

## Siklofosfazen Türevlerinin Maya Kültür Ortamlarında Malondialdehit, Glutasyon ve Total Protein Miktarları Üzerine Etkileri

Ayşe Dilek ÖZŞAHİN<sup>1\*</sup>, Derya BEŞER<sup>2</sup>, Ali İhsan ÖZTÜRK<sup>3</sup>, Fatih ASLAN<sup>4</sup>, Ökkeş YILMAZ<sup>5</sup>

<sup>1,2</sup>Bitlis Eren Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis, <sup>3</sup>Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Osmaniye, <sup>4</sup>Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Şanlıurfa, <sup>5</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, TÜRKİYE

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-1832-7082> <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-8592-6261>, <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-3912-0670>

<sup>4</sup><https://orcid.org/0000-0002-5948-6979>, <sup>5</sup><https://orcid.org/0000-0002-8276-4498>

✉: molekuler@gmail.com

### ÖZET

Bu çalışmada; yeni sentezlenmiş beş schiff bazının *S. cerevisiae* kültür ortamlarında toplam protein, glutasyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) analizleri yapıldı. *S. cerevisiae*'nin gelişimi ve çoğalması için YEPD besiyeri ortamı hazırlandı. Uygulama grupları için; schiff bazların her birinden 10 mg/mL 'lık ve 20 mg/mL 'lık konsantrasyonları kültür ortamına ilave edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen besiyeri ile toplam protein, glutasyon (GSH), okside-glutasyon (GSSG) ve MDA analizleri yapıldı. Kontrol grubu ile schiff bazı gruplarının sonuçları karşılaştırıldığında; yeni sentezlenmiş schiff bazlarının *S. cerevisiae*'da; toplam protein, GSH ve MDA miktarlarını arttırdığı belirlendi. Sonuç olarak; yeni sentezlenmiş schiff bazlarının özellikle antioksidan savunma etkisi ve sitotoksik özelliği ile gelecekte hastalık tedavilerine yönelik yapılacak olan çalışmalara destek olacağı ve literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 02.08.2019

Kabul Tarihi : 28.11.2019

#### Anahtar Kelimeler

Glutasyon

MDA

*Saccharomyces cerevisiae*

Schiff bazı

Toplam Protein

## Effects of Cyclophosphazene Derivatives on Malondialdehyde, Glutathione and Total Protein Content in Yeast Culture Media

### ABSTRACT

In this study; total protein, glutathione and lipid peroxidation (MDA) analyzes of five schiff bases that are newly synthesized were performed in *S. cerevisiae* culture media. YEPD medium was prepared for growth and multiplication of *S. cerevisiae*. Overall, 10 mg/mL and 20 mg/mL concentrations of schiff bases were added for the creation of application groups in to the culture medium. The obtained supernatant was used for total protein, glutathione (GSH), oxidized-glutathione (GSSG) and MDA analyzes. When the results of the control and schiff groups were compared; newly synthesized schiff bases in *S. cerevisiae* was determined to increase total protein, GSH and MDA concentration. As a conclusion, it is thought that newly synthesized schiff bases will support the future studies that will be carried out the antioxidant defense effect and cytotoxic properties and it is thought that will contribute to the literature.

### Research Article

#### Article History

Received : 02.08.2019

Accepted : 28.11.2019

#### Keywords

Glutathione

MDA

*Saccharomyces cerevisiae*

Schiff bases

Total Protein

**To Cite :** Özşahin AD, Beşer D, Öztürk Aİ, Aslan F, Yılmaz Ö 2020. Siklofosfazen Türevlerinin Maya Kültür Ortamlarında Malondialdehit, Glutasyon ve Total Protein Miktarları Üzerine Etkileri. KSU J. Agric Nat 23 (2): 281-288. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.600569.

### GİRİŞ

Fosfazenler; azot, fosfor halojen ve organik yan gruplar içeren bileşikler olarak bilinir. Fosfazenlerin yapısı azot ve fosfor arasında çift bağ bulunmasıyla oluşur (Shaw ve ark., 1962), yapılarında tekrarlanan -P=N- birimlerinden oluşan, her fosfor atomunda iki organik veya inorganik yan grupların bulunduğu lineer veya

halkalı yapıya sahip bileşiklerdir (Allcock, 1972; Gleria ve Jaeger, 2004).

Fosforun azot ile oluşturduğu bileşikler üç ana grupta incelenir. Fosfor ve azot arasındaki bağ sayısı tek olduğu zaman fosfazan ( $H_2N-PH_4$ ), çift bağ oluşturdukları zaman fosfazen ( $HN=PH_3$ ), üçlü bağ oluşturdukları zaman da fosfazin ( $N=PH_2$ ) olarak

isimlendirilir. Fosfazenler de monofosfazenler (düz zincirli fosfazenler = doğrusal fosfazenler), siklofosfazenler (halkalı fosfazenler) ve polifosfazenler olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılır. Siklofosfazenler veya polifosfazenler; biyokimyasal ve farmakoloji çalışmalarının en çok yapıldığı fosfazenlerdendir (Kılıç ve ark., 1996; Laguna ve ark., 2002). Bunlardan en çok çalışılan ve en iyi bilinen fosfazen bileşikleri heksaklorosiklotrifosfazen ve polifosfazenlerdir.

Fosfazenlerden; fosfor sinerjilerinden dolayı sıcaklık ve yanmaya dayanıklı bileşikler sentezlenmiş olup (Walker, 1972) yanmayı engelleyici özellikleri ile; tekstil, sentetik, kauçuk madde sanayisinde bu yeni bileşiklerle patent alınmıştır (Allen, 1993). Ayrıca sıvı kristal ve gaz geçirgenliği (Moriya ve ark., 2003; Allcock ve ark., 1993; Peterson ve ark., 1993), biyo uyum sağlama özelliği ile organ naklinde (Langone ve ark., 1995), protez kemik yapımında (Lakshmi ve ark., 2003; Bernheim ve ark., 1999), kontakt lens yapımında, diş tedavisinde dolgu malzemesi olarak, antibakteriyal özelliği ile (Van Der Huizen, 1984; Allcock, 1992) biyomedikalde kullanılmalarına yönelik çalışmalar mevcuttur (Laurencin ve ark., 1987). Ligand olarak ziridin bulunduran siklofosfazen türevlerinin güçlü antitümör etkisiyle (Van Der Huizen, 1984; Song ve ark., 2003) AIDS'e bağlı lenfomlara karşı koruyuculuğu tespit edilmiştir (Brandt ve ark., 2001). Sitotoksik, antikonvülzan (nörolojik hastalıklarda nöbet durumlarının önlenmesi ve tedavisinde), antiproliferatif (çoğalmı önleyen) olarak biyolojik alanlarda kullanılmıştır. Maya hücrelerine ve bakterilere etki gösterdiği çalışmaları da yer almaktadır (Öztürk ve ark., 2000; Yılmaz ve ark., 2002).

Yeni formüle edilen fosfazen türevlerinin canlılar üzerindeki biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik etki mekanizmalarının incelenerek kullanılması gerekir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda memeli hücre modelleri ile maya hücre modelleri kullanılmaktadır. Mayalardan *Saccharomyces cerevisiae* hücre modelleri içinde yer alır. *S. cerevisiae*; genetik yapısından dolayı yararlı bir araştırma mikroorganizmasıdır. Bu bilimsel kaynak, hücre genetiği ve fizyolojisinin yapısı ve organizasyonu hakkında temel bilgilerin geliştirilmesinde çok önemli bir konuma sahiptir. *S. cerevisiae*, hayvansal organizmalar üzerinde yapılan genomik, proteomik ve metabolik çalışmalarda, muhtemel biyolojik mekanizmaların ortaya çıkarılmasında en iyi karakterize edilen organizmalardan biri olarak kabul edilmektedir (Braconi ve ark., 2006; Braconi ve ark., 2015).

Çalışmamızda; yeni sentezlenmiş Schiff bazı bileşiklerinin canlı organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla; yeni sentezlenmiş beş schiff bazı olan (Hekza [4-(2-hidroksi-4- klorofenilimino) metil] fenoksi)

siklotrifosfazen, Hekza [4-(4-hidroksifenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen, Hekza [2-metoksi-4(2-hidroksifenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen, Hekza [2-metoksi-4(2-hidroksi-4-klorofenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen, Hekza [2- metoksi-4(4-hidroksifenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen)' nin *Saccharomyces cerevisiae* maya hücresinde toplam protein, MDA, GSH, GSSG miktarları üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Schiff Bazları

Kullanılacak olan bu maddeler TBAG 107T407 No'lu Tübitak projesi kapsamında sentezlenerek elde edilmiştir. Bu maddeler:

**1-(M1)** = Hekza [4-(2-hidroksi-4-klorofenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen

Moleküler formülü:  $C_{78}H_{54}Cl_6N_9O_{12}P_3$

Moleküler ağırlığı: 1614.955746

Birleşimi: C(%58.01) H(%3.37) N(%7.81)

**2-(M2)** = Hekza [4-(4-hidroksifenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen

Moleküler formülü:  $C_{78}H_{60}N_9O_{12}P_3$

Moleküler ağırlığı: 1408.285386

Birleşimi: C(%66.52) H(%4.29) N(%8.95)

**3-(M3)** = Hekza [2-metoksi-4(2-hidroksifenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen

Moleküler formülü:  $C_{84}H_{72}N_9O_{18}P_3$

Moleküler ağırlığı: 1588.441266

Birleşimi: C(%63.52) H(%4.57) N(%7.94)

**4-(M4)** = Hekza [2-metoksi-4(2-hidroksi-4-klorofenilimino) metil] fenoksi]

Siklotrifosfazen

Moleküler formülü:  $C_{84}H_{66}Cl_6N_9O_{18}P_3$

Moleküler ağırlığı: 1795.111626

Birleşimi: C(%56.20) H(3.71) N(%7.02)

**5- (M5)** = Hekza [2-metoksi-4(4-hidroksifenilimino) metil] fenoksi] siklotrifosfazen

Moleküler formülü:  $C_{84}H_{72}N_9O_{18}P_3$

Moleküler ağırlığı: 1588.441

Birleşimi: C(%63.52) H(%4.57) N(%7.94)

### Maya Örnekleri

Çalışmada kullanılan *S. cerevisiae* BY4741- Yabani Tıp maya hücresi (Genotip: MATa his3 leu2 met15 ura3) İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

## METOT

### Schiff Bazı Solüsyonlarının Hazırlanması

$M_1 = 0.040g$

$M_2 = 0.060g$

$M_3 = 0.083g$

$M_4 = 0.047g$

$M_5 = 0.049g$ 'lık schiff bazlarından 10 mg alınıp 1 mL DMSO (dimethyl sülfokside)'da çözülmesi sağlanıp 10 mg/mL ve 20 mg/mL'lik olacak şekilde konsantrasyonları hazırlanmıştır.

### Maya Kültür Ortamının Hazırlanması

Deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae* BY4741-Yabani Tip maya hücresinin (Genotip: MATa his3 leu2 met15 ura3) gelişimi ve çoğalması için YEPD (200 mL için; 2 g maya ekstrakt, 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.

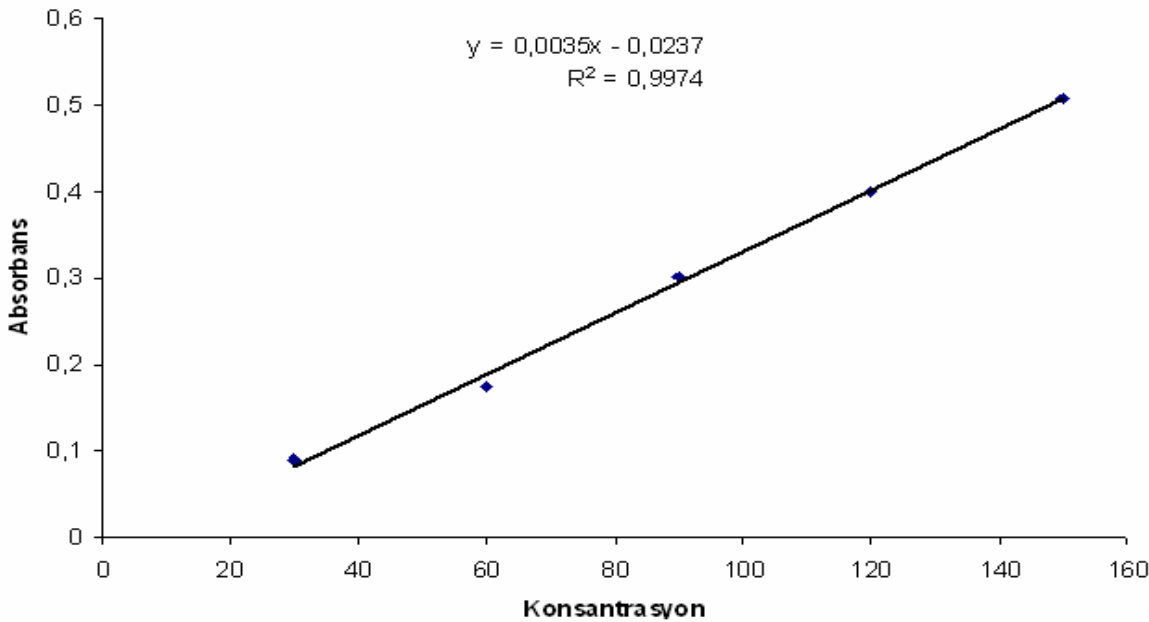
**Schiff Bazı Uygulama Grupları:** Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, YEPD besiyeri ortamı içerisine maya hücresi inoküle edildikten sonra OD600 değerleri 0.4-0.6 civarına [yaklaşık olarak  $1-3 \cdot 10^7$  hücre/ml (Bergman, 2001)] ulaşıncaya schiff bazlarının her birinden 10 mg/mL'lik (X grupları) ve 20 mg/mL'

lik (Y grupları) konsantrasyonları içecek şekilde eklenerek gruplar hazırlandı. Aşılama işleminden sonra kültürler 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürler laboratuvar şartlarında 517 nm'de hücre yoğunlukları ölçüldükten sonra, 6000 rpm'de 5 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilerek hücreler 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 süpernatant kısmı ile GSH, GSSG, total protein ve MDA ölçümleri yapıldı. Sonuçlar SPSS istatistik programı kullanılarak analiz edilip farklılıklar istatistik açıdan değerlendirildi.

### 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 1'deki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerin protein miktarları elde edilen bu kalibrasyon eğrisindeki denklem vasıtasıyla hesaplandı, sonuçlar (mg/g) şeklinde verildi.



Şekil 1. Protein kalibrasyon eğrisi  
Figure 1. Protein calibration curve

### Glutatyon(GSH) ve Okside Glutatyon(GSSG) Analizi

Glutatyon ve okside glutatyon miktarlarının ölçümü ilgili metoda uygun olarak HPLC cihazında analiz edildi (Klejdus ve ark., 2004; Yılmaz ve ark., 2009). 1 mL süpernatant üzerine 1 mL % 10'luk TCA eklenerek deprotenize edildi. 6000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 1 mL otosampler viallerine alındı. Kantitatif ölçümlerde 214 nm'de Shimadzu marka full otomatik HPLC cihazı kullanıldı. LC-10 AD VP UV-visible pompa, SPD-M10A VP, PDA dedektörü, CTO-10AS VP kolon fırını, SIL 10AD VP otosampler, DGU-14A

degasser ünitesi ve Class VP 6.26 işletim programı (Shimadzu, Kyoto Japan) kullanıldı. Mobil faz olarak % 0,1 TFA ve metanol (% 94/6, v/v) karışımı kullanıldı. Ayırma işlemi ODS-3 HPLC kolonunda yapıldı. Hesaplama işlemi standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6.26 programı (Shimadzu, Kyoto Japan) ile hesaplandı.

### Maya Hücresinde MDA Miktarının Ölçülmesi

Malondialdehit (MDA) miktarlarının ölçümü için HPLC cihazında uygun metod kullanarak analizi

yapıldı (Karataş ve ark., 2002). Tris-EDTA' lı süpernatandan 1 mL alınıp % 10'luk perklorik asit (HClO<sub>4</sub>) ile muamele edilmesiyle proteinleri çöktürüldü. Oluşan bu karışım 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantları otosampler viallerine alınmasıyla HPLC cihazında analizi yapıldı.

Analiz için full otomatik Shimadzu marka HPLC sistemi (Kyoto Japan) kullanıldı. Mobil faz olarak metil alkol karışımı (% 82.5- %17.5 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile pH= 4.0) ve 30 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Karatepe, 2004); kolon olarak da ODS-3 HPLC kolonu (150 mm x 4,6-5 µm) kullanıldı. PDA dedektör dalga boyu 244 nm, mobil faz akış hızı da 1 ml/dk olarak belirlendi. Standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplanması Class VP 6,26 software (Shimadzu, Kyota Japan) ile yapıldı.

### İstatistik Analizi

Deney sonucunda elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programı ile değerlendirildi. Kontrol grubu ile uygulama gruplarının ortalamaları arası farklar

önce tek-yönlü ANOVA ile daha sonra da her bir grubun diğerinden olan farklılıklar post hoc LSD testi yapılarak belirlendi. Değerler ortalama ± standard sapma (mean±S.D.) belirtildi. İstatistik yönden önemli bulunan farklar metin içinde de istatistiksel P (p>0,05, p<0,05, p<0,01, p<0,001) değerleri şeklinde ifade edildi.

### BULGULAR

#### Farklı Konsantrasyonlardaki Schiff Bazlarının *Saccharomyces cerevisiae* Hücresinin Total Protein Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Schiff bazlarının 10 mg/mL ve 20 mg/mL' lık konsantrasyon gruplarının kontrol grubu ile total protein miktarı bakımından kıyaslaması yapıldığında; madde ilave edilen maya hücrelerindeki total protein miktarının X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> ve Y<sub>4</sub> gruplarında belirgin seviyede arttığı saptandı (p<0.05, p<0.01, p<0.001). X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, Y<sub>1</sub> ve Y<sub>5</sub> schiff bazlarının olduğu grupların total protein seviyesinde kısmi seviyede azalma olduğu belirlendi (p<0.05) (p<0.01) (p<0.001) (Çizelge 1).

Çizelge 1. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücresindeki total protein düzeyine etkisi

Table 1. The effect of Schiff bases on total protein levels in *S. cerevisiae* cell

10 mg/mL' lık konsantrasyon grubu (X) 10 mg/mL concentration group		20 mg/mL' lık konsantrasyon grubu (Y) 20 mg/mL concentration group	
	Total protein (mg/g) Total protein		Total protein (mg/g) Total protein
Kontrol (Control)	1.562 ± 0.047	Kontrol (Control)	2.460 ± 0.35
M <sub>1</sub>	1.470 ± 0.10 <sup>b</sup>	M <sub>1</sub>	1.804 ± 0.06 <sup>c</sup>
M <sub>2</sub>	1.406 ± 0.033	M <sub>2</sub>	3.212 ± 0.52
M <sub>3</sub>	1.684 ± 0.087 <sup>c</sup>	M <sub>3</sub>	2.664 ± 0.40 <sup>a</sup>
M <sub>4</sub>	1.870 ± 0.070 <sup>d</sup>	M <sub>4</sub>	2.850 ± 0.86 <sup>b</sup>
M <sub>5</sub>	1.858 ± 0.10 <sup>d</sup>	M <sub>5</sub>	1.642 ± 0.06 <sup>d</sup>

a: p>0.05, b: p<0.05, c: p<0.01, d: p<0.001, cd: p<0.0001

#### Farklı Konsantrasyonlardaki Schiff Bazlarının *Saccharomyces cerevisiae* Hücresinin GSH ve GSGG Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Schiff bazları ilave edilen gruplar ile kontrol grubu

kıyaslandığında; schiff bazı ilave edilen maya hücrelerindeki GSH miktarının birçok grupta belirgin oranda arttığı (p<0.001) (p<0.0001); Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub> ve Y<sub>5</sub> gruplarında ise kısmi düzeyde azaldığı tespit edildi (Çizelge 2.).

Çizelge 2. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücresindeki GSH düzeyine etkisi

Table 2. The effect of Schiff bases on GSH levels in *S. cerevisiae* cell

10 mg/mL' lık konsantrasyon grubu (X) 10 mg/mL concentration group		20 mg/mL' lık konsantrasyon grubu (Y) 20 mg/mL concentration group	
	GSH (µmol/g)		GSH (µmol/g)
Kontrol (Control)	292.13 ± 10.06	Kontrol (Control)	73.948 ± 4.99
M <sub>1</sub>	456.39 ± 15.31 <sup>d</sup>	M <sub>1</sub>	96.19 ± 9.77 <sup>d</sup>
M <sub>2</sub>	505.65 ± 32.05 <sup>cd</sup>	M <sub>2</sub>	109.46 ± 24.92 <sup>cd</sup>
M <sub>3</sub>	448.70 ± 41.69 <sup>d</sup>	M <sub>3</sub>	61.78 ± 14.60
M <sub>4</sub>	405.53 ± 51.74	M <sub>4</sub>	73.398 ± 11.49 <sup>a</sup>
M <sub>5</sub>	471.18 ± 30.80 <sup>d</sup>	M <sub>5</sub>	62.40 ± 11.42

a: p>0.05, b: p<0.05, c: p<0.01, d: p<0.001, cd: p<0.0001

Kontrol grubu ile schiff bazı ilave edilen gruplar GSGG miktarı bakımından karşılaştırıldığında, kontrol

grubuna göre baz içeren tüm gruplarda belirgin düzeyde artış olduğu görüldü (p<0.001, p<0.0001). 10

mg/mL' lik schiff bazı içeren gruplarda GSGG miktarının, 20 mg/mL' lik konsantrasyon gruplarına

göre artış farkının daha fazla seviyede olduğu tespit edildi (Çizelge 3).

Çizelge 3. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücreesindeki GSGG düzeyine etkisi

Table 3. The effect of Schiff bases on GSGG levels in *S. cerevisiae* cell

10 mg/mL' lik konsantrasyon grubu (X) 10 mg/mL concentration group		20 mg/mL' lik konsantrasyon grubu (Y) 20 mg/mL concentration group	
	GSGG (µmol/g)		GSGG (µmol/g)
Kontrol (Control)	36.870 ± 4.52	Kontrol (Control)	12.750 ± 2.19
M <sub>1</sub>	58.636 ± 5.09	M <sub>1</sub>	13.194 ± 1.54 <sup>a</sup>
M <sub>2</sub>	73.464 ± 7.10	M <sub>2</sub>	26.752 ± 5.87 <sup>d</sup>
M <sub>3</sub>	128.56 ± 11.43 <sup>cd</sup>	M <sub>3</sub>	14.194 ± 3.77
M <sub>4</sub>	108.31 ± 8.57 <sup>cd</sup>	M <sub>4</sub>	24.484 ± 2.70 <sup>d</sup>
M <sub>5</sub>	140.92 ± 4.56 <sup>cd</sup>	M <sub>5</sub>	21.918 ± 5.18

a: p>0.05, b: p<0.05, c: p<0.01, d: p<0.001, cd: p<0.0001

### Farklı Konsantrasyonlardaki Schiff Bazlarının *Saccharomyces cerevisiae* Hücresinin MDA Seviyesi Üzerindeki Etkisi

Schiff bazı ilave edilen gruplardaki MDA miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 10mg/mL' lik

konsantrasyon grubunda M<sub>4</sub> haricindeki diğer gruplarda miktarın önemli düzeyde azaldığı saptandı (p<0.01, p<0.001). 20 mg/mL' lik konsantrasyon içeren maddelerin gruplarındaki MDA miktarında ise kontrol grubuna oranla artış olduğu tespit edildi (p<0.01) (p<0.001) (Çizelge 4).

Çizelge 4. Schiff bazlarının *S. cerevisiae* hücreesindeki MDA düzeyine etkisi

Table 4. The effect of Schiff bases on MDA levels in *S. cerevisiae* cell

10 mg/mL' lik konsantrasyon grubu (X) 10 mg/mL concentration group		20 mg/mL' lik konsantrasyon grubu (Y) 20 mg/mL concentration group	
	MDA (nmol/g)		MDA (nmol/g)
Kontrol (Control)	66.172 ± 4.64	Kontrol (Control)	103.50 ± 9.41
M <sub>1</sub>	49.632 ± 3.90 <sup>d</sup>	M <sub>1</sub>	109 ± 17.35
M <sub>2</sub>	44.114 ± 6.13 <sup>d</sup>	M <sub>2</sub>	141.45 ± 14.06 <sup>d</sup>
M <sub>3</sub>	57.07 ± 2.13	M <sub>3</sub>	128.88 ± 10.39 <sup>c</sup>
M <sub>4</sub>	67.812 ± 8.62 <sup>a</sup>	M <sub>4</sub>	157.69 ± 37.56 <sup>d</sup>
M <sub>5</sub>	54.582 ± 1.28 <sup>c</sup>	M <sub>5</sub>	127.07 ± 7.67

a: p>0.05, b: p<0.05, c: p<0.01, d: p<0.001, cd: p<0.0001

### TARTIŞMA ve SONUÇ

İnorganik olan bileşik ve bileşik gruplarının yüksek yapıli organizmalara uygun olup olmamasının ortaya konulması için canlı sisteme direkt uygulanmasına gerek olmadığı son yıllarda yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (İspir ve ark., 2008; Pratap ve ark., 2011; Tümer ve ark., 2008). Bu sebeple basit yapıli organizmalardan eukaryotik grubuna dahil olan *S. cerevisiae* yüksek yapıli organizmalara benzerlik göstermesinden dolayı deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Birçok çalışmada *S. cerevisiae* maya hücresinin maruz bırakıldığı yeni sentezlenmiş schiff bileşiklerine göstermiş olduğu tepkisel sonuçlar ile uygunluğu denetlenerek bilime ışık tutulmuştur (İspir ve ark., 2008; Pratap ve ark., 2011; Tümer ve ark., 2008).

Bu çalışmada beş yeni sentezlenmiş olan schiff bazlarının *S. cerevisiae*' in kültür ortamına 10 mg/mL'lik ve 20 mg/mL'lik konsantrasyonlarının ilavesinden sonra bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada etkisi bilinmeyen yeni sentezlenmiş schiff bazlarının

*S. cerevisiae* üzerindeki total protein, glutatyon, okside glutatyon ve malondialdehit sonuçlarının etkileri değerlendirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada; total protein miktarı üzerine schiff bazı gruplarının önemli düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Oksidatif stres karşısında sentezlenen proteinlerin ya da hasara uğramış proteinlerin hücrede birikimine sebep olabileceğini daha önce yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Vincent ve ark., 2004). Bu artış schiff bazları ile hasara uğramış proteinlerin birikimi ile açıklanabilir. Kullandığımız schiff bazları etkisi ile hücrede anormal protein birikimi oluşabilir. Bu sonuçta hücrede protein düzeyinin artışı ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte oksidatif strese karşı hücrelerde yeni proteinlerin sentezi de protein düzeyinde artışa neden olabilmektedir. Bu hipotez literatürde bazı araştırmacılar tarafından desteklenmektedir. Tamarit ve ark., (1998), oksidatif strese bağlı olarak bir grup oksitlenmiş proteinin ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Non-protein tiyol yapısında olup önemli bir antioksidan olan GSH'nin yeni sentezlenmiş beş schiff

bazının iki farklı konsantrasyonunu içeren gruplarındaki miktarları ile kontrol grubundaki GSH miktarı kıyaslandığında; M1 ve M2 gruplarının her iki konsantrasyon grubunda artış olduğu tespit edildi. M3, M4 ve M5 gruplarında ise konsantrasyonları arttıkça GSH seviyesinde azalma olduğu görüldü. Glutasyon miktarındaki artışın nedeni olarak maya hücresinin schiff bazlarına karşı bir savunma mekanizması geliştirmiş olabileceği ve GSH miktarını arttırarak oksidatif hasarlara karşı uyum sağlayabildiği görüşünü ileri sürebiliriz. Penninckx yaptığı çalışmada *S. cerevisiae* maya hücresinin oksidatif strese ve birçok farklı besin kaynaklarına karşı yanıt oluşturmak adına glutasyon sentezleyerek GSH miktarında artışa sebep olduğunu saptamıştır (Penninckx, 2000).

Okside glutasyon miktarındaki değişimlerin kontrol grubu ile kıyaslanmasında; schiff bazı içeren tüm gruplarda belirgin düzeyde artış olduğu saptanmıştır. Bu durumun; maya hücresinin schiff bazlarına karşı bir savunma mekanizması geliştirip, glutasyon miktarını arttırması ve böylece oksidatif hasarlara karşı adaptasyon gösterebilmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Izawa ve ark., (1995) yaptıkları çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı oluşturulmuş olan ortama sağlanmış uyumun, hücre içindeki glutasyon miktarında artışa sebep olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışma, araştırmamızdaki schiff bazı gruplarında gözlemlenen artışı açıklamak adına benzer bir çalışma örneğidir. Çalışmamızdaki glutasyon miktarındaki bu artış; maya hücrelerinin ortamına ilave edilen schiff bazlarının hücrede oluşturdukları hasarları onarabilmek adına bir ölçüt olarak kabul edilebilir.

MDA; lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve artmış olması hücre hasarını bir göstergesidir (Garcia ve ark., 1997). MDA seviyesi lipid peroksidasyonun bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Kontrol ile schiff bazı gruplarındaki MDA miktarlarının karşılaştırılmasında; 10 mg/mL'lik konsantrasyon gruplarının çoğunda belirgin düzeyde azalmanın olduğu gözlemlenirken, 20 mg/mL'lik konsantrasyon gruplarının tümünde belirgin düzeyde artış olduğu tespit edildi. MDA düzeyindeki artış kullanılan test maddelerinin lipid peroksidasyonunu arttırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir. MDA hücre düzeyinde metabolize edilmekte ya da diffüze olmakta ve diğer hücrelerde hasar oluşturmaktadır. MDA pek çok hücrede membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda lizozomal membranlarda yırtılmaya, hücre membran bütünlüğünün kaybına neden olmaktadır. Yapılan benzer bir çalışmada; Bozhan (2017) 2-(2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)ethylidene)hidrazinocarbothioamide schiff bazının 2, 4 ve 8 ppm konsantrasyonlardaki uygulamalar sonucunda, 8 ppm grubundaki MDA

miktarında önemli düzeyde artış olduğunu belirlemiştir, bu artışın sebebinin ise maya hücresinin ortama eklenen maddelere gösterdiği dirençten kaynaklandığını ileri sürmüştür.

Yaptığımız çalışmada yeni sentezlenmiş schiff bazlarının *S. cerevisiae*'nin kültür ortamına uygulanmasıyla oluşturulmuş gruplarda oksidatif stresten dolayı; total protein, GSH ve MDA seviyelerinin kontrol gruplarına kıyasla yüksek olması, *S. cerevisiae*'nin savunma ve biyokimyasal sistemi üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda; ilaç sanayinde sıklıkla kullanılan Schiff bazlı bileşiklerin canlı sistemler üzerindeki biyokimyasal değişimlerinin belirlenmesi ve etkilerinin ortaya konulmasına olumlu katkıda bulunulmuştur.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

### KAYNAKLAR

- Agrawal YK, Talati JD, Shah MD, Desai MN, Shah NK 2004. Schiff Bases of Ethylenediamine as Corrosion Inhibitors of Zinc in Sulphuric Acid. *Journal of Corrosion Science* 46(3): 633-651.
- Allcock HR 1972. Phosphorus – Nitrogen Compounds. Academic Press. New York. London.
- Allcock HR 1992. Antibacterial Activity and Mutagenicity Studies of Water-Soluble Phosphazene High Polymers. *Journal of Biomaterials* 13: 12.
- Allcock HR, Nelson CJ, Coqqio WD, Manners I, Koros WJ, Walker DRB, Pessan LA 1993. Gas Permeation and Selectivity of Poly (Organophosphazene) Membranes. *Journal of the Macromolecules* 26: 1493-1502.
- Allen CW 1993. The Use of Phosphazenes as Fire Resistant Materials. *Journal Fire Sciences* 11: 320-328.
- Bergman LW 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.
- Bernheim KA, Reed CS, Allcock HR 1999. Synthetic Bone: A. Polyphosphazene / Hydroxyapatite Composite. *Journal of Investigative Medicine* 47, 42A.
- Bozhan N 2017. Bazı Schiff Bazlarının *Sacharomyces cerevisiae* Kültür Ortamlarında Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 50 sy.

- Braconi D, Bernardini G, Santucci A 2015. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model in Ecotoxicological Studies: A Post-Genomics Perspective. *Journal of Proteomics* 137: 19-34.
- Braconi D, Sotgi M, Millucci L, Paffetti A, Tasso F, Alisi C, Martini S, Rappuoli R, Lusini P, Rosa A, Rossi C, Santucci A 2006. Comparative analysis of the effects of locally used herbicides and their active ingredients on a wild-type wine (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54: 31633172.
- Brandt K, Kruszynski R, Bartczack JT, Czomperlik IP 2001. AIDS – Related lymphoma Screen Results and Molecular Structure Determination of a New Cron Ether Bearing Aziridinylcyclophosphazene, Potentially Capable of Ion – Regulated DNA Cleavage Action. *Journal of Inorganica Chimica Acta* 322: 138-144.
- Brandt K, Van de Grampel JC, Meetsma A, Jekel PA 1991. *Recueil Des Travaux Chimiques Des. Journal of Pays-Bas* 110(1): 27-28.
- Davies DB, Clayton AT, Eaton RJ, Shaw RA, Egan A, Hursthouse MB, Sykara GD, Porwolik-Czomperlik, I, Siwy M, Brandt K 2000. Chiral Configurations of Cyclotriphosphazatrienes. *Journal of The American Chemical Society* 122: 12447-12457.
- Gleria M, Jaeger DR 2004. *Phosphazenes*. Nova Science Publishers Inc. New York.
- Hertzsch T, Budde F, Weber E, Hulliger J 2002. Supramolecular-Wire Confinement of I<sub>2</sub> Molecules in Channels of the Organic Zeolite Tris( $\alpha$ -Phenylenedioxy)Cyclotriphos-Phazene. *Angew Chemistry International Edition* 41: 2281-2284.
- Izawa S, Inoue Y, Kimura A 1995. Oxidative Stress Response in Yeast: Effect of Glutathione on Adaptation to Hydrogen Peroxide Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of FEBS Letters* 368(1): 73-76.
- İspir E, Toroglu S, Kayraldız A 2008. Syntheses, characterization, antimicrobial and genotoxic activities of new Schiff bases and their complexes. *Transition Metal Chemistry* 33(8): 953-960.
- Karataş F, Karatepe M, Baysar A 2002. Determination of Free Malondialdehyde in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Biochemistry* 311(19): 76-79.
- Karatepe M 2004. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human by HPLC-UV. *Journal of LC-GC North America* 22: 62-365.
- 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.
- Klejdus B, Zehnalek J, Adam V, Petrek J, Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Rozik R, Havel L, Kuban V 2004. Sub-Picomole High-Performance Liquid Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of Glutathione in the Maize (*Zea mays* L.) Kernels Exposed to Cadmium. *Analitica Chimica Science* 520(1-2): 117-124.
- Laguna MTR, Tarazona MP, Carriedo GA, Allonso FJG, Fidalgo JI, Saiz E 2002. Thermal Degradation and Solution Properties of Poly (2, 2' – Dioxybiphenylphosphazene). *Journal of Macromolecules* 35: 7505-7515.
- Lakshmi S, Lee DA, Bender JD, Allcock HR, Laurencin CT 2003. In Vitro Evaluation of Novel Biodegradable Polyphosphazenes for Bone Tissue Engineering. *Proceeding of the Joint Conference of the 47th Annual Meeting of Orthopedic Research Society* 6-7 August 2009, Newyork Universtiy-Newyork, 937.
- Langone F, Lora S, Veronese FM, Calicet P, Pornigotto PP, Valenti F, Palma G 1995. Peripheral Nerve Repair Using Poly (Organo) Phosphazene Tubular Prosthesis. *Journal of Biomaterials* 16(5): 347-353.
- Laurencin CT, Koh HJ, Neenan TX, Allcock HR, Langer R 1987. Controlled Release Using a New Biodegradable Polyphosphazene Matrix System. *Journal of Biomedical Materials Research* 21: 1231-1246.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *The Journal of Biochemistry* 193: 265-277.
- Moore FJ, Gale RD 1908. The Colored Salts of Schiff's Bases. A Contribution to Our Knowledge of Color as Related to Chemical Constitution. *Journal of The American Chemical Society* 30: 394-404.
- Moriya K, Yamane T, Suzuki T, Masuda T, Mizusaki H, Yano S, Kajiwrw M 2003. Mesogenicity of Organophosphazenes: The Effects of Phosphazene Ring and Side Groups on the Phase Transition. *Journal of The Chemical Information and Modeling* 34 (4).
- Öztürk AI, Yılmaz Ö, Kırbağ S, Arslan M 2000. Antimicrobial and Biological Effects of Ipephos and Amphos on Bacterial and Yeast Strains. *Journal of Cell Biochemistry and Function* 18: 17-126.
- Penninckx M 2000. A Short Review on the Role of Glutathione in the Response of Yeasts to Nutritional, Environmental, and Oxidative Stresses. *Journal of Enzyme and Microbiol Technology Sciences* 26(9-10): 737-742.
- Peterson ES, Stone ML, Mc Caffery RR, Cummings DG 1993. Mixed-Gas Separation Properties of Phosphazene Polymembranes. *Journal of Separation Technology Science* 28(1-3): 425.
- Pratap UR, Jawale DV, Bhosle MR, Mane RA 2011. *Saccharomyces cerevisiae* catalyzed one-pot three component synthesis of 2,3-diaryl-4-thiazolidinones. *Tetrahedron Letters* 52(14): 1689-1691.

- Schiff H 1869. Untersuchungen Über Salicinderivate. Journal of The American Chemical Society 150: 193-200.
- Shaw RA, Fitzsimmon BW, Smith BC 1962. The Phosphazenes (Phosphonitrilic Compounds). Journal of Chemistry Reviews 62: 242-281.
- Song SC, Lee BS, Lee HB, Ha HW, Lee KT, Sohn YS 2003. Synthesis and Antitumor Activity of Novel Thermosensitive Platinum (II)- Cyclophosphazene Conjugates. Journal of Controlled Releases 90: 303-311.
- Tamarit J, Cabisco E, Ros J 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stres. Journal of Biological Chemistry, 273: 3027 – 3032.
- Taş E, Kılıç A, Aslanoğlu M, Kaplan Ö, İlhan S, Ulusoy M 2005. Dört Dişli Salisilaldimin Schiff Bazı Ligandları ile Bunların Co(II) ve Cu(II) Komplekslerinin Sentezi Karakterizasyonu ve Redoks Özellikleri. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, s:328.
- Tümer M, Akgün E, Toroğlu S, Kayraldız A, Donbak L 2008. Synthesis and characterization of Schiff base metal complexes: their antimicrobial, genotoxicity and electrochemical properties. Journal of Coordination Chemistry 61(18): 2935-2949.
- Van der Huizen AA 1984. Aziridinly Cyclophosphazenes, Synthesis, Structure and Cytostatic Activity. Doctor These Ones, Universty of Groningen, Hollanda.
- Vandorpe J, Schacht E, Stolnik S, Garnett MC, Davies MC, Illum L, Davis SS 1996. Poly(organo phosphazene) Nanoparticles Surface Modified with Poly(Ethylene Oxide). Journal of Biotechnology and Bioengineering Sciences 52(1): 89-95.
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL 2004. Oxidative Stres in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Journal of Endocrinology Revision 25(4): 612-28.
- Walker BJ 1972. Organophosphorus Chemistry. Penguin Books Ltd. Harmondsworth. England.
- Yılmaz O, Keser S, Tuzcu M, Guvenc M, Cetintaş B, Irtegun S, Tastan H, Sahin K 2009. A Practical HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues. Journal of Animal and Veterinary Advances 8(2): 343- 347.
- Yılmaz Ö, Arslan F, Öztürk Aİ, Vanlı NS, Kırbağ S, Arslan M 2002. Antimicrobial and Biological Effects of N- Diphenylphosphoryl- P- Triphenylmono phosphazene- II and N- Dio ( o-tolyl ) Phosphoryl- P- tri ( o- tolyl ) Monophosphazene- III on Bacterial and Yeast Cells. Journal of Bioorganic Chemistry 30(5): 303-314.