

Araştırma Makalesi - Research Article

Diamino-süstitüe Halkalı Trifosfazen Türevlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması

The Investigation of Antimicrobial Activities of Diamino- substituted Cyclotriphosphazene Derivatives

Gülçin Çetin Kılıçaslan^{1*}, Cihan Darcan², Necibe Kılıçer³, Sedat Türe⁴

Geliş / Received: 26/01/2022

Revize / Revised: 06/06/2022

Kabul / Accepted: 06/06/2022

ÖZ

Hekzaklorosiklotrifosfazen [halkalı trimer, (N=PCl₃)₃, N₃P₃Cl₆] (1)'in alifatik primer diaminler [NH₂-(CH₂)_n-NH₂; n=2, 3 ve 5] ile tepkimelerinden bir mono-spiro (5); bir mono-ansa (10); iki dispiro (6 ve 8); bir spiro-ansa (11); iki tri-spiro (7 ve 9); ve bir tri-bino (12) türevi sentezlendi. Elde edilen fosfazen türevleri (5-12)'nin yapısı uygulanabilir spektroskopik yöntemler (LC-MS, FT-IR, ¹H ve ³¹P NMR) ile aydınlatıldı.

Bileşikler (5-12)'in antimikrobiyal aktivitesi, üç farklı insan patojenine karşı (*Escherichia coli* W3110, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Candida albicans* ATCC 10231) Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Sidal Konsantrasyon (MSK) değerlerinin belirlenmesi için mikrodilüsyon tekniği kullanılarak incelendi. Elde edilen sonuçlar, fosfazen türevleri (5-12)'nin belirtilen mikroorganizmalara karşı önemli aktivitelere sahip olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler- Hekzaklorosiklotrifosfazen, Antimikrobiyal Aktivite, *Escherichia coli* W3110, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231

ABSTRACT

From the reactions of hexachlorocyclotriphosphazene [cyclic trimer, (N=PCl₃)₃, N₃P₃Cl₆] (1) with aliphatic primary diamines, [NH₂-(CH₂)_n-NH₂; n=2, 3 and 5], one mono-spiro (5); a mono-ansa (10); two dispiro (6 and 8); a spiro-ansa (11); two tri-spiro (7 and 9); and a tri-bino (12) derivatives were synthesized.

The structure of the obtained phosphazene derivatives (5-12) was elucidated by applicable spectroscopic methods (LC-MS, FT-IR, ¹H and ³¹P NMR). The antimicrobial activities of the synthesized compounds were investigated using microdilution technique to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Cidal Concentration (MCC) values against three different human pathogens (*Escherichia coli* W3110, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10231). The obtained results showed that phosphazene derivatives (5-12) had significant activities against the mentioned microorganisms.

Keywords- Hexachlorocyclotriphosphazene, Antimicrobial Activity, *Escherichia coli* W3110, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231

^{1*}Sorumlu yazar iletişim: gulcin.cetin@bilecik.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-9625-224X>)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, 11230 Bilecik, Türkiye

²İletişim: cihan.darcan@bilecik.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-0205-3774>)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, 11230 Bilecik, Türkiye

³İletişim: necibe.esen@hotmail.com (<https://orcid.org/0000-0003-4037-7729>)

Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, 11230 Bilecik, Türkiye

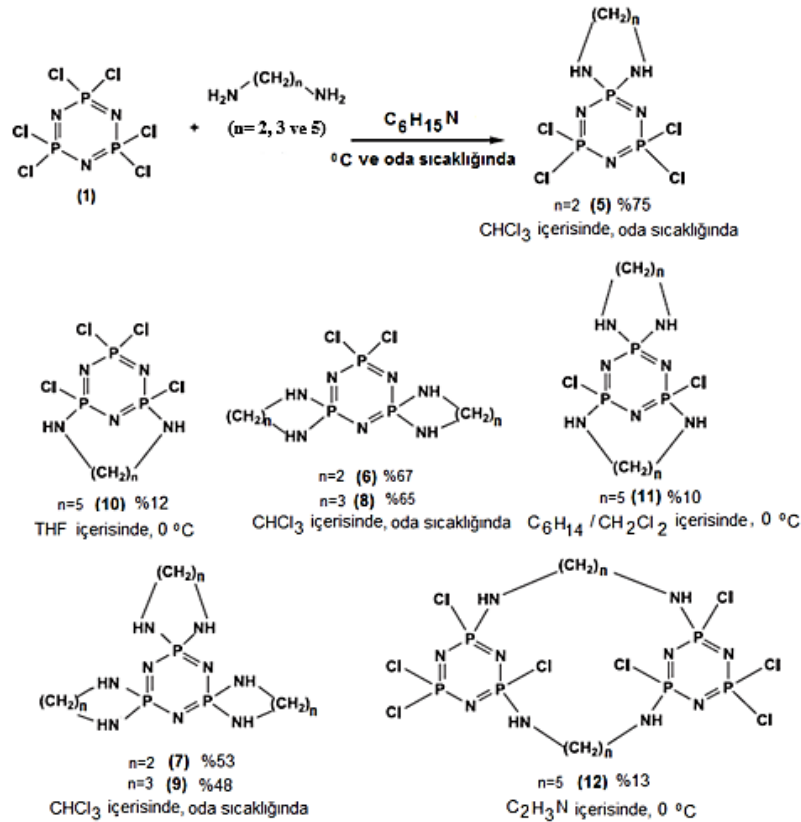
⁴İletişim: s.ture@yahoo.com (<https://orcid.org/0000-0001-8637-5580>)

Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, 11230 Bilecik, Türkiye

I. GİRİŞ

Halkalı fosfazen türevleri, bilim ve teknolojiye sahip oldukları geniş uygulama alanları nedeniyle inorganik halkalı bileşikler sınıfının önemli bir ailesini oluşturmaktadır [1]. Fosfor-klor bağına sahip olan halkalı fosfazen bileşikleri $[(N=PCl_2)_n]$ ($n=3, 4, 5, \dots$) sentez kimyada oldukça önemlidir. Cl-atomlarının farklı gruplar (R) ile nükleofilik süstitüsyon tepkimelerinden yeni halkalı fosfazen türevleri $[(N=PCl_2)_n]$ hazırlanabilmekte ve fosfor atomu ve/veya atomlarına bağlanan inorganik, organik veya organometalik grubun tipine ve fosfazen halkasının boyutuna göre oluşan bileşikler farklı özelliklere sahip olabilmektedir [1-4]. $N_3P_3Cl_6$ bileşiğinin mono-, di-, tri- ve tetrafonksiyonel reaktifler ile nükleofilik süstitüsyon tepkimeleri, açık zincir, spiro-, ansa-, spiro-ansa- ve bino-tipi halkalı trimerik fosfazen türevlerini vermekte, stereo- ve regio-selektif ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Farklı yan grupların varlığı ve siklofosfazen halkasının boyutu, bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerini belirler [2-37]. Biyoaktif halkalı trimerik fosfazen bileşiklerinin sentezlenmesi ve geliştirilmesi; kanser, mikrobiyal ve mantar gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni ve etkili ilaç adaylarının araştırılmasında umut verici bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir [5-10]. Son yıllarda halkalı trimer $N_3P_3Cl_6$ (1)'den elde edilen fosfazen türevlerinin, HT-29 (insan kolon adenokarsinomu), Hep2 (İnsan epidermoid larinks karsinomu), HeLa (insan servikal adenokarsinomu), LNCaP ve PC-3 (insan prostat karsinomu), MCF7 (insan meme kanseri), HL-60 (insan promiyelositik lösemi), A549 (insan akciğer adenokarsinomu) ve HCV29T (idrar kesesi kanseri) gibi yaygın kanser hastalıkları ile bağlantılı kanser hücrelerine karşı antikanser ve sitotoksik aktivite göstermesi dikkat çekmektedir [11-15]. Örneğin, bir çalışmada, aziridin-taç süstitüe halkalı fosfazenlerin DNA zincirinde kırıklar oluşturarak kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görülmektedir [16]. Ayrıca diammin, pirolidin, aziridin, spermin ve spermidin süstitüe aminosiklofosfazen türevleri, anti-kanser özelliklerinden dolayı bilinmektedir [12,18]. Bu türevler, HT-29, Hep2 ve Vero hücrelerine karşı sitotoksikite göstermekte ve ayrıca apoptosis kaynaklı hücre ölümlerini azaltmaktadır [19,15]. Oktapirolidinosiklotetrafosfazen bileşiği ve tamamen fenoksi süstitüe yıldız dallı siklotetrafosfazen türevinin Cu (II) kompleksi, anti-kanser aktivite sergilemektedir [16,21,22].

Bu çalışmada, $N_3P_3Cl_6$ (1)'in primer diamminler $[NH_2-(CH_2)_n-NH_2]$; $n=2, 3$ ve 5 ile tepkimelerinden sentezlenen siklofosfazen türevleri (5-12) iki bakteri (*Escherichia coli* W3110 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve bir maya (*Candida albicans* (ATCC 1023) suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendi ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılabilme olasılıkları araştırıldı.



Şekil 1. $N_3P_3Cl_6$ (1)'in alifatik diaminler $[NH_2-(CH_2)_nNH_2; (n=2, 3 \text{ ve } 5)]$ ile tepkimelerinden sentezlenen siklofosfazen türevlerinin yapısı [23-27,34].

II. DENEYSEL

A. Kullanılan Malzemeler

Bakteri üremesi için kullanılan Nutrient Broth ve Nutrient Agar (Merck); Duyarlılık sonuçlarının etkisini belirlemek için standart antimikrobiyotik olarak Kanamisin (Sigma Ald.'den, Km) ve antifungal olarak sikloheksimid (Sigma Ald.'den, Cy) kullanıldı. Fosfazen türevlerinin minimuminhibitörkonsantrasyonu (MİK) ve minimum sidal konsantrasyonu (MSK), üç farklı insan patojenine (*Escherichia coli* W3110, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Candida albicans* ATCC 10231) karşı belirlendi. *E. coli* (W3110), *S. aureus* (ATCC 25923) ve *C. albicans* (ATCC 10231), American Type Culture Collection'dan elde edildi.

B. Yöntem

Fosfazen türevlerinin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum sidal konsantrasyon (MSK) değerleri, mikrodilüsyon tekniği kullanılarak belirlendi [9]. Verimlerinin çok düşük olması nedeni ile fosfazen türevleri (5- 12)'nin antimikrobiyal aktivitesi sadece *E. coli* W3110, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 10231'e karşı test edilebildi. Antibakteriyel aktivite çalışmaları için *E. coli* W3110 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarının seçilme sebebi, hem bakterilerde iki temel sınıf olan Gram negatif ve Gram pozitif bakterileri temsil etmeleri hem de hastalık etmeni olmalarından dolayı referans niteliği taşımalarıdır. Ökaryot bir mikroorganizma olan maya suşu (*C. albicans* ATCC 10231)'nin seçilme sebebi ise bileşiklerin ileride kemoterapötik ajan olarak kullanılabilme olasılığı olduğunda insanlardaki etkisini incelemek içindir.

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum sidal konsantrasyonu (MSK), her maddenin iki farklı konsantrasyonu kullanılarak mikropalakalarda (Nest) $\frac{1}{2}$ seri seyreltme ile belirlendi [17]. Bileşikler (5-8 ve 12)'nin stok çözeltileri su ile hazırlandı. Sudaki çözünürlüklerinin çok düşük olması nedeni ile bileşikler (9, 10 ve 11)'in stok çözeltileri dimetil sülfoksit (DMSO)'da hazırlandı. Bileşikler, 20 mg/mL 'lik bir konsantrasyonda hazırlandı ve MİK testleri için kullanıldı.

Ön kültürleri hazırlamak için, her bir mikroorganizma, çalkalanarak 160 rpm'de 18 saat boyunca 37 °C'de 5 mL besin açısından zengin et suyu (LB, Luria Bertani) ortamında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bakteri yoğunluğu, bir spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific GENESYS 150 Vis/UV-) kullanılarak OD600'de 0.1 absorbansa ayarlandı ve ardından gerekli kültür, 400 µL bakteri ile 60 mL steril LB brot içinde hazırlandı. Bu kültürden, 96 kuyulu plakanın ilk kuyucuğuna 180 µL veya 170 µL kültür ve diğer kuyucuklara 100 µL kültür ilave edildi. Toplam 200 µL hacmini tamamlamak için 180 µL ve 170 µL bakteri kültürü içeren ilk kuyucuklara 20 µL ve 30 µL fosfazen bileşiği ilave edildive 12 kuyucukta ½ seri seyreltme yapıldı. Mikroplaklar 37 °C'de 18 saat inkübe edildi ve ertesi gün MİK değerleri belirlendi [17]. Ayrıca bileşiklerin sidal etkilerini belirlemek için üremenin gözlenmediği kuyucuklardan 10 µL kültür alınarak LB agar içeren ortama damlatıldı. Daha sonra plaklar 37 °C 'de 18 saat inkübe edildi ve ertesi gün MSK değerleri belirlendi. Deneyler en az 3 kez tekrarlandı.

III. TARTIŞMA VE SONUÇ

A. Bileşiklerin Sentezi ve Yapısal Karakterizasyonu

THF, asetonitril, kloroform ve n-hekzan/diklorometan (5:2) çözelti karışımı içerisinde, 0 °C'de ve oda sıcaklığında, bir, iki ve üç eşmolar oranlarda alifatik diaminler $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2; n=2, 3 \text{ ve } 5]$ ile $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_6$ (1)'in tepkimeleri sonucunda amino-süstitüe siklofosfazen bileşikleri (5-12) sentezlenmiştir (Şekil 1): Mono-spiro, $\text{N}_3\text{P}_3[\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]\text{Cl}_4$ (5, %75); bis-spiro, $\text{N}_3\text{P}_3[\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_2\text{Cl}_2$ (6, %67); tri-spiro, $\text{N}_3\text{P}_3[\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2]_3$ (7, %53); bis-spiro, $\text{N}_3\text{P}_3[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_2\text{Cl}_2$ (8, %60); tris-spiro, $\text{N}_3\text{P}_3[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_3$ (9, %48); Mono-ansa, $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_4[\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}]$ (10, %12); spiro-ansa, $\text{N}_3\text{P}_3[\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}]_2\text{Cl}_2$ (11, %9); ve bis-bino, $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_4[\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}]_2\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_4$ (12, %12) türevi. Sentezlenen fosfazen türevlerinden 10, 11 ve 12 numaralı bileşiklerin sentezi araştırma grubumuz tarafından ilk defa gerçekleştirilmiş ve yapıları yine grubumuz tarafından aydınlatılmıştır [20,27]. Diğer fosfazen türevleri (5-9), farklı araştırma grupları tarafından rapor edilmiştir [22-26, 32]. Sentezlenen tüm fosfazen türevleri (5-12), diklorometan, kloroform, dimetilformamid ve DMSO gibi yaygın olarak kullanılan organik polar çözücülerde çözünmektedir. Ayrıca, bu türevler su içerisinde de önemli ölçüde çözünebilmektedir. Sentezlenen bileşiklerin yapısı; literatürde element analizi ve spektroskopik yöntemler (LC-MS, FT-IR, ^1H ve ^{31}P NMR) ile aydınlatılmıştır [20, 22-26].

B. Sentezlenen Bileşiklerin (5-12) Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Son yıllarda yapılan çalışmalardan halkalı trimerik fosfazen türevlerinin çeşitli kanser hücrelerine karşı önemli sitotoksik ve anti-kanser aktivite gösterdiği [11-15] ve çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu [33] görülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, yeni biyoaktif halkalı trimerik fosfazen türevlerinin sentezlenmesine ve geliştirilmesine önemli ölçüde katkı sağlamaktadır [5-10]. Fosfazen türevleri (5-12)'nin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum sidal konsantrasyonu (MSK), *Escherichia coli* W3110, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Candida albicans* ATCC 10231 olmak üzere üç farklı insan patojenine karşı broth mikrodilüsyon tekniği [9] kullanılarak belirlendi; Diamino ikameli siklotrifosfazen türevlerinin antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri için belirlenen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum sidal konsantrasyon (MSK) değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

Buna göre, 1,3-propan-diamin'den elde edilen bis-spiro siklo-fosfazen türevi (8), çalışılan mikroorganizmalar üzerinde en düşük MİK (0.39-0.47 mg/mL) ve MSK değerlerine (0.39-0.47 mg/mL) sahiptir. 1,5-pentan-diaminden sentezlenen çift köprülü bino-fosfazen türevi (12) ise en yüksek MİK (31.25 – 37.5 mg/mL) ve MSK (37 – 70 mg/mL) değerlerine sahiptir.

Tablo 1. Diamino ikameli halkalı trifosfazen türevlerinin MİK ve MSK değerleri (mg/mL)

Bileşikler	Gram negatif		Gram pozitif		Ökaryot	
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	MİK	MSK	MİK	MSK	MİK	MSK
5	2.33	2.33	0.58	0.58	1.16	1.16
6	6.13	6.13	9.19	9.19	4.59	6.13
7	2.05	2.05	2.74	4.10	2.05	2.05
8	0.47	0.47	0.39	0.47	0.39	0.47
9	1.2	>1.5	1.5	>1.5	0.75	>1.2
10	1	>2	1	2	0.5	>2
11	0.88	>1.09	0.88	>1.09	0.44	1.09
12	31.25	37.50	25	50	37.5	>75
Km	0.002	0.002	0.001	0.001	NT	NT
Cy	NT	NT	NT	NT	> 0.1	> 0.1
DMSO	125	500	250	500	75	125

Dipnot: NT: Test Edilmedi; Km: Kanamisin; Cy: Siklohekzemid

Buna karşılık 1,2-etan-diamin'den türetilen dispiro- (6 ve 8) fosfazen türevleri karşılaştırıldığında bileşik (6)'nın şaşırtıcı derecede yüksek MİK değerlerine (4.9-9.19 mg/mL) sahip olduğu görülmektedir. Sübstitüe-1,2-etan diamin dispiro-fosfazen bileşiği (6)'nın MİK değerlerinin, diğer homolog seri 1,2- mono-spiro- (5) ve 1,2-tris-spiro- (7) fosfazen türevlerinden daha yüksek olması da düşündürücüdür. Öte yandan, Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus*'un bileşik (5)'e duyarlı (MİK değeri, 0.58 mg/mL) ve bileşik (6)'ya oldukça dirençli (MİK değeri, 9.19 mg/mL) olması da dikkat çekmektedir. Ayrıca, bileşik (7), diğer mikroorganizmalar üzerinde çok farklı bir etkiye sahip değilken bileşik (5 ve 6)'nın üç mikroorganizma üzerinde oldukça farklı bir etki gösterdiği görülmektedir. Özellikle, Gram-pozitif bir bakteri olan *S. aureus*, 0.58 mg/mL MİK değeri ile bileşik (5)'e karşı oldukça duyarlıdır. Ancak, bileşik (6), 9.19 mg/mL MİK değeri ile oldukça dirençlilik sergilemektedir.

Halkalı trimerik fosfazen türevleri ile yapılan bir çalışmada başlangıç bileşiği olan $N_3P_3Cl_6$ (1)'in farklı organizmalara karşı MİK değeri 0.013-0.054 mg/mL olarak belirlenmiştir [9]. Bu MİK değerleri, fosfazen türevleri (5-12)'nin MİK değerleri ile karşılaştırıldığında, $N_3P_3Cl_6$ (1)'in daha etkili olduğunu göstermektedir. Çizelgeden de görüleceği üzere, sentezlenen halkalı trimerik fosfazen türevleri (5-12) arasında en düşük MİK değerlerine sahip olan türevler bileşik (9 ve 12)'dir. Standart antibiyotiklerle karşılaştırıldığında bileşik (4) tüm mikroorganizmalar üzerinde antibiyotikler kadar etkili olduğu görülmektedir. Bileşikler 3 (0.5-1.31 mg/mL), 5 (0.47-0.78 mg/mL), 7 (1.87-5 mg/mL), 8 (2.06-3.3 mg/mL) ve 10 (1.52-4.06 mg/mL)'un antimikrobiyal etkisi başlangıç bileşiği $N_3P_3Cl_6$ (1)'e göre daha düşüktür. Bileşik (7 ve 8), sentezlenen diğer bileşiklerden farklı olarak Gram-negatif bakteri olan *E. coli* ve ökaryot *C. albicans* üzerinde sidal etki gösterirken, Gram-pozitif bakteri olan *S. aureus* üzerinde statik etki göstermektedir.

Fosfazenler üzerinde yapılan bazı çalışmalarda N/O [4], 4-floro-benzil [5] ve ferrosenil [6] grupları taşıyan fosfazen türevlerinin Gram-pozitif, Gram-negatif ve ökaryotlar üzerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Toplam 8 mikroorganizma ile yapılan bir başka çalışmada N/O sübstitüe spiro-siklotrifosfazen türevlerinin mikroorganizmalar üzerinde etkili olmadığı görülmektedir [7]. Mono-ferrosenilspirosiklotetrafosfazen türevleri ile yapılan bir çalışmada ise bileşiklerin oldukça yüksek antikandidal etkiye sahip olduğu görülmektedir [8].

Çizelge incelendiğinde, bu çalışmada yer alan fosfazen türevleri (5-12)'nin, tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu belirlendi. Bileşik 12 ve 5 hariç diğer bileşiklerin ökaryotik mikroorganizma (*C. albicans*) üzerinde prokaryotik mikroorganizmalara (*E. coli* ve *S. aureus*) göre daha etkili olduğu anlaşılmaktadır. Bileşik 12'nin standart organizmalara karşı belirlenen yüksek MİK ve MSK değerleri, önemli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını gösterdi. Bileşik 5'inise MİK ve MSK değerleri, özellikle Gram pozitif bakterilere antibiyotikler kadar etkili olduğunu gösterdi. Değerlendirilen bileşikler arasında; antimikrobiyal ajan olmak için, bileşik 5 iyi bir aday olarak görünmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gleria, M. & Jaeger, R. D. (2004). Applicative Aspects of Cyclophosphazenes, *Nova Science*, New York, 371.
- [2] Allcock, H. R. (1972). Phosphorus-Nitrogen Compounds. *Academic Press*, New York and London, 512.
- [3] Moriya, K. Masuda T. Yano, S. Suzuki T. Kajiwara M. (1998).³¹P and ¹³C NMR Studies of a Liquid-Crystalline Cyclotriphosphazene Derivative: Orientational Characteristics and Contrasting Shielding Anisotropies for Inorganic and Organic Moieties. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 318, 267-278.
- [4] Işıklan, M. Asmafiliz, N. Özalp, E.E. İltter, E. Kılıç, Z. Çoşut, B. Yeşilot, S. Kılıç, A. & Öztürk, A. Hökelek, T. Koç Bilir, L. Y. Açık, L. & Akyüz, E. (2010). Phosphorus–Nitrogen Compounds. 21. Syntheses, Structural Investigations, Biological Activities, and DNA Interactions of New N/O Spirocyclic Phosphazene Derivatives. The NMR Behaviors of Chiral Phosphazenes with Stereogenic Centers upon the Addition of Chiral Solvating Agents. *Inorg. Chem.*, 49, 7057–7071.
- [5] Erdener Çıralı, D. Uyar, Z. Koyuncu, İ. & Hacıoğlu, N. (2015). Synthesis, characterization and catalytic, cytotoxic and antimicrobial activities of two novel cyclotriphosphazene-based multisite ligands and their Ru(II) complexes. *Appl. Organomet. Chem.*, 29, 536–542.
- [6] Tümer, Y. Asmafiliz, N. Kılıç, Z. Hökelek, T. Soltanzade, H. Açık, L. Yola, M.L. & Solak, A.O. (2015). Phosphorus–nitrogen compounds: part 30. Syntheses and structural investigations, antimicrobial and cytotoxic activities and DNA interactions of vanillinato-substituted NN or NO spirocyclic monoferrocenyl cyclotriphosphazenes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20,165–178.
- [7] Başterzi N.S. Bilge Koçak, S. Okumuş, A. Kılıç, Z. Hökelek, T. Çelik, Ö. Türk, M. Koç, L.Y. Açık, L. Aydın, B. & Dal, H. (2015). Syntheses, structural characterization and biological activities of spiro-ansa-spiro-cyclotriphosphazenes. *New J. Chem.* 39, 8825–8839.
- [8] Çil, E. Tanyıldızı, M.A. Özen, F. Boybay, M. Arslan, M. & Görgülü, A.O. (2012). Synthesis, Characterization, and Biological–Pharmacological Evaluation of New Phosphazenes Bearing Dioxybiphenyl and Schiff Base Groups. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 345476–485.
- [9] Zgoda, J.R. & Porter, J.R. (2001). A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. *Pharm. Biol.* 39, 221-225.
- [10] Asmafiliz, N. Kılıç, Z. Hayvalı, Z. Açık, L. Hökelek, T. Dal, H. & Öner, Y. (2012). Phosphorus–nitrogen compounds. Part 23: Syntheses, structural investigations, biological activities, and DNA interactions of new N/O spirocyclic cyclotriphosphazenes. *Spectrochim. Acta A Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 86 214–223.
- [11] Akbaş, H. Okumuş, A. Kılıç, Z. Hökelek, T. Süzen, Y. Koç, L.Y. Açık, L. & Çelik, Z.B. (2013). Phosphorus-nitrogen compounds: part 27. Syntheses, structural characterizations, antimicrobial and cytotoxic activities, and DNA interactions of new phosphazenes bearing secondary amino and pendant (4-fluorobenzyl)spiro groups. *Eur J Med Chem.* 70, 294-307.
- [12] Yıldırım, T. Bilgin, K. Çiftçi, G.Y. Eçik, E.T. Şenkuytu, E. Uludağ, Y. Tomak, L. Kılıç, A. (2012). Synthesis, cytotoxicity and apoptosis of cyclotriphosphazene compounds as anti-cancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 52, 213-220.
- [13] Görgülü, A.O. Koran, K. Özen, F. Tekin, S. & Sandal, S. (2015). Synthesis, structural characterization and anti-carcinogenic activity of new cyclotriphosphazenes containing dioxybiphenyl and chalcone groups. *J. Mol. Struct.* 1087, 1–10.
- [14] Machakanur, S.S. Patil, B.R. Naik, G.N. Bakale, R.P. Bligh, S.W.A. & Gudasi, K.B. (2014). Synthesis, characterization and antiproliferative activity of hexa arm star shaped thiosemicarbazones derived from cyclotriphosphazene core. *Inorg. Chim. Acta* 421, 459-464.
- [15] Siwy, M. Sęk, D. Kaczmarczyk, B. Wietrzyk, J. Nasulewicz, A. & Opolski, A. (2007). Synthesis and In Vitro Antiproliferative Activity of New 1,3-(Oxytetraethylenoxy)-cyclotriphosphazene Derivatives. *Anticancer Res.* 27(3B), 1553-1558.
- [16] Brandt, K. Bartczak, T.J. Kruszynski, R. & Porwolick-Czomperlik, I. (2001). AIDS-related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene, potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action. *Inorganica Chimica Acta* 322, 138-144.
- [17] NCCLS. (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 6th ed. NCCLS document M07-A10. NCCLS, Wayne, Pa. 15.
- [18] Labarre, J.F. Guerch, G. 6 Sourmies, F. (1984). Attempts at the prdduition of more selective antitumorals. I. The antineoplastic activity of cyclophosphazenes linked to polyamines 1,3-diaminopropane and 1,4-diaminobutane. *J. J. Mol. Struct.* 117, 59-72.

- [19] Sassus, J.L. Graffeuil, M. Castera, P. & Labarre, J.F. (1985). Covalent binding of non-effective diaziridinocyclotriphosphazenes to natural polyamines as tumor finders makes potential anticancer agents. *Inorg. Chim. Acta.* 108, 23-27.
- [20] Ture, S. Silah, H. & Tuna, M. (2020). Reinvestigations of the reactions of hexachlorocyclotriphosphazene with difunctional primary amines leading to novel dangler, ansa and bridged derivatives. Spectroscopic studies of the derived products. *J. Mol. Struct.* 1202, 127232.
- [21] Siwy, M. Sęk, D. Kaczmarczyk, B. Jaroszewicz, I. Nasulewicz, A. Pelczyńska, 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 (2), 806-810.
- [22] Huizen, A.A. Wiltig, T. van de Grampel, J.C. Lelieveld, P. van der Meer-Kalverkamp, A. Lamberts, H.B. & Mulder, N.H. (1986). Isomer-dependent cytostatic activity of bis(1-aziridinyl)cyclo-phosphazenes. *Med Chem.* 29: 1341-1345,
- [23] Castera, P. Faucher, J.P. Grainer, M. & Labarre, J. F. (1987). Singly, doubly and triply bridged polyazaheterophanes derived from hexachlorocyclotriphosphazene, N3P3Cl6. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 32, 37-50.
- [24] Guerch, G. Labarre, J. F. Roques, R. & Sournies, F. (1983). An answer to the spiro versus ansa dilemma in cyclophosphazenes: Part II. N3P3Cl4[HN · (CH2)4 · NH]. *J. Mol. Struct.* 96: 113-120.
- [25] Guerch, G. Labarre, J.F. Lahana, R. Roques, R. & Sournies, F. (1983). An answer to the spiro versus ansa dilemma in cyclophosphazenes: Part III. N3P3Cl5[HN · (CH2)4 · NH]Cl5P3N3. A serendipitous two-ring bridged-assembly phosphazene. *J. Mol. Struct.* 99: 275-282.
- [26] Castera, P. Faucher, J.P. Guerch, G. Lahana, R. Mahmoun, A. Sournies, F. & Labarre, J.F. (1985). An answer to the SPIRO versus ANSA dilemma in cyclophosphazenes. Part VII. Neither SPIRO nor ANSA: the BINOdicyclotriphosphazenes, N3P3Cl5 [HN · (CH2)n · NH] Cl5P3N3. *Inorg. Chim. Acta.* 108, 29-33.
- [27] Rajeswara Rao, R. Gayatri, G.; Kumar, A. Narahari Sastry, G. & Ravikanth, M. (2009). Cyclotriphosphazene Ring as a Platform for Multiporphyrin Assemblies. *Chem. Eur. J.* 15, 3488-3496.
- [28] Davarcı, D. Beşli, S. & Yuksel, F. (2014). Reactions of cyclotriphosphazene with 1,6-diaminohexane and 1,8-diaminooctane: Mono-ansa, double- and triple-bridged derivatives. *Polyhedron.* 68, 10–16.
- [29] Ture, S. (2016). Phosphorus-nitrogen compounds: Reinvestigation of the reactions of hexachlorocyclotriphosphazene with 1,4-butane- and 1,6-hexane-diols—NMR studies of the products. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 191, 1174-1182.
- [30] Chang F, Huang X, Wei H, Chen K, Shan C, & Tang X. (2014). Intrinsically fluorescent hollow spheres based on organic–inorganic hybrid polyphosphazene material: Synthesis and application in drug release. *Mater. Lett.* 125, 128–131.
- [31] Beşli, S. Coles, S.J. Davarcı, D. Davies, D.B. & Yuksel, F. (2011). Effect of chain length on the formation of intramolecular and intermolecular products: Reaction of diols with cyclotriphosphazene. *Polyhedron.* 30, 329-339.
- [32] Chandrasekhar, V. Krishnamurthy, S.S. Vasudeva Murthy, A.R. Shaw, R.A.& Woods, M. (1981). Spirocyclic phosphazenes derived from the reaction of N3P3Cl6 and N4P4Cl8 with bifunctional reagents. *Inorg. and Nucl. Chem. Letters*, 17 (5-6), 181-185.
- [33] Shaw, R.A. (1989). The reactions of phosphazenes with difunctional and polyfunctional nucleophilic reagents. *Phosphorus Sulfur Silicon Rel. Elem.* 45, 103-136.
- [34] Murr El, N. Lahana, R. & Labarre, J.F. (1984). El Murr N, Lahana R, Labarre JF, Declercq JP. (). An answer to the spiro versus ansa dilemma in cyclophosphazenes Part V*. The DISPIRO N3P&12 [HN-(CH2)3,4-NH] 2 and TRISPIRO N3P3 [HN-(CH,-)-NH] 3 derivatives . *J Mol Struct.* 117, 73-85.
- [35] İter, E. Asmafiliz, N. Kılıç, Z. Açık, L. Yavuz, M. Bali, E.B. Solak, A.O. Buyükkaya, F. Dal, H. Hökelek, T. (2010). Phosphorus–nitrogen compounds: Part 19. Syntheses, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic monoferrocenylcyclotriphosphazenes. *Polyhedron*, 29, 2933–2944.
- [36] Ozay, H. & Ozay, O. (2014). Synthesis and characterization of drug microspheres containing phosphazene for biomedical applications. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 450, 99–105.
- [37] Greish, Y.E. Benderb, J.D. Lakshmic, S. Browna, P.W. Allcock, H.R. & Laurencinc, C. T. (2005). Low temperature formation of hydroxyapatite-poly(alkyl oxybenzoate)phosphazene composites for biomedical applications. *Biomaterials.* 26, 1-9.