

Saccharomyces cerevisiae L. Hücre Kültürü Oksidatif Stres Modelinde Bazı Fosfazene Türevlerinin Biyokimyasal Aktiviteleri

Ayşe Dilek ÖZŞAHİN^{1*}, Ayşe ERDOĞDU², Oğuz Ayhan KİREÇÇİ³, Fatih ASLAN⁴, Ali İhsan ÖZTÜRK⁵
Ökkeş YILMAZ⁶

¹Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis, ²Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Elazığ, ³Bitlis Eren Üniversitesi, Hizan MeslekYüksek Okulu, Bitlis, ⁴Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Şanlıurfa, ⁵Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Osmaniye

¹<https://orcid.org/0000-0002-1832-7082>, ²<https://orcid.org/0000-0001-5894-1442>, ³<https://orcid.org/0000-0003-2205-4758>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-5948-6979>, ⁵<https://orcid.org/0000-0002-3912-0670>, ⁶<https://orcid.org/0000-0002-1832-7082>

✉: molekuler@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, *Saccharomyces cerevisiae* L. kültür ortamında bazı fosfazenerin biyokimyasal aktiviteleri belirlendi. Deneysel uygulamada farklı fosfazene molekülleri kullanıldı. Çalışma kapsamındaki deney grupları; kontrol grubu, H₂O₂ (Hidrojen peroksit) ve fosfazene molekülleri grupları şeklinde düzenlendi. Gruplar hazırlandıktan sonra, kontrol grubu dışında diğer kültürler 30 µg fosfazene ve 100 µl H₂O₂ ilave edildi. 30 °C de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücre pelletleri ayrıldı. Elde edilen süpernatantdan Glutasyon S-Transferaz (GST) ile total protein düzeyleri belirlendi. Hekzan/izopropanol alkol karışımı ile elde edilen homojenattan da yağ asidi ve lipofilik moleküllerin analizi yapıldı. Deney sonuçlarına göre, fosfazene molekülü ve H₂O₂ ilave edilen maya hücrelerinde total protein değerleri ile GST değerlerinde paralel bir artış gözlenirken, bazı gruplarda protein miktarında artış saptandığı halde GST düzeyinde azalma olduğu belirlendi. *S. cerevisiae*'nin membran yapısında önemli bir yer kaplayan ergosterolün, T3 ve T3B kodlu fosfazener ile H₂O₂ gruplarında kontrol grubuna göre yüksek, T4 kodlu fosfazener ile H₂O₂ gruplarında ise düşük olduğu belirlendi. Sonuç olarak; *S. cerevisiae* kültür ortamına fosfazene ve H₂O₂ moleküllerin eklenmesinin, ergosterol ve yağ asidi sentezi ile yağ asitlerinin hidrokarbon zincirine çift bağ girişi yapan enzimlerin son ürünlerinde artışlara ya da azalışlara neden olduğu ortaya konulmuştur.

Biyokimya

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 31.12.2021

Kabul Tarihi : 10.03.2022

Anahtar Kelimeler

Fosfazene

H₂O₂ (Hidrojen peroksit)

Lipofilik moleküller

Saccharomyces cerevisiae L.

Yağ asidi

Antioxidant Effects of Some Phosphazene Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* L. Cell Culture Oxidative Stress Model

ABSTRACT

In this study, biochemical activities of some phosphazenes were determined in *Saccharomyces cerevisiae* L. culture medium. Different phosphazene molecules were used in experimental practice. The experimental groups within the scope of the study were organized as control group, H₂O₂ (Hydrogen peroxide) and groups of phosphazene molecules. After the groups were prepared, 30 µg of phosphazene and 100 µl of H₂O₂ were added to other cultures, except for the control group of *S. cerevisiae* culture. It was incubated for 72 hours at 30 °C. At the end of incubation, cell pellets were separated. Glutathione S-Transferase (GST) and Total protein levels were determined from supernatant. The fatty acid and lipophilic molecules were analyzed from the homogenate obtained with the hexane / isopropanol alcohol mixture. According to our experimental results, while total protein values and GST values increased in parallel with the phosphazene molecule and H₂O₂ added yeast cells, GST levels were decreased in some groups, although an increase in the amount of protein was observed. Ergosterol, which has an important place in the membrane structure of *S. cerevisiae*, was found to be higher in T3 and T3B coded phosphazenes and H₂O₂ groups

Biochemistry

Research Article

Article History

Received : 31.12.2021

Accepted : 10.03.2022

Keywords

Phosphazene

H₂O₂ (hydrogen peroxide)

Lipophilic molecules

Saccharomyces cerevisiae L.

Fatty acid

compared to the control group, and low in T4 coded phosphazenes and H₂O₂ groups. Our study results revealed that as a result of the addition of phosphazene and H₂O₂ molecules to the culture medium of *S. cerevisiae*, ergosterol and fatty acid synthesis, fatty acids cause increases or decreases in the end products of enzymes that double-enter the hydrocarbon chain.

Atıf Şekli: Özşahin, AD., Erdoğan, A., Kireççi, OA., Aslan, F., Öztürk, AI. & Yılmaz, Ö. (2023) *Saccharomyces cerevisiae* L. Hücre Kültürü Oksidatif Stres Modelinde Bazı Fosfazene Türevlerinin Biyokimyasal Aktiviteleri. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 26 (1), 1-10. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1051663>.
To Cite : Ozsahin, AD., Erdogdu, A., Kirecci, OA., Aslan, F., Ozturk, AI. & Yilmaz, O. (2023). Antioxidant Effects of Some Phosphazene Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* L. Cell Culture Oxidative Stress Model. *KSU J. Agric Nat* 26(1), 1-10. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1051663>

GİRİŞ

Fosfazene; aynı grup azot ve fosfor atomlarının oluşturduğu (R)₃ P=NR (R:halojen, alkoksi, amino, alkil ve aril) yapısındaki bileşiklere denir (Civan, 2014). Fosforun azot ile yaptığı bileşikler üç ana grupta incelenebilir. P ile N arasındaki bağ sayısı tek olduğu zaman fosfazene H₂N-PH₄, çift olduğu zaman fosfazene HN=PH₃, üç olduğu durumda fosfazene N≡PH₂ olarak adlandırılmaktadır. Yapılarında yer alan fonksiyonel gruplarının bağlanma durumlarına göre isimler alarak sınıflandırılırlar. Fonksiyonel grup, fosfazene halkasında yer alan bir fosfora bağlanmışsa spiro adını alır, aynı halkada yer alan farklı iki fosfora bağlanmışsa ansa ve iki tane fosfazene halkasını birleştirecek şekilde bağlanmışsa bino fosfazene adını almaktadır (Civan, 2014). Fosfazener; monofosfazener, siklofosfazener ve polifosfazener olmak üzere üç grupta incelenebilir. Siklo ve polifosfazener; en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan P-N bileşikleridir (Kılıç ve ark., 1996; Carriedo ve ark., 1996; Allock ve ark., 1996; Laguna ve ark., 2002).

Siklofosfazener inorganik yapıya sahiptirler. Asit içeren alkoller ve aromatik halka yapısına sahip fenollerin tepkimesi sonucunda sentezlenebilmektedirler (Uslu & Yesilot, 2015; Sazhin ve ark., 2011). Klor atomlarının fosfora bağlanma şekillerinden kaynaklı olarak meydana gelen fiziksel ve kimyasal özellikler bulunmaktadır (Okutan ve ark., 2011). Farklı özelliklere sahip olan fosfazener yapılarındaki bağlanmalara göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlikler fosfazener için farklı kullanım alanı oluşturmaktadır. Polifosfazener; organik yapıda olan sıvıları ayırma, buharlaştırma ve iyonlara ayırma gibi durumlarda membran filtreleri olarak ve bazı siklofosfazener de kanser ilaçlarında kullanılmaktadır (Kılıç ve ark., 1996; Xia ve ark., 2017; Onder & Ozay 2021; Şenkuytu ve ark., 2022).

1900'lü yılların sonlarına doğru fosfazene bileşikleriyle ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Halkalı fosfazenerle başlayan bu çalışmalar günümüzde geliştirilen tekniklerle artış göstermiştir (Dumanogulları, 2006).

Monofosfazenerle (basit fosfazener) yapılan çalışmalar, bu moleküllerin hücrelerin büyümesi üzerine etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca yüksek oranda uygulanan fosfazene moleküllerinin bakteri ve maya hücreleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, bazı fosfazene moleküllerinin ise maya hücreleri üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. İn vitro ortama verilen bazı fosfazenerin de hücre büyümesini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (Öztürk ve ark. 2000).

Son zamanlarda fosfazene türevleri yüksek seçici antikanser madde (Siwy ve ark., 2006), antimikrobiyal ajan (Işıklan ve ark., 2010; Çıralı ve ark., 2015; Binici ve ark., 2022) ve biyomedikal malzemelerin (Greish ve ark., 2005) tasarımında bir hayli dikkat çekmektedir. Ayrıca; canlılarda ilaç etkileşimlerini tespit etmek amacıyla da fosfazener kullanılmaktadır (Koçak ve ark., 2013; Ozay & Ozay 2014; Sun ve ark., 2015). Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada; biyoteknolojik önemleri oldukça geniş olan fosfazenerden yeni sentezlenmiş olan bazı fosfazene gruplarının *S. cerevisiae* hücre kültürü oksidatif stres modelinde biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Fosfazene Molekülleri

Bu moleküllerin sentezi TÜBİTAK tarafından desteklenen TBAG-107T407 nolu proje ile yapılmıştır.

MATERYAL ve METOD

T3= 22 mg; T3A= 27mg; T3B= 28 mg; T3C= 27 mg; BrFOS= 20 mg; T4A= 20 mg; T4B= 20 mg; T4C= 20 mg tartılarak 5 ml DMSO (dimethyl sülfokside)'da çözdürüldü. Kültür ortamına ekim yapıldı kadar + 4 °C de bekletildi.

Maya Kültür Ortamının Hazırlanması

Deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae* gelişimi ve çoğalması için YEPD (200 mL için; 2 g maya ekstraktı, 4 g baktopepton, 4 g glukoz) besiyeri ortamı her grup için tekrar sayısı (n) = 5 olacak şekilde hazırlandı.

Besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı:

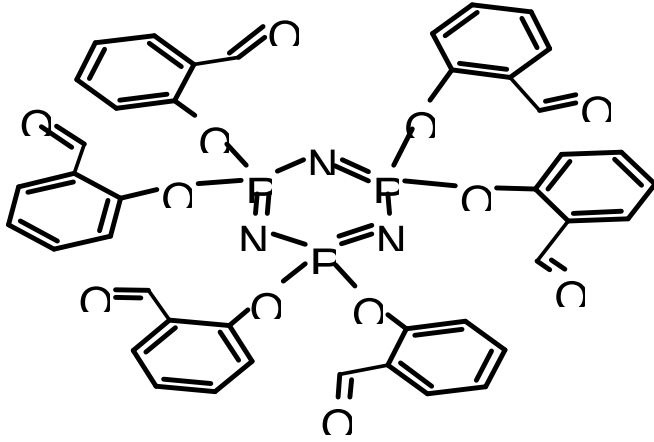
Kontrol grubu: Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri

için, YEPD besiyeri ortamı hazırlandı.

Fosfazen Uygulama Grupları: Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, YEPD besiyeri ortamı içerisine maya hücresi inoküle edildikten sonra OD600 değerleri 0.4-0.6 civarına [yaklaşık olarak 1-3 10⁷ hücre ml (Bergman, 2001)] ulaşıncaya fosfazen maddelerinin her birinden 30 µg konsantrasyon olacak şekilde gruplar hazırlandı. Ayrıca aynı şartlarda H₂O₂ grubu da hazırlanarak % 35'lik H₂O₂

karışımından 100 µL her bir H₂O₂ grubuna eklendi ve aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı.

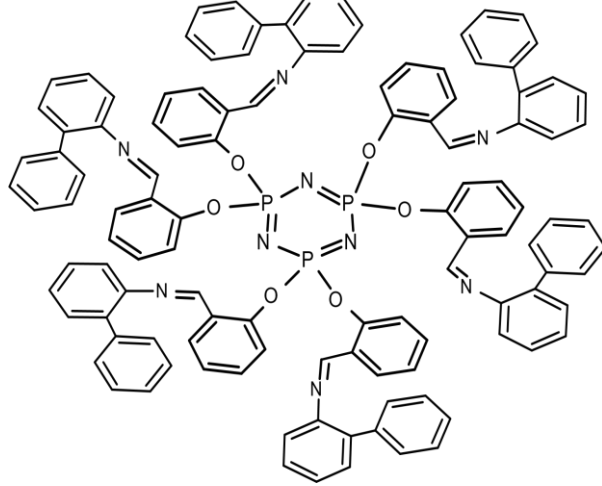
Her bir fosfazen madde ayrı bir grup olarak belirlenip deneysel çalışma işlemi yürütüldü ve aşılama işleminden sonra kültürler 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda laboratuvar şartlarında kültürlerin 517 nm'deki hücre yoğunlukları ölçüldükten sonra, 6000 rpm'de 5 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilerek hücreler



T3= Hexa (phenoxy) cyclotriphosphazene, Molekül ağırlığı: 861.621786

Şekil 1. T3= Hexa (phenoxy) cyclotriphosphazene, Molekül ağırlığı: 861.621786

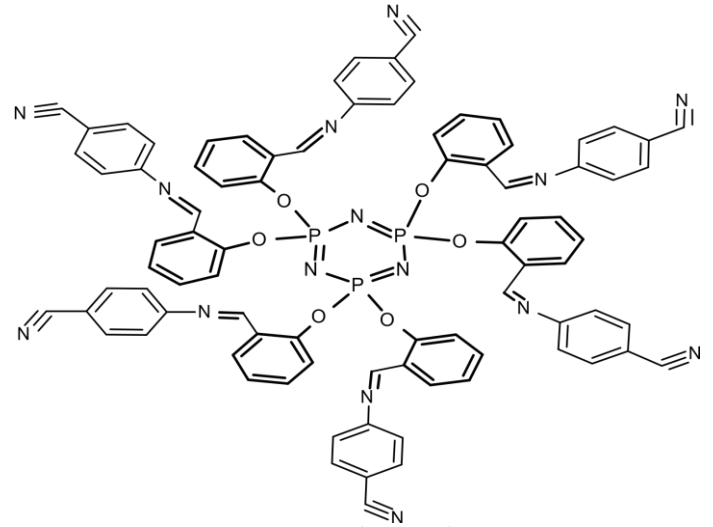
Figure 1. T3= Hexa (phenoxy) cyclotriphosphazene, Molecular weight: 861.621786



T3B= 2-aminobifenil (SALF2), Molekül ağırlığı:1768.864746

Şekil3. T3B= 2-aminobifenil (SALF2), Molekül ağırlığı:1768.864746

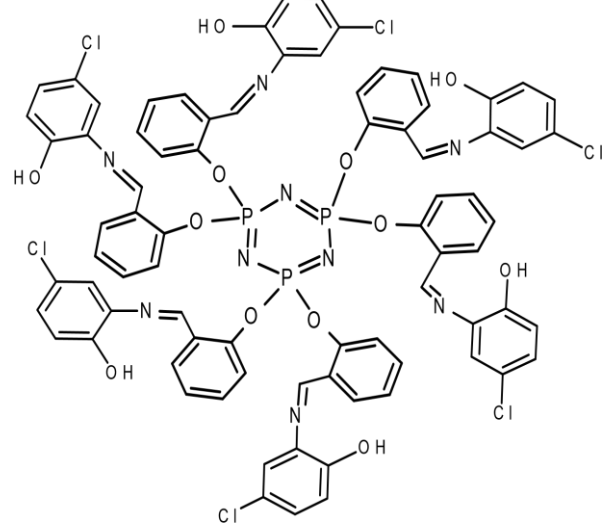
Figure 3. T3B= 2-aminobifenil (SALF2), Molecular weight:1768.864746



T3A= 4-aminobenzonitril (SALF1), Molekül ağırlığı: 1462.345746

Şekil 2. T3A= 4-aminobenzonitril (SALF1), Molekül ağırlığı: 1462.345746

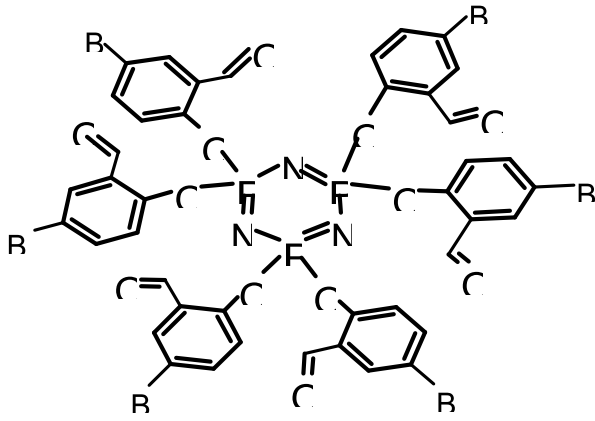
Figure 2. T3A= 4-aminobenzonitril (SALF1), Molecular weight: 1462.345746



T3C= 2-amino-4-klorofenol (SALF3), Molekül ağırlığı:1614.955746

Şekil 4. T3C= 2-amino-4-klorofenol (SALF3), Molekül ağırlığı:1614.955746

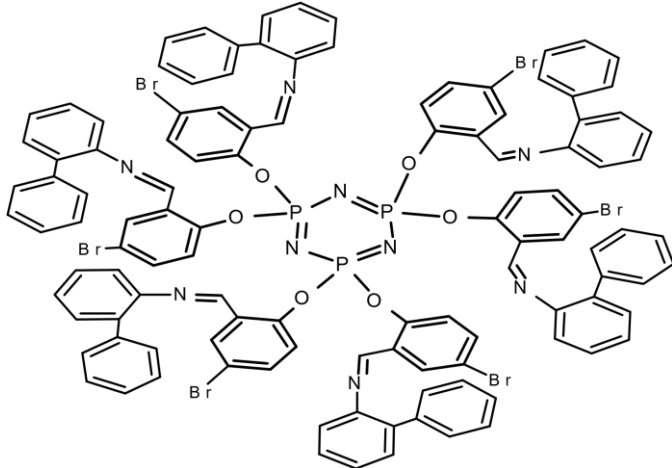
Figure 4. T3C= 2-amino-4-klorofenol (SALF3), Molecular weight:1614.955746



BrFOS= Hekza (4-Bromo-2-Formil-Fenoksi) Siklotrifosfazen, Molekül ağırlığı: 1334.998

Şekil 5. BrFOS= Hekza (4-Bromo-2-Formil-Fenoksi) Siklotrifosfazen, Molekül ağırlığı: 1334.998

Figure 5. BrFOS= Hekza (4-Bromo-2-Formil-Fenoksi) Siklotrifosfazen, Molecular weight: 1334.998



T4B= 2-aminobifenil, Molekül ağırlığı: 2242.241

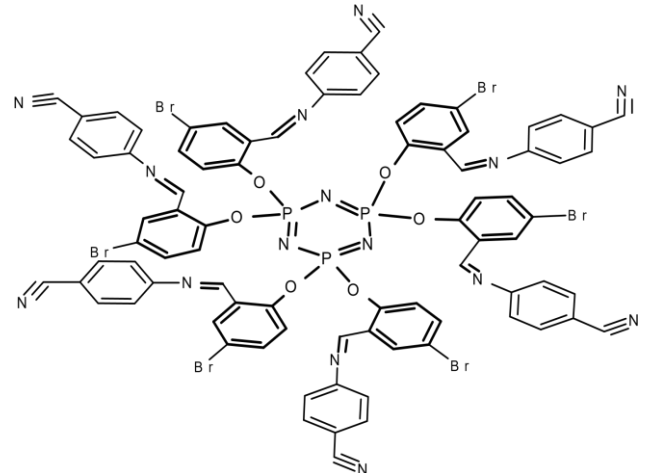
Şekil 7. T4B= 2-aminobifenil, Molekül ağırlığı: 2242.241

Figure 7. T4B= 2-aminobifenil, Molecular weight: 2242.241

toplandı. Hücreler pellet olarak toplandıktan sonra yaş ağırlıkları belirlendi. Hücre pelletleri, 20 mM Tris HCl-baz (pH= 7.4) ve 20 mM EDTA karışımı ile homojenize edilip santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı ile GST ve total protein, pelet kısmı ile yağ asidi ölçümleri yapıldı.

Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi

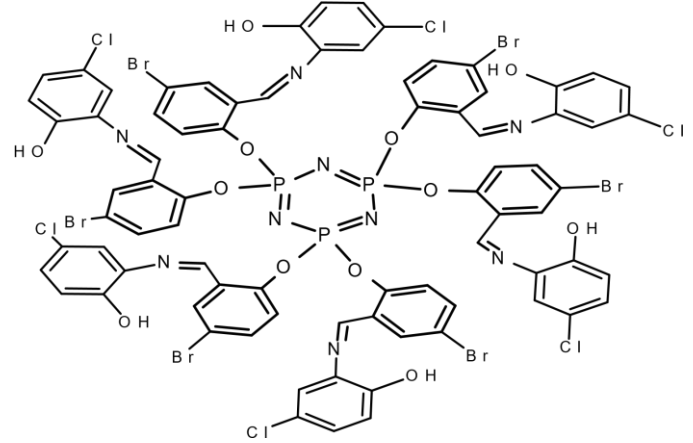
Örneklerin total protein miktarlarının ölçümü Lowry (1950) yöntemine göre yapıldı. Gruplar 750 nm'de blank'a karşı okundu ve okunan değerlere göre Şekil 9'daki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerin protein miktarları elde edilen bu kalibrasyon eğrisindeki denklem vasıtasıyla hesaplandı, sonuçlar (mg/g) şeklinde verildi.



T4A= 1.4-aminobenzonitril, Molekül ağırlığı: 1935.722

Şekil 6. T4A= 1.4-aminobenzonitril, Molekül ağırlığı: 1935.722

Figure 6. T4A= 1.4-aminobenzonitril, Molecular weight: 1935.722



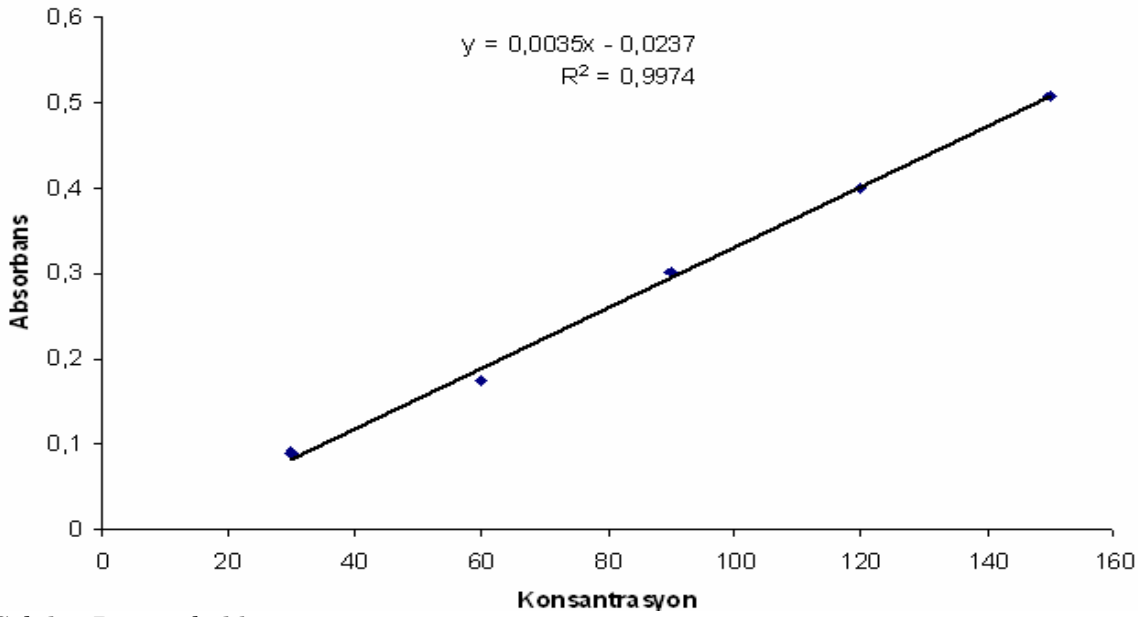
T4C= 2-amino-4-klorofenol, Molekül ağırlığı: 2088.332

Şekil 8. T4C= 2-amino-4-klorofenol, Molekül ağırlığı: 2088.332

Figure 8. 2-amino-4-klorofenol, Molecular weight: 2088.332

Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesi Tayini

Glutasyon S-transferaz tayini Habig (1974) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. GST'nin bütün izozimleri için 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CdNB) substrat olarak kullanılır. GST enzimi tarafından CdNB, indirgenmiş glutasyon (GSH) ile konjuge edilerek glutasyonun oksidasyonuna bağlı olarak 340 nm'de absorbans yükselmektedir. Enzim aktivitesinin tayini için 3 dakika boyunca 340 nm'de yükselen absorbanslar okunarak 340 nm'de ($\epsilon=340: 9,6 \text{ mM cm}^{-1}$) 1 dakikada supernatantta bulunan 1 mg toplam protein başına oluşturulan tioeter miktarı belirlenmiştir.



Şekil 9. Protein kalibrasyon eğrisi
Figure 9. Protein calibration curve

Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Hücre peleti örneklerinde yağ asidi ekstraksiyonu Hara ve Radin tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı (Hara & Radin, 1978). Doku örnekleri 3:2 (v/v) oranında hekzan-isopropanol karışımı ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası bu homojenat +4 °C'de 9050 × g'de 10 dk. santrifüj edilerek elde edilen üst kısımdan yağ asidi analizi yapıldı.

Yağ asidi bileşimini belirlemek için ayrılan örneklerin üzerine %2'lik metanolik sülfürik asitten ilave edildi, iyice karıştırılarak 55 °C'de 15 saat etüvde metilleşmeye bırakıldı (Christie, 1999). Süre sonunda tüpler etüvden çıkarıldı, soğuduktan sonra %5'lik NaCl ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri hekzan ile ekstrakte edildi ve hekzan fazı üstten pipetle alınarak %2'lik potasyum bikarbonat (KHCO₃) ile muamele edildi ve fazların ayrılması için 10 saat beklendi. Süre sonunda metil esterlerini içeren karışımların, 45 °C'de ve azot gaz akımı altında çözücüleri uçuruldu, 1 mL n-heptan ile çözüldü ve yağ asidi metil esterleri gaz kromatografisinde analiz edildi. Bu analiz için SPTM-2380 kapiler GC kolon (L×ID. 30 m × 0,25 mm, df 0,20 µm) (Sigma) kullanıldı.

Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Lipit ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra Shimadzu marka GC 2001 Plus gaz kromatografisi ile analiz edildi. Analiz sırasında kolonun sıcaklığı 148–218 °C, enjeksiyon sıcaklığı 245 °C ve dedektör sıcaklığı 290 °C olarak tutuldu. Kolon sıcaklık programı 148 °C'den 218 °C'ye kadar programlandı. Sıcaklık artışı 180 °C'ye kadar 5

°C dk⁻¹ ve 200 °C'den 218 °C'ye kadar 4 °C dk⁻¹ olarak ayarlandı. 218 °C'de 4 dakika tutulacak ve toplam süre 28 dakika olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanıldı. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemde sonra gerekli programlamalar yapılarak örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizleri yapıldı (Tvřzicka ve ark., 2002).

A, D, E ve K Vitamin ve Ergosterol Miktarlarının HPLC Cihazı ile Analizi

A, D, E ve K vitaminleri ve steroller için alınan örneklerin üzerine % 5'lik metanolik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ilave edildi. Örnekler vortekslendikten sonra 85 °C'de 30 dk etüvde bekletildi. Sabunlaşmayan lipofilik kısma 5 mL HİP karışımı ilave edildi ve 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda üst faz alınıp 37 °C'de azot ortamında buharlaşmaya bırakıldı. Kalan kısım 1 mL (% 60+ % 40,v/v) asetonitril/ metanol karışımında çözümlenerek otosampler viallerine alındı. Analiz, Shimadzu marka HPLC cihazı ile yapıldı. (Sánchez-Machado vd., 2002; Lopez-Hernandez vd., 2006).

İstatistiksel Analizler

İstatistik analizleri için, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırmada ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi ve grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise LSD testi

kullanıldı. Sonuçlar mean \pm SEM olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi için p değerleri dikkate alınarak $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu başlık altında, yalnızca araştırmadan elde edilen bulgular sunularak, konuyla ilgili daha önceden gerçekleştirilmiş benzer ve dolaylı çalışmalarla atıf

yapmak kaydıyla bulgular karşılaştırılır. Benzer ve farklı yanlar vurgulanır ve yayına sunulan çalışmada diğer çalışmalara göre neden farklı bir bulgu elde edildiği tartışılır. Sonrada bu tartışma üzerinden araştırmada elde edilen bulgular istikametinde alanın uzmanı olarak yorum yapılır. Bu bölümde, deneysel sonuçların net bir sunumu yapılmalıdır (Çizelge 1).

Çizelge 1. T4 grubu fosfazenlerin GST aktivitesive total protein değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi

Table 1. Changes in GST activity and total protein values of T4 group phosphasens compared to the control group

	Kontrol	FOS	T4A	T4B	T4C	H ₂ O ₂
Total Protein (mg/g pellet)	95.46 \pm 0.57	128.46 \pm 3.40 ^d	110.94 \pm 1.03 ^d	94.81 \pm 0.98 ^a	109.07 \pm 2.04 ^d	105.51 \pm 1.72 ^e
GST (U/mg)	0.26 \pm 0.00	0.96 \pm 0.00 ^d	0.56 \pm 0.00 ^d	0.43 \pm 0.00 ^d	0.47 \pm 0.00 ^d	0.46 \pm 0.01 ^d

a: $p > 0.05$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p < 0.05$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p < 0.01$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p < 0.001$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Fosfazen Gruplarının *Saccharomyces cerevisiae*'da Yağ Asidi Profili Üzerindeki Etkisi

T3 grubu fosfazenlerin yağ asidi değerleri kontrol grubu karşılaştırıldığı zaman, kaprilik ve laurik asitlerin kontrol grubuna göre fosfazen ilave edilen gruplarda azaldığı belirlendi ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). 14:0 miktarının, fosfazen T3A grubu ile H₂O₂ gruplarında yüksek düzeyde olduğu saptandı

($p < 0.05$, $P < 0.001$). 16:0 düzeyinin; T3, T3A ve T3B gruplarında yüksek düzeyde olduğu halde H₂O₂ ile T3C grubunda farklılık olmadığı belirlendi ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Palmitoleik asit miktarının ise T3A, T3B ve T3C gruplarında azaldığı tespit edildi ($p < 0.01$, $p < 0.001$). 18:0 miktarı, T3, T3B ve T3C gruplarında, 18:1 n-9 miktarının ise T3, T3A ve T3B gruplarında yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Çizelge 2).

Çizelge 2. T3 grubu fosfazenlerin yağ asitleri değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi (%)

Table 2. Change of fatty acid result of T3 group phosphazene molecules compared to the control group (%)

Yağ asitleri	Kontrol	T3	T3A	T3B	T3C	H ₂ O ₂
8:0	4.25 \pm 0.53	2.27 \pm 0.04 ^d	4.65 \pm 0.16 ^d	3.02 \pm 2.71 ^d	3.10 \pm 3.52 ^b	4.45 \pm 0.24 ^a
12:0	3.34 \pm 0.12	2.34 \pm 1.37 ^b	2.73 \pm 0.10 ^c	2.40 \pm 0.31 ^b	1.34 \pm 0.06 ^d	3.26 \pm 0.17 ^a
14:0	4.51 \pm 0.15	4.38 \pm 0.08 ^a	7.08 \pm 0.19 ^d	4.55 \pm 0.04 ^a	4.42 \pm 0.15 ^a	5.22 \pm 0.15 ^b
16:0	42.52 \pm 0.60	43.31 \pm 0.51 ^b	45.25 \pm 0.24 ^d	47.83 \pm 0.41 ^d	42.45 \pm 0.39 ^a	41.80 \pm 0.47 ^a
16:1, n-7	12.46 \pm 0.32	11.13 \pm 0.13 ^a	8.62 \pm 0.25 ^c	9.79 \pm 0.11 ^c	7.07 \pm 0.45 ^d	12.29 \pm 0.28 ^a
18:0	14.64 \pm 0.13	16.19 \pm 0.87 ^b	15.30 \pm 0.11 ^a	27.15 \pm 0.67 ^d	22.46 \pm 0.1 ^d	14.01 \pm 0.46 ^a
18:1, n-9	17.22 \pm 0.26	19.73 \pm 0.24 ^b	14.97 \pm 0.14 ^b	14.83 \pm 0.30 ^b	18.07 \pm 0.19 ^a	17.71 \pm 0.08 ^a
18:2, n-6	0.39 \pm 0.14	0.32 \pm 0.21 ^a	0.47 \pm 0.02 ^a	0.58 \pm 0.06 ^b	0.35 \pm 0.03 ^a	0.54 \pm 0.12 ^b
18:3, n-3	0.67 \pm 0.14	0.60 \pm 0.14 ^a	0.56 \pm 0.14 ^a	0.44 \pm 0.14 ^b	0.74 \pm 0.14 ^a	0.86 \pm 0.14 ^b
Σ Doymuş	69.29	68.69	75.01	84.95	85.03	68.74
Σ Doymamış	30.74	31.31	28.99	15.05	14.97	31.26

a: $p > 0.05$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p < 0.05$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p < 0.01$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p < 0.001$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

T4 grubu fosfazenlerin yağ asidi değerleri kontrol grubu karşılaştırıldığı zaman, kaprilik (8:0) ve laurik (12:0) asitlerin kontrol grubuna göre fosfazen ilave edilen gruplarda azaldığı belirlendi ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Kaprilik asitin (8:0) T4A grubunda kontrol grubuna göre kısmen yüksek olduğu saptandı ($p < 0.05$). 14:0 (miristik asit) miktarının, fosfazen grupları ile H₂O₂ grubunda değişik oranlarda azaldığı saptandı ($p < 0.01$, $p < 0.001$). 16:0 (palmitik asit) düzeyinin; T4A, T4C ve H₂O₂ gruplarında azaldığı tespit edildi ($p < 0.001$). Palmitoleik asit miktarının ise

T4A, T4C ve H₂O₂ gruplarında yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$, $p < 0.01$). 18:0 (stearik asit) ve 18:1 n-9 (oleik asit) düzeylerinin, kontrol grubu dışında H₂O₂ ile fosfazen gruplarında değişik oranlarda yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Çizelge 3).

T3 grubu fosfazen moleküllerin ortak bir şekilde palmitoleik ve oleik asitlerde azalmaya neden olmaları; hücredeki Delta 9 Desaturaz enzim aktivitesi üzerinde engelleyici bir etkiye sahip olmalarından kaynaklanabileceği sonucunu düşündürmektedir. Çünkü bu yağ asitlerin

sentezinde Delta 9 enzimi kullanılmaktadır. Bazı fosfazenler lipit seviyesini azaltırken bazıları arttırmaktadır. Bu azalış ve artış uygulanan konsantrasyon seviyesinden etkilenmektedir. Bazıları belirli konsantrasyonda maya hücresindeki yapıları etkilerken bazıları ise her konsantrasyonda etkilemektedir (Özşahin & Bozhan 2018). Duan ve ark. (2015)' nin sonuçları ışığında; hücrel lipit içeriğinde, farklı maddelerin eklenmesi doymamış yağ asitlerinde artışa neden olduğu gibi bazı

şartlarda da azalışa neden olmaktadır. *S. cerevisiae*'nin anaerobik koşullar altında büyümesi için doymamış yağ asitleri (UFA'lar) gereklidir. Bunlar sadece membran bütünlüğünü ve fonksiyonunu korumak için değil, aynı zamanda yüksek şeker ve etanol toksisitesi gibi fermentasyon streslerine uyum sağlamak için de gereklidir. *S. cerevisiae* uzun zincirli yağ asitlerini besi ortamından alabilir. Çünkü bu yağ asitlerini sentezleyen yağ asidi sentez enzimleri maya hücresinde bulunmamaktadır.

Çizelge 3. T4 grubu fosfazenlerin yağ asitleri değerlerinin kontrol grubuna göre değişimi (%)

Table 3. Change of fatty acid result of T4 group phosphazene molecules compared to the control group (%)

Yağ asitleri	Kontrol	FOS	T4A	T4B	T4C	H ₂ O ₂
8:0	2.01±0.31	1.88±0.27 ^a	1.51±0.15 ^b	1.36±0.16 ^b	1.32±0.40 ^b	0.92±0.02 ^c
12:0	4.28±0.17	2.16±0.28 ^d	3.64±0.12 ^b	4.03±0.19 ^a	5.67±0.15 ^b	4.09±0.31 ^a
14:0	6.46±0.11	4.05±0.17 ^c	3.66±0.13 ^d	4.25±0.06 ^c	4.22±0.12 ^c	2.51±0.14 ^d
16:0	44.88±1.05	44.28±0.61	39.87±0.88 ^d	44.21±1.05	38.22±0.55 ^d	37.53±0.81 ^d
16:1. n-7	8.35±0.43	8.70±0.10 ^a	9.29±0.28 ^b	8.37±0.11 ^a	9.22±0.28 ^b	10.83±0.22 ^c
18:0	20.29±0.43	23.20±0.19 ^b	22.42±0.39 ^b	22.11±0.53 ^b	22.49±0.40 ^b	22.77±0.29 ^b
18:1. n-9	13.03±0.09	14.81±0.13 ^b	18.96±0.29 ^d	14.77±0.34 ^b	18.06±0.21 ^d	20.60±0.18 ^d
18:2. n-6	0.43±0.02	0.53±0.02	0.52±0.02	0.63±0.02	0.48±0.02	0.61±0.02 ^b
18:3. n-3	0.27±0.02	0.33±0.02	0.37±0.02	0.27±0.02	0.32±0.02	0.34±0.02
ΣDoymuş	77.92	75.57	71.1	75.96	71.92	67.82
ΣDoymamış	22.08	24.43	28.9	24.04	28.08	32.18

a: p>0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p<0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p<0.001 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Fosfazen Gruplarının *Saccharomyces cerevisiae*'da Lipofilik Moleküller Üzerine Etkisi

T3 grubu fosfazenlerin lipofilik moleküller üzerine etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; ergosterol düzeyinin T3,T3B ile H₂O₂ gruplarında yüksek olduğu halde (p<0.05,p<0.001); diğer gruplarda farklılık göstermediği gözlemlendi. Stigmasterol ve

betasitosterol miktarlarının ise kontrol grubuna göre bütün gruplarda azaldığı saptandı (p<0.05, p<0.01, p<0.001). Alfa tokoferol düzeyinin T3 ve T3A gruplarında yüksek olduğu (p<0.001), T3B ile T3C gruplarında ise azaldığı belirlendi (p<0.05) (Çizelge 4).

Çizelge 4. T3 grubu fosfazenlerin lipofilik moleküller üzerindeki etkisinin değişimi (µg /g)

Table 4. Variation of the effect T3 group phosphazenes on lipophilic molecules (µg /g)

Vitaminler	Kontrol	T3	T3A	T3B	T3C	H ₂ O ₂
R Tok	0.04±0.00	0.08±0.00 ^a	0.14±0.01 ^d	0.06±0.00 ^a	0.04±0.00 ^a	0.04±0.00 ^a
D2	0.16±0.00	0.31±0.00 ^a	1.25±0.12 ^d	0.74±0.11 ^d	0.12±0.00 ^a	0.19±0.00 ^a
A Tok	9.80±0.27	12.00±0.40 ^d	15.29±0.31 ^d	7.47±0.20 ^b	7.58±0.54 ^b	9.03±0.14 ^a
Ergosterol	310.84±0.68	608.87±4.25 ^d	323.00±2.17 ^a	366.75±3.10 ^b	312.58±0.66 ^a	429.17±19.61 ^d
K1	5.37±0.78	9.98±0.61 ^d	7.66±0.49 ^b	2.50±0.18 ^b	8.01±0.29 ^c	6.33±0.54 ^a
Stigmasterol (mg /g)	1.39 ±96.28	1.23±16.36 ^b	1.16±14.28 ^c	0.70±17.99 ^d	0.93±12.47 ^d	0.67±14.05 ^d
Betasitosterol	5.04±0.21	2.77±0.30 ^d	2.09±0.02 ^d	1.50±0.16 ^d	2.40±0.07 ^d	1.23±0.02 ^d

a: p>0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: p<0.05 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: p<0.01 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: p<0.001 Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Lipofilik moleküller üzerine T4 grubu fosfazenlerin etkileri kontrol grubu kıyaslandığında; ergosterol düzeyinin fosfazen grupları ile H₂O₂ grubunda belirgin azaldığı saptandı (p<0.001). Stigmasterol

miktarının kontrol grubuna göre FOS, T4A ve T4B gruplarında; betasitosterolün ise H₂O₂ ile fosfazen gruplarında azaldığı gözlemlendi (p<0.001). Alfa tokoferol seviyesinin kontrol grubu dışındaki

gruplarda yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 5).

Ergosterol bulunduğu gibi başta *S. cerevisiae* olmak üzere maya hücrelerinin membran yapısının en önemli moleküler bileşenleridir. Hücredeki anormal durumlara karşı ergosterol miktarında artış olduğu ileri sürülmüştür. Mayaların; biyoetanol fermentasyonları sırasında farklı fiziksel, biyolojik veya kimyasal streslerin bir kombinasyonu ile karşı karşıya kaldıkları belirtilmiştir. Fermentasyonun başlangıcında; maya yüksek şeker seviyeleri nedeniyle ozmotik strese maruz kalır. Yapılan çalışmalarda; maya hücresinin yüksek konsantrasyonlarda kompleks moleküller içeren bir

ortama bırakıldığında da ozmotik şokla karşılaşacağı ileri sürülmüştür (Spencer ve ark., 2014). Fermentasyon sırasında etanol birikimi, pH'nın azalması, anaerobik büyümeye geçiş ve besin sınırlaması gibi diğer stres koşullarının da önem kazandığı ve fermentasyon sırasında, etanol birikiminin maya büyümesini ve canlılığını engellediği vurgulanmıştır (Spencer ve ark., 2014). Fermentasyon ortamında oksijen bulunmasının önemli bir kriter olduğu ve doymamış yağ asidi sentezinde görev alan enzimler ile sterollerin sentezinin oksijenli ortamda gerçekleştiği belirtilmiştir (Spencer ve ark., 2014).

Çizelge 5. T4 grubu fosfazenlerin lipofilik moleküller üzerindeki etkisinin değişimi ($\mu\text{g/g}$)
Table 5. Variation of the effect T4 group phosphazenes on lipophilic molecules ($\mu\text{g/g}$)

Lipofilik moleküller	Kontrol	FOS	T4A	T4B	T4C	H ₂ O ₂
R Tok	0.56±0.08	0.45±0.00 ^a	0.14±0.08 ^d	0.55±0.01 ^a	0.21±0.00 ^d	0.50±0.00 ^a
D2	0.25±0.01	0.28±0.00 ^a	0.31±0.00 ^a	0.12±0.00 ^b	0.32±0.01 ^a	0.43±0.11 ^b
A Tok	0.10±0.01	0.17±0.01 ^b	0.26±0.00 ^d	0.13±0.00 ^d	0.11±0.00 ^d	0.36±0.01 ^d
Ergosterol	445.82±14.27	119.36±3.19 ^d	76.72±11.34 ^d	123.69±2.48 ^d	151.37±3.64 ^d	269.60±3.09 ^d
K1	1.61±0.14	0.57±0.02 ^d	1.30±0.08 ^a	1.31±0.14 ^a	1.57±0.16 ^a	1.43±0.06 ^a
Stigmasterol(mg/g)	2.63±0.08	1.57±0.06 ^d	1.81±0.04 ^d	1.81±0.09 ^d	2.42±0.04 ^a	2.48±0.07 ^a
Betasterol	26.71±0.77	10.74±5.16 ^d	8.85±2.05 ^d	14.40±0.92 ^d	7.44±0.22 ^d	14.58±0.18 ^d

a: $p>0.05$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değil

b: $p<0.05$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan kısmen önemli

c: $p<0.01$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önem derecesi yüksek

d: $p<0.001$ Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan belirgin düzeyde önemli

Yapılan bazı çalışmalarda fosfazenlerin hücre yoğunluklarını azalttığı tespit edilmiştir. Bununla beraber bakteri ve maya suşlarında yapılan fosfazen ilavelerinin E vitamini gibi antioksidanların miktarında artışa neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca herhangi bir stres karşısında ya da H₂O₂ gibi maddelere maruz kalma durumunda membran yapısında bulunan bazı doymamış yağ asitleri ile ergosterol sentezi düzenlenerek sıvı mozaik yapı yani membranın temel yapısı korunduğu ileri sürülmüştür.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarımız biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda en önemli model olarak kullanılan *S. cerevisiae* kültür ortamına biyolojik etkinliği yüksek olan fosfazen moleküllerin ilave edilmesi sonucu yağ asidi ve ergosterol düzeylerinde önemli varyasyonlara neden olduğunu göstermektedir. H₂O₂ ve fosfazenler ilave edildiğinde; yağ asidi sentezi, yağ asidi zincir uzaması ve yağ asitlerinin hidrokarbon zincirine çift bağ girişi yapan enzimlerin son ürünlerinde artışlara ya da azalışlara neden olmuştur.

Yapılan uygulamalar ile; H₂O₂ ilavesinin hücrelerin gen düzeylerinde bazı genleri aktive ederek biyokimyasal olaylar üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçların hem pozitif yönde hem de negatif yönde yürüdüğü belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma. Bitlis Eren Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından BEBAP 2019.008 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Allcock, H.R., Morrissey, W.K. & Winograd N. (1996). Controlled Formation of Carboxylic Acid Groups at Polyphosphazene Surfaces; Oxidative and Hydrolytic Routes. *Chemistry of Materials*. 8, 2730-2738.
- Bergman, L.W. (2001). Growth and Maintenance of Yeast. 2001. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 177. Two Hybrid Systems: Methods and Protocols Edited by: P. N. MacDonald © Humana Press Inc.. Totowa, NJ
- Binici, A., Okumuş, A., Yakut, M., Elmas, G., Kılıç, Z., Koyunoğlu, D., Açık, L. & Şimşek, H. (2022).

- Phosphorus-nitrogen compounds. Part 56. Comparative syntheses and spectral properties of multiheterocyclic 2-cis-4-ansa and spiro-ferrocenyl (N/O)cyclotriphosphazenes: Antituberculosis and antimicrobial activity and DNA interaction studies. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 197(1), 18-29.
- Carriedo, G.A., Alonso, F.J.G., Elipe, P.G., Brillans, E. & Julia, L. (1996). Incorporation of Stable Organic Radicals into Cyclotriphosphazene: Preparation and Characterization of Mono – and Diradical Adducts. *Journal of the Organic Letters*. 3, 1625-1628.
- Christie, W.W. (1992). Gas Chromatography and Lipids. Glaskow. The Oil Press.
- Civan, M. (2014). Bazı Trimerik Fosfazen Türevlerinin Sentezi. Kristalografik. Spektroskopik Yöntemler ile İncelenmesi ve Langmuir-Blodgett Tekniği Kullanılarak Ultra-İnce Filmlerinin Hazırlanması. Doctor of Philosophy. *Department of Physics Engineering*. 358.
- Duan, L.L., Shi, Y., Jiang, R., Yang, Q., Wang, Y.Q., Liu, P.T., Duan, C.Q. & Yan, G.L. (2015). Effects of Adding Unsaturated Fatty Acids on Fatty Acid Composition of *Saccharomyces cerevisiae* and Major Volatile Compounds in Wine. Centre for Viticulture and Oenology. College of Food Science and Nutritional Engineering. *China Agricultural University*. Beijing 100083. 36(2), 285-295.
- Dumanoğulları, F. (2006). Bs (Fenoks) Fosfazen Türevlerinin Sentez ve Yapıları. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Anabilim Dalı. Ankara.
- Erdener Çıralı, D., Dayan, O., Özdemir, N. & Hacıoğlu, N. (2015). A New Phosphazene Derivative, spiro-N₃P₃[(O₂C₁₂H₈)₂(OC₆H₆N-3)₂], and its Ru(II) complex: Syntheses, crystal structure, catalytic activity and antimicrobial activity studies. *Polyhedron*. 88, 170-175.
- Greish, Y.E., Bender, J.D., Lakshmi, S., Brown, P.W., Allcock, H.R. & Laurencin, C.T. (2005). Low temperature formation of hydroxyapatite-poly(alkoxybenzoate)phosphazene composites for biomedical applications. *Biomaterials*. 26:1-9.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22), 7130-7139.
- Hara, A. & Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. 90(1), 420-426.
- İşıklan, M., Asmafiliz, N., Özalp, E.E., İlter, E.E., Kılıç, Z., Çoşut, B., Yeşilot, S., Kılıç, A., Öztürk, A., Hökelek, T., Koc, L.Y., Acık, L. & Akyüz, E. (2010). Syntheses, Structure Investigations, Biological Activities and DNA Interactions of New N/O Spirocyclic Derivatives. The NMR Behaviors of Chiral Phosphazenes with Stereogenic Centers Upon The Addition of Chiral Solvating Agents. *Inorganic Chemistry*. 49:7057-7071.
- Kılıç, A., Beğec, S., Çetinkaya, B., Kılıç, Z., Gündüz, N., Yıldız, M. & Hökelek, T. (1996). Unusual products in the reaction of hexachlorocyclotriphosphazatriene with sodium aryl oxides. *Journal of Heteroatom Chemistry*. 44(7), 249-256.
- Koçak, S.B., Koçoğlu, S., Okumuş, A., Kılıç, Z., Öztürk, A., Hökelek, T., Öner, Y., & Açık, L. (2013). Syntheses, Spectroscopic Properties, Crystal Structures, Biological Activities and DNA Interactions of Heterocyclic Amine Substituted Spiro-Ansa-Spiro- and Spiro-Bino-Spiro-Phosphazenes. *Inorganica Chimica Acta*. 406, 160-170.
- Laguna, M.T.R., Tarazona, M.P., Carriedo, G.A., Allonso, F.J.G., Fidalgo, J.I., & Saiz, E. (2002). Thermal degradation and solution properties of poly (2, 2' – dioxybiphenylphosphazene). *Journal of Macromolecules*. 35, 7505-7515.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with The Folin-Phenol Reagent. *The Journal of Biochemistry*. 193, 265- 277.
- Okutan, E., Aydın, G.O., Hacivelioglu, F., Kılıç, A., Beyaz, S.K., & Yeşilot, S. (2011). Synthesis and Characterization of Soluble Multi-Walled Carbon Nanotube/Poly(Organophosphazene) Composites. *Polymer*. 52,1241-1248.
- Onder, A., & Ozay, H. (2021). Synthesis and Characterization of Biodegradable and Antioxidant Phosphazene-Tannic Acid Nanospheres and Their Utilization as Drug carrier Material. *Materials Science and Engineering:C*. 120, 111723.
- Ozay, H., & Ozay, O. (2014). Synthesis and Characterization of Drug Microspheres Containing Phosphazene for Biomedical Applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 450, 99-105.
- Özşahin, A.D., & Bozhan, N. (2018). Bazı Schiff Bazlarının *S. cerevisiae* BY4741 Kültür Ortamlarında Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*. 21(2), 131-140.
- Özşahin, A.D., Beşer, D., Öztürk, A.İ., Aslan, F., & Yılmaz, Ö. (2020). Siklofosfazen Türevlerinin Maya Kültür Ortamlarında Malondialdehit, Glutasyon ve Total Protein Miktarları Üzerine Etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*. 23(2), 281-288.
- Özşahin, A.D., Erdoğan, A., Kireççi, O.A., & Yılmaz, Ö. (2022). Aromatik Halkalı Bazı Fosfazenlerin *S. cerevisiae* L. Kültüründe Biyokimyasal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*. 25(2), 234-242.

- Öztürk, A.İ., Yılmaz, O., Kirbag, S., & Arslan, M. (2000). Antimicrobial and Biological Effects of Ipermphos and Amphos on Bacterial and Yeast Strains. *Cell Biochemistry and Function*. 18(2), 117-126.
- Sazhin, S.V., Harrup, M.K., & Gering, K.L. (2011). Characterization of Low-Flammability Electrolytes for Lithium-Ion Batteries. *Journal of Power Sources*. 196: 3433–3438.
- Siwy, M., Sek, D., Kaczmarczyk, B., Jaroszewicz, I., Nasulewicz, A., Pelczynska, M., Nevozhay, D., & Opolski, A. (2006). Synthesis and In Vitro Antileukemic Activity of Some New 1,3-(Oxytetraethylenoxy) Cyclotriphosphazene Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49, 806-810.
- Spencer, J., Phister, T.G., Smart, K.A., & Greetham, D. (2014). Tolerance of Pentose Utilising Yeast to Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *BMC Research Notes*. 7, 151.
- Sun, L., Liu, T., Li, H., Yang, L., Meng, L., Lu, Q., & Long, J. (2015). Fluorescent and Cross-Linked Organic-Inorganic Hybrid Nanoshells for Monitoring Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 7, 4990–4997.
- Şenkuytu, E., Akbaş, N., Yıldırım, T., & Yenilmez Çiftçi, G. (2022). The bioactive new type paraben decorated dispiro-cyclotriphosphazene compounds: synthesis, characterization and cytotoxic activity studies. *The Journal of Molecular Structure*. 1255, 132438.
- Tvrzicka, E., Vecka, M., Stankova, B., & Zak, A. (2002). Analysis of Fatty Acids Inplasma Lipoproteins by Gas Chromatography Flame Ionisation Detection Quantative Aspects. *Analytica Chimica Acta*. 465, 337-350
- Uslu, A., & Yeşilot, S. (2015). Chiral configurations in cyclophosphazene chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*. 291, 28-67.
- Xia, Y., Shen, J., Alamri H. Zhan, J., Wang, Y., Zhang, G. (2017). Revealing the Cytotoxicity of Residues of Phosphazene Catalysts Used for the Synthesis of Poly(Ethylene Oxide). *Biomacromolecules*. 18(10), 3233-3237.