak artan oranlarda meydana gelmiştir.

3T3 hücrelerinin canlılığı, %15 konsantrasyonda (en yüksek doz) A10 suşu dışında hiçbir suştan etkilenmemiştir ($p < 0.05$) (Şekil 2).

Tablo I. Deneylerde Kullanılan SYA İzolatlarının Moleküler Tanı Sonuçları

SYA (kod)	Kaynak	Moleküler Dizi Benzerliği (%)	Referans Erişim Numarası
A10	Yüzme Havuzu İzolatu	<i>Acanthamoeba</i> Genotip T4 (%99.46)	KT892856.1
A13	Yüzme Havuzu İzolatu	<i>Acanthamoeba healyi</i> Genotip T12 (%98.95)	MK713915.1
A14	Yüzme Havuzu İzolatu	<i>Acanthamoeba</i> Genotip T4 (%99.73)	MT109098.1
Ugöl	Göl Suyu İzolatu	<i>Acanthamoeba</i> Genotip T4 (%100)	MN648629.1

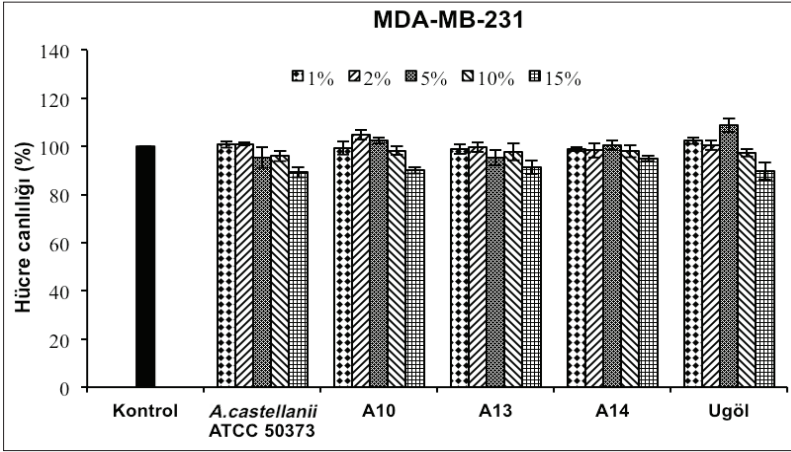


Şekil 2. *Acanthamoeba*-ACM'lerinin 3T3 hücre hattı üzerindeki etkisi, *: $p < 0.05$.

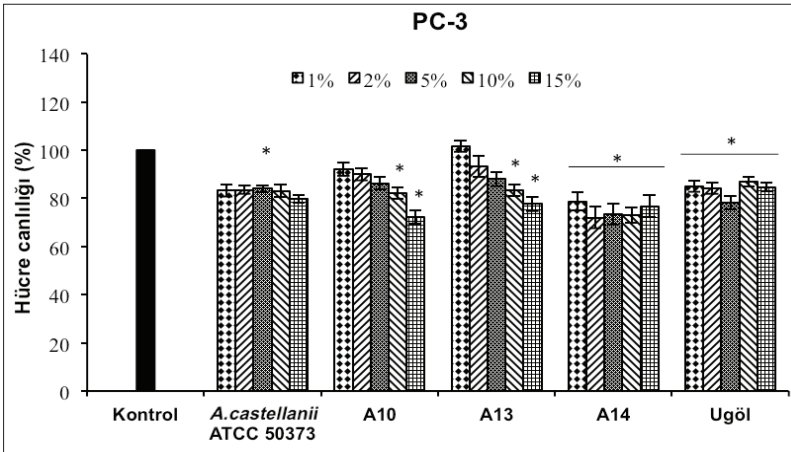
Acanthamoeba-ACM örneklerinin hiçbirisi MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerinde inhibe edici etki göstermemiştir (Şekil 3).

Test edilen tüm *Acanthamoeba*-ACM örneklerinin, PC3 hücrelerinin canlılığı üzerinde önemli ölçüde inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Bu etki, *A. castellanii* ATCC 50373-ACM ve iki çevresel *Acanthamoeba*-ACM (A14, Ugöl) için test edilen tüm konsantrasyonlarda (%1-15) elde edilmiştir. Diğer iki örnek (A13, A10), bu hücrelerin canlılığı üzerinde yüksek konsantrasyonlarda (%10 ve %15) benzer etki göstermiştir ($p \leq 0.05$) (Şekil 4).

PC-3 hücre hattına uygulanan *A. castellanii* ATCC 50373, A14 ve Ugöl suşlarının hücresiz sıvıları, konsantrasyon oranından bağımsız olarak hücre canlılığı üzerine %28'e kadar inhibe edici etki göstermiştir. A10 ve A13 suşlarının sıvıları, ancak %10 ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulandıklarında benzer inhibisyon oranları elde edilmiştir.



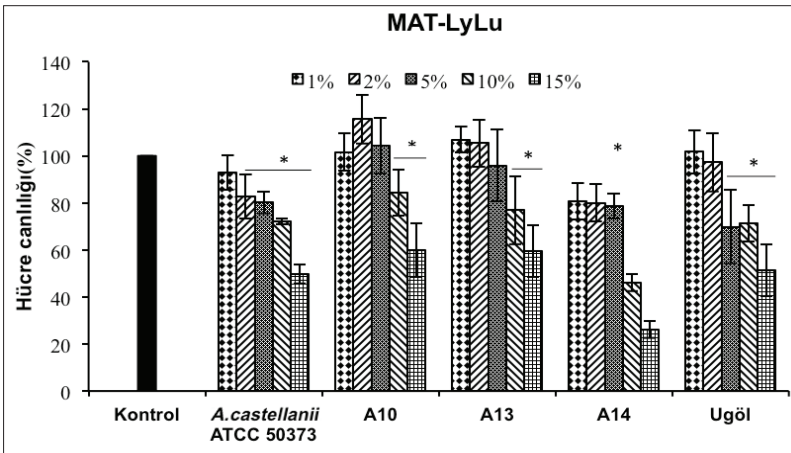
Şekil 3. *Acanthamoeba*-ACM'lerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkisi.



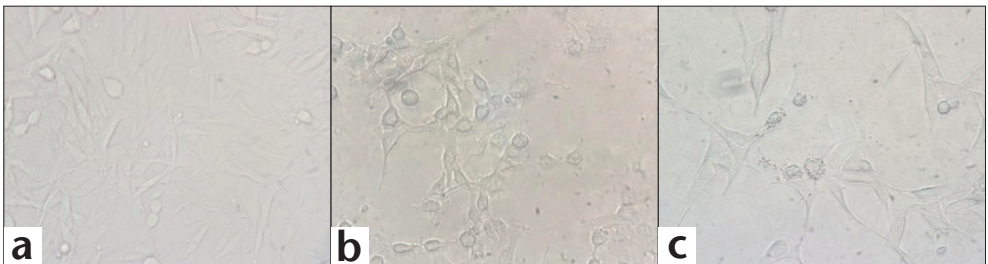
Şekil 4. *Acanthamoeba*-ACM'lerin PC3 hücre hattı üzerindeki etkisi, *: $p < 0.05$.

Test edilen tüm *Acanthamoeba*-ACM örnekleri, MAT-LyLu hücrelerinin canlılığı üzerine düşük konsantrasyonlarda bile ve doz artışına bağlı olarak anlamlı olarak artan inhibe edici etki göstermiştir ($p \leq 0.05$). *A.castellanii* ATCC 50373, A10, A13 ve Ugöl suşlarının hücresiz sıvıları %10 konsantrasyonda uygulandığında, MAT-LyLu hücre hattında canlılık oranları sırasıyla 71.98 ± 1.23 , 84.28 ± 9.86 , 76.94 ± 14.49 ve 71.27 ± 7.77 olarak saptanmıştır. Konsantrasyon %15'e yükseltildiğinde hücre canlılığının %50'ye kadar düştüğü tespit edilmiştir. A14 suşunun hücresiz sıvısı %10 konsantrasyonda uygulandığında canlı hücre yüzdesi 46.03 ± 3.52 'ye ve konsantrasyon %15 olduğunda 26.11 ± 3.51 'e düşmüş, diğer bir deyişle hücre canlılığının önemli ölçüde (%75'e kadar) inhibe edildiği görülmüştür (Şekil 5).

Acanthamoeba-ACM örneklerinin uygulanmasından sonra PC3 ve MAT-LyLu hücrelerinde bazı morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Hücreler yuvarlaklaşmış, sitoplazmalarında granüller birikmiş ve 48 saat sonunda çoğu hücrede apoptotik hücre morfolojisine benzer görünüm gözlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 5. *Acanthamoeba*-ACM'lerin MAT-LyLu hücre hattı üzerindeki etkisi, *: $p < 0.05$.



Şekil 6. *Acanthamoeba*-ACM ile inkübasyondan sonra PC-3 hücrelerinde gözlenen morfolojik farklılıklar. a) Kontrol grubunda bozulmamış PC-3 hücreleri, b) Yirmi dört saat inkübasyondan sonra heterojen sitoplazmalı bazı yuvarlak hücreler, c) Kırk sekizinci saatte birçok hücrede apoptotik hücre morfolojisine benzer görünüm (hücre küçülmesi, membranlarda kabarcıklanma ve apoptotik hücre benzeri yapılar) (40 x).

Hücre canlılığı sonuçlarına göre, proteazlar veya proteinaz K ilavesinden sonra *Acanthamoeba*-ACM'lerin hücre canlılığı üzerindeki inhibitör etkilerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

TARTIŞMA

Kanser tedavisindeki sorunların arasında ilaç direnci önemli bir yer tutmakta, bu durum yeni antikanser ajanları keşfetme ihtiyacını doğurmaktadır. Sentetik ajanlara kıyasla, doğal kaynaklı ajanların araştırılması daha umut verici gibi gözükmektedir. En yaygın kullanılan kanser önleyici doğal ürünler bitki kökenlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, omurgalı hayvanların organ lizatlarının, çeşitli vücut sıvılarının prostat kanseri hücrelerine (PC3) karşı inhibe edici etkisi gösterilmiştir. Ayrıca bazı kuş türlerinin ve omurgasız hayvanların bağırsak bakterilerinin HeLa hücreleri, servikal ve prostat kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir^{1,3}.

Acanthamoeba'nın hücre-hücre temasına bağlı olarak anti-tümör aktiviteye sahip olması durumunda bir anti-tümör ajan olarak kullanılmasının düşünülmesi, olası patojeniteleri nedeniyle uygun olmayacaktır. *Acanthamoeba* yaşadığı ortama (örn.; aksenik kültürde) saldırdığı çözünür maddeler sayesinde hücre-hücre temasına bağlı olmadan da diğer hücreler üzerinde (örn.; kanser hücreleri üzerinde) etkili olabilir. Bu durumda *Acanthamoeba*'nın bir anti-tümör ajanı olarak kullanımının düşünülmesi mümkün gözükmektedir. Çalışmada bu nedenle aksenik olarak PYG besiyerinde üretilen *Acanthamoeba* izolatlarından elde edilen hücresiz sıvılar (*Acanthamoeba*-ACM) kullanılmıştır. Ülkemizdeki sularda bulunan *Acanthamoeba* izolatlarından elde edilen bu örneklerin bazı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ilk kez gösterilmiştir.

A10 suşu hariç dört *Acanthamoeba* suşunun 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Tashmukhambetov¹¹, ne PYG'nin ne de *A.castellanii* 50373 suşunun A549 hücreleri karşısında sitotoksik etkisinin olmadığını göstermiştir. González-Robles ve arkadaşları¹⁷ bir klinik izolat olan *Acanthamoeba griffini* hücresiz sıvılarının MDCK hücrelerinde sadece küçük hücre hasarları meydana getirdiğini transmisyon elektron mikroskopunda göstermişlerdir.

Yerel A14 ve Ugöl örneklerinin, PC3 ve Mat-LyLu hücrelerinin canlılığını azaltma yetenekleri referans suşa (*A.castellanii* 50373) göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4, Şekil 5). Bu örnekler 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etki de göstermemiştir. Bununla beraber daha yüksek anti-tümör aktiviteye sahip *Acanthamoeba* suşlarının keşfi için daha fazla sayıda suşun kullanılacağı yeni çalışmaların planlanması gereklidir.

Proteazlar veya proteinaz K ilavesinden sonra *Acanthamoeba*-ACM örneklerinin hücre canlılığı üzerindeki inhibitör etkilerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuçlar, denenen örneklerin inhibitör potansiyelinin, proteinler ve proteazlarla ilgili olmayabileceğini göstermiştir. Her bir örnek karışımındaki bileşenleri saptamak, yapısal tanımlanmalarını ortaya çıkartmak, ileri analizler ile mümkün olacaktır.

Acanthamoeba türlerinin morfolojik olarak tanımlanmaları, pleomorfik morfolojileri nedeniyle sorunludur, bu amaçla günümüzde moleküler yaklaşımlarla desteklenmesi tercih edilmektedir. Bu cins 18S rDNA'larındaki farklılıklara dayalı olarak 22 genotipe (T1-T22) ayrılmış ve en yaygın olan tipinin *Acanthamoeba* genotip T4 olduğu belirlenmiştir^{5,7}. Çalışmada da morfolojik gözlemlere ek olarak PCR temelli moleküler yöntemler ile tanısı koyulmuş olan dört çevresel izolatanın üç tanesi *Acanthamoeba* genotip T4, bir tanesi *A.healyi* genotip T12 olarak tanımlanmıştır. *A.healyi* genotip T12 bir yüzme havuzundan, *Acanthamoeba* genotip T4 suşları ise hem farklı iki adet yüzme havuzu (A10 ve A14) hem de bir göl suyundan (Ugöl) izole edilmiştir. *Acanthamoeba*'nın farklı genotiplerinin ülkemizdeki çeşitli su kaynaklarındaki varlığı yakın zamandaki çalışmalarda da gösterilmiştir^{4,13,18,19}. Bu nedenle ülkemizden gerek şimdikiye kadar izole edilmiş olan gerekse sonraki zamanlarda izole edilecek olan yerel *Acanthamoeba* izolatlarının, bu çalışmada denenen hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri açısından araştırılması yerinde olacaktır. Ayrıca aynı yerel *Acanthamoeba* suşlarının diğer kanser hücre hatları üzerindeki anti-tümör etkilerinin araştırılması için de yeni çalışmalar planlanmalıdır.

In vitro olarak gerçekleştirilen çalışma yerli *Acanthamoeba* suşlarının hücresiz sıvılarının anti-tümör ajan potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte in vivo etkilerinin araştırılacağı çalışmalara da gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmaları tümör öldürücü etkiye sahip aktif moleküllerin tanımlanacağı ve saflaştırılacağı yeni çalışmalar takip etmelidir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Soopramanien M, Mungroo MR, Sagathevan KA, Khan NA, Siddiqui R. Invertebrates living in polluted environments are potential source of novel anticancer agents. J Res Pharm 2019; 23(6): 1079-89. <https://doi.org/10.35333/jrp.2019.72>
2. Soopramanien M, Khan NA, Neerooa BNHM, Sagathevan K, Siddiqui R. Gut bacteria of *Columbia livia* are a potential source of anti-tumour molecules. Asian Pac J Cancer Prev 2021; 22(3): 733-40. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.3.733>
3. Jeyamogan S, Khan NA, Siddiqui R. Antitumour activities of selected pure compounds identified from the serum of *Crocodylus porosus*, *Malayopython reticulatus*, *Varanus salvator* and *Cuora kamaroma* amboinensis. Asian Pac J Cancer Prev 2021; 22(S1), 97-106. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.S1.97>
4. Özçelik S, Coşkun KA, Düzlü Ö, Alım A, Malatyali E. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. Parazitoloj Derg 2012; 36(4), 198-203. <https://doi.org/10.5152/tpd.2012.48>
5. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. Pathol Biol 2012; 60(6), 399-405. <https://doi.org/10.1016/j.pat-bio.2012.03.002>
6. Zeybek Z, Türkmen A. Investigation of the incidence of *Legionella* and free-living amoebae in swimming pool waters and biofilm specimens in İstanbul by different methods. Mikrobiyol Bul 2020; 54(1), 50-65. <https://doi.org/10.5578/mb.68962>

7. Angelici MC, Walochnik J, Calderaro A, Saxinger L, Dacks JB. Free-living amoebae and other neglected protistan pathogens: Health emergency signals? *Eur J Protistol* 2021; 77: 125760. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2020.125760>
8. Scheid P. Free-living amoebae as human parasites and hosts for pathogenic microorganisms. *Proceedings* 2018; 2(692): 1-11. <https://doi.org/10.3390/proceedings2110692>
9. Henriquez FL, Mooney R, Bandel T, Giammarini E, Zeroual M, Fiori PL, et al. Paradigms of protist/bacteria symbioses affecting human health: *Acanthamoeba* species and *Trichomonas vaginalis*. *Front Microbiol* 2021; 11: 616213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616213>
10. Iqbal J, Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart. *Parasites Vectors* 2014; 7(1): 56. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-56>
11. Tashmukhambetov B. An investigation of the effects of an antimicrobial peptide on the survival of *Acanthamoeba* and intracellular bacteria associated with cystic fibrosis. PhD, University of Essex, Colchester, England, 2016.
12. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 342-54. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.342-354.2002>
13. Kuk S, Yazar S, Doğan S, Çetinkaya Ü, Sakalar Ç. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water. *Turk J Med Sci* 2013; 43(1): 12-7. <https://doi.org/10.3906/sag-1205-26>
14. Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JEG, Laniado ME, Foster CS, et al. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: Contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 1995; 369(2-3), 290-4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00772-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00772-2)
15. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5381-9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
17. González-Robles A, Salazar-Villatoro L, Omaña-Molina M, Reyes-Batlle M, Martín-Navarro CM, Lorenzo-Morales J, et al. Morphological features and in vitro cytopathic effect of *Acanthamoeba griffini* trophozoites isolated from a clinical case. *J Parasitol Res* 2014; 256310. <https://doi.org/10.1155/2014/256310>
18. Yazar S, Gürbüz E, Sönmez MF, Çetinkaya Ü, Kuk S. Investigation of potentially pathogenic free-living amoebae and their in vivo pathogenicity in water supplies of Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(3): 449-59. <https://doi.org/10.5578/mb.27898>
19. Üstüntürk-Onan M. Isolation and identification of free-living amoebae isolated from well water in Istanbul. *Water Health* 2020; 18(6): 1139-45. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.255>