

Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences

Journal homepage: www.dergipark.org.tr/ejbcs



Steroidall konjugatların *in vitro* biyolojik aktivite ve *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları

Sevinç İlkar Erdağı^{1*}

¹Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kocaeli, Türkiye

*Corresponding author: sevinc.ilkar@kocaeli.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0001-5811-2302>

Received : 12/01/2024
Accepted : 25/02/2024

To Cite / Atf için: İlkar Erdağı S. 2024. Steroidal konjugatların *in vitro* biyolojik aktivite ve *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları. Eurasian J Bio Chem Sci, 7(1):10-19 <https://doi.org/10.46239/ejbcs.1418794>

Özet: Steroidal bileşikler, hormon reseptörleri ve steroidojenik enzimler için ligandlar veya substratlar olarak görev yaparlar. Bu bileşikler, hücre büyümesi ve çoğalma gibi birçok biyolojik süreçte etkili rol oynarlar. Daha önce yapılan çalışmalar steroid bileşiklerinin kanser hücrelerini hedefleme ve kanser tedavisinde kullanma potansiyelini göstermektedir. Steroid bileşiklerinin biyolojik olarak aktif 4-metil-7-hidroksi kumarin bileşiği ile konjuge edilerek yeni konjugatlar geliştirildiği daha önceki çalışmada bildirildi. Bu çalışmada ise, steroidal konjugatların hormona duyarlı ve diğer kanser hücre hatları üzerinde farmakolojik özellikleri incelendi ve *in vitro* olarak değerlendirildi. Seçicilik indeksinin belirlenmesi amacıyla sağlıklı hücre hattına karşı proliferasyonları *in vitro* olarak test edildi. Ayrıca, bu çalışmada ilk olarak, etkin konjugatlar üzerinde protein-ligand etkileşimleri, bağlanma ilgilerini belirlemek amacıyla *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları yapıldı. Bu çalışmanın sonuçları, steroid temelli konjugatların çeşitli hastalıkların tedavisine çok yönlü bir yaklaşım sunma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antiproliferatif aktivite, Biyokonjugat, 4-metil-7-hidroksi kumarin, Moleküler bağlanma, Steroid.

In vitro biological activity and in silico molecular binding studies of steroidal conjugates

Abstract: Steroidal compounds effectively participate in various biological activities, including cellular growth and proliferation, by functioning as ligands or substrates for hormone receptors and steroidogenic enzymes. Previous studies have shown the potential of steroid conjugates in targeting cancer cells and their use in cancer treatment. The previous study reported that new conjugates were developed by conjugating steroid compounds with the biologically active 4-methyl-7-hydroxycoumarin compound. In this study, the pharmacological properties of steroidal conjugates were examined and evaluated *in vitro* on hormone-sensitive and other cancer cell lines. The proliferation against a healthy cell line was tested *in vitro* to determine the selectivity index. Additionally, *in silico* molecular docking studies were conducted for the first time in this study to determine the binding affinities of effective conjugates. The results of this study demonstrate that steroid-based conjugates have the potential to offer a versatile approach to the treatment of various diseases.

Keywords: Antiproliferative activity, Bioconjugate, 4-methyl-7-hydroxy coumarin, Molecular docking, Steroid.

© EJBACS. All rights reserved.

1. Giriş

Steroidler, biyolojik olarak aktif organik bileşiklerdir ve belirli bir moleküler yapıda düzenlenmiş dört halkanın bir araya gelmesiyle oluşurlar. Steroidlerin biyolojik olarak iki temel fonksiyonu vardır. Birincisi, hücre zarlarının önemli bileşenleri olarak membran akıcılığını değiştirirler. İkincisi ise sinyal molekülleri olarak görev yaparak çeşitli biyolojik süreçleri düzenlerler (İlkar Erdağı ve Yıldız 2022). Bu bileşikler arasında öne çıkanlar arasında kolesterol bulunur. Kolesterol, hücre zarlarının temel

bileşenlerinden biridir ve hücre zarlarının esnekliğini ve sıvılığını korur (Xu ve ark. 2005). Steroidler arasında yer alan bir diğer önemli tür pregnenolon dur. Pregnenolon, steroid hormonlarının üretiminde önemli bir ara madde olarak görev yapar. Bu steroid, beyinde nörotransmitterlerin sentezine katkıda bulunarak nörolojik işlevlerde etkin bir rol oynayabilir (Osuji ve ark. 2010). Kolik asit ise safra asitlerinin bir alt grubunu temsil eder ve sindirim süreçlerinde önemli bir işleve sahiptir. Sindirimde yağ ve vitamin emiliminden, bağırsak

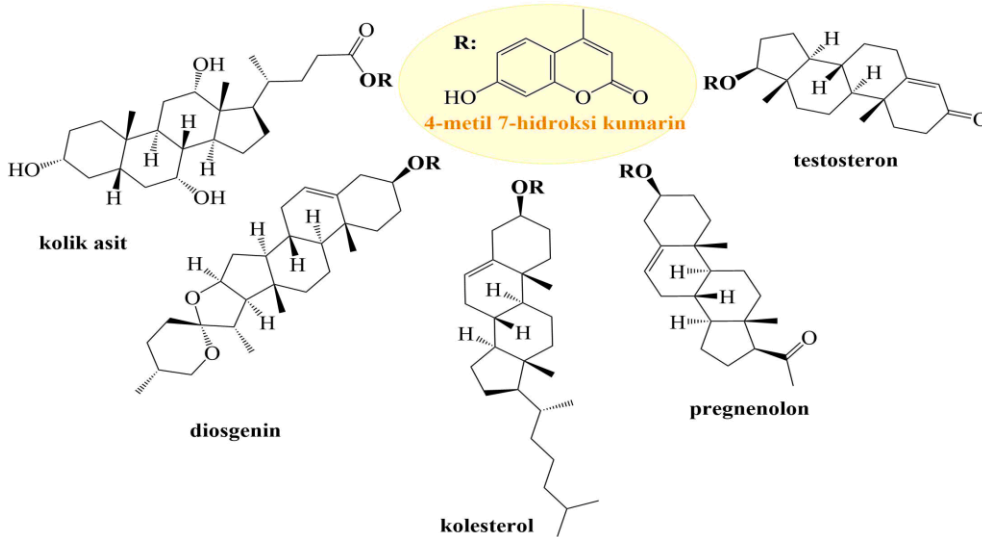
hareketlerini uyararak toksinlerin atılmasına kadar çeşitli etkileri bulunur (Navacchia ve ark. 2020). Dehidroepiandrosteron (DHEA), steroid hormonlarının üretiminde kritik bir rol oynar ve "ana steroid" olarak adlandırılır. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde etkili olabilir, bağışıklık fonksiyonlarını artırabilir ve stres tepkisini düzenleyerek vücuttaki dengeyi sağlamaya yardımcı olabilir (Dembitsky ve ark. 2018). Bitkilerde doğal olarak bulunan ve laboratuvar koşullarında diğer steroid hormonlarının sentezinde kullanılabilen bir molekül olan diosgenin, hormonsal dengeyi düzenleme ve anti-enflamatuvar özellikler gibi faydalı etkilere sahip olabilir (İlkar Erdagi ve Uyanik 2019). Son olarak, testosteron, kas gelişimi, kemik sağlığı, kırmızı kan hücresi üretimi, cilt ve saç sağlığı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Ayrıca, ruh hali, bilişsel fonksiyonlar ve cilt sağlığı üzerinde de etkileri olabileceği gözlemlenmiştir (İlkar Erdagi 2023). Bu steroidlerin vücutta çeşitli biyolojik işlevleri, sağlıklı bir yaşam için kritik öneme sahip olup, vücutta denge ve düzenin sağlanmasında büyük bir rol oynarlar.

Biyolojik olarak aktif moleküllerin konjuge edilmesi, özellikle kanser gibi çeşitli çoklu işlevli hastalıkları hedeflemek için kullanılan ve ilaç keşfi için güçlü bir araçtır. Bu bağlamda, steroidler diğer biyolojik olarak aktif moleküllerle konjuge etmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Steroidlerin biyo-konjugasyonu, çoklu işlevli hastalıkların tedavisinde etkili ve umut verici bir strateji olarak öne çıkmaktadır (Bansal ve Suryan 2022). Yapılan steroidal konjugat çalışmaları, izatin-dehidroepiandrosteron (Ke ve ark. 2015), diosgenin aminoasit (Cai ve ark. 2019), estron-doksorubisin ve estron-kitosan (Kurmi ve ark. 2020), ve metotreksat-diosgenin konjugatları (Cai ve ark. 2016) sentezlenmiş ve bu konjugat bileşiklerin insan kanser hücre hatları üzerinde etkili antitümör aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, biyogüvenlik değerlendirmesi sağlıklı hücre hatları üzerinde sitotoksisiteye neden olmadığını göstermiştir.

Daha önce gerçekleştirilen çalışmada, bilinen terapötik özelliklere sahip 4-metil-7-hidroksi kumarin bileşiğinin, yaygın biyolojik işlevlere sahip olan steroidlerle birleştirildiği bildirildi. Çalışma kapsamında, kolik asit, diosgenin, kolesterol, DHEA ve testosteron gibi farklı biyolojik etki mekanizmalarına sahip steroid bileşenleri seçildi. Konjugatların yapısal özellikleri hakkındaki sonuçlar ayrıntılı bir şekilde ele alındı. Antiproliferatif aktiviteler, insan eritroid lösemi hücre hattı K562, meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve rahim kanseri hücre hattı HeLa üzerinde *in vitro* koşullarda değerlendirildi. Mevcut çalışmanın temel odak noktası, karakterize edilmiş olan konjugatların özellikle hormona duyarlı (meme ve prostat kanseri) ile diğer (akciğer) kanser hücre hatları üzerindeki *in vitro* antiproliferatif etkileridir. Antiproliferatif aktiviteler, üç farklı insan kanser hücre hattı üzerinde değerlendirildi: östrojen reseptörü negatif MDA-MB-231 meme adenokarsinomu, prostat kanseri PC3 ve akciğer adenokarsinomu A549. Ek olarak, kanser hücresi olmayan sağlıklı MRC-5 kontrol hücre hattı da *in vitro* koşullarda test edildi. Bu çalışma kapsamında, tüm konjugatlar üzerindeki protein-ligand etkileşimlerini ve bağlanma ilgilerini belirlemek amacıyla ilk kez *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları gerçekleştirildi. Moleküler bağlanma çalışmaları için meme ve prostat kanseri tedavisinde kullanılan steroidal ajanların çeşitli hedef enzimleri (aromataz CYP19A1, 17 α -hidroksilaz/17,20-liaz CYP17A1, androjen reseptörü AR ve östrojen reseptörü α ER α) seçildi ve moleküler bağlanma sonuçları, yaygın olarak kullanılan referans ilaçlarla karşılaştırıldı. Bu çalışma, potansiyel yeni kanser ajanlarının keşfi ve değerlendirilmesine temel oluşturmakta olup, belirli enzimlere veya proteinlere karşı etkili bileşiklerin belirlenmesine katkıda bulunarak hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

2. Materyal ve Yöntem

Konjugatların sentezi ve karakterizasyonu daha önce yapılan çalışmada bildirildi (İlkar Erdagi 2023). Şekil 1' de şematik olarak karakterize edilen konjugatlar verildi.



Şekil 1. Steroidal konjugatların gösterimi

2.1. Biyolojik testler

2.1.1. *In vitro* antiproliferatif aktivite ve hücre kültürü

Bu çalışmada, üç insan tümör hücre hattı (akciğer adenokarsinomu (A549); meme adenokarsinom, ER-, MDA-MB-231; prostat kanseri, PC3 ve bir kanser olmayan hücre hattı (normal fetal akciğer fibroblastları, MRC-5) (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC), Manassas, VA, ABD) kullanıldı. Hücreler, Dulbecco'nun modifiye Eagle's Medium'u (DMEM) ile beslenildi, %10 fetal buzağı serumu (FBS, Sigma), antibiyotikler ve antimikotikler (PAN BIOTECH) ile takviye edilen ortamda yetiştirildi ve 37 °C' de %5 CO₂' li ve 100% nemli bir ortamda kültüre alındı. Kültür ortamı alternatif günlerde yenilendi ve hücreler tripsin (0.25%)/etilen diamindiamin tetra asetat (EDTA) (0.02%) içeren fosfat tampon çözeltisi ile ayrılarak subkültüre edildi. Örneklerden ekstrakt elde etmek için elüsyon test yöntemi kullanıldı. Örnekler, %5 FBS ve 100 mg/mL penisilin-streptomisin içeren DMEM içine konularak 0.5 g/mL-1 konsantrasyonda inkübatörde %5 CO₂ ve 37 °C' de 24 saat boyunca bırakıldı, böylece herhangi bir çözünebilir faktör DMEM' e sızabilmesi engellendi. Elüsyonun ardından, elüentler 0,22 mm'lik bir şırınga kullanılarak sterilize edildi; MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, Biofroxx, Almanya) testi için taze DMEM kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda konjugatlar hazırlandı.

2.1.2. MTT test

Konjugatların antiproliferatif aktivitesi, test bileşiklerine 48 saat maruz kalma sonrasında tetrazolium renkli MTT testi kullanılarak değerlendirildi. MTT testi, grubumuzun daha önce raporladığı modifiye edilmiş yöntemle göre kullanıldı (İlkar Erdagi ve Yildiz 2022). Hücreler yassı tabanlı 96 kuyucuklu plaklara 104 hücre/200 µL yoğunluğunda ekildi. Ekildikten sonra hücreler, 37 °C' de, %5 CO₂ içeren bir ortamda, 24 saat boyunca inkübatörde bağlanmalarına izin verildi. Kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, test bileşiklerinin DMSO içerisinde konsantrasyon gradyanını içeren 0,5 µM ile 100 µM aralığında değişen taze ortam içeren 100 µL yeni bir ortam ile değiştirildi. Göreceli hücre hayatta kalımını belirlemek için özüt içermeyen ortamda bulunan hücreler kullanıldı. Hücreler, pozitif kontrol olarak DMSO (Biofroxx, Almanya) ile işleme alındı. Ekstrakt konsantrasyonlarının eklenmesinden sonra hücreler, sitotoksik ve proliferatif etkileri gözlemlemek için 48 saat boyunca inkübe edildi. IC₅₀, hücre büyümesini %50 oranında inhibe eden bileşik dozu olarak tanımlandı ve Origin 9 (OriginLab, Northampton, ABD) kullanılarak Boltzmann sigmoid fonksiyonu ile nonlineer regresyon analizi kullanılarak belirlendi. MTT testi, yaşayan hücrelerde mitokondri dehidrogenazları tarafından 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür (MTT)'ün formazan haline getirilmesine dayanmaktadır. Steroidal sitotoksitenin genel kontrolü olarak formestan ve non-spesifik sitotoksitenin kontrolü olarak doksorubisin kullanıldı. Test edilen hücre hatları için seçiciliği gösteren IC₅₀ değerlerinin normal ve kanser hücreleri için alınan

IC₅₀ değerlerinin oranından hesaplanan Selektivite İndeksi (SI) değerleri belirlendi. SI değeri >3, iyi bir seçiciliği temsil etmektedir. SI, bir normal hücre hattının IC₅₀ değeri ile ilgili kanser hücre hattının IC₅₀ değeri arasındaki oran olarak hesaplandı (Denklem 1).

$$\text{Seçicilik indeksi} = \frac{IC_{50} \text{ normal hücre}}{IC_{50} \text{ kanserli hücre}} \quad (1)$$

2.2. Moleküler bağlanma hesaplamaları

2.2.1. Protein (reseptör) ve ligand yapı koordinatlarının hazırlanması

Antiproliferatif çalışmaları tamamlamak ve steroidal kumarin konjugatları için olası protein hedeflerini önermek amacıyla, moleküler bağlanma simülasyonları AutodockVina yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirildi (Eberhardt ve ark. 2021), (Trott ve Olson 2009)). Çalışmada kullanılan konjugatlar, meme ve prostat kanserinin tedavisine kullanılan steroidal kemoterapötik ilaçların dört protein hedefine karşı test edildi. Protein Data Bank (PDB)' den CYP17A1 (17α-hidroksilaz/C17,20-liaz, PDB Kimlik: 3RUK), CYP19A1 (aromataz, PDB Kimlik: 3EQM), östrojen reseptörü (ERα, PDB Kimlik: 3ERT) ve androjen reseptörü (AR, PDB Kimlik: 2AMA) olan kodlar seçildi. Enzim yapı koordinatları ve üç boyutlu yapısı protein veri bankasından alındı (<http://www.rcsb.org>). Antagonist konformasyonları için arama kutusu, ko-kristallenmiş ligandın merkezi etrafında yer aldı ve 40 Å × 40 Å × 40 Å boyutunda bir alan kullanıldı. AutoDock Vina algoritmasının gerçekleştirdiği örnekleme miktarını artırmak için bir exhaustiveness değeri 16 alındı. Yüksek bir exhaustiveness değeri, bir minimumu (bağlanma enerjisi) bulamama olasılığını azaltır, bu değeri 8'e varsayılan değerini azaltır (Rocha-Roa ve ark. 2023). A zinciri dışındaki zincirler, ligand ve su molekülleri için koordinatlar bir metin düzenleyici kullanılarak kaldırıldı, polar hidrojenler ve Kollman yükleri Autodock Tools 1.5.7 kullanılarak eklendi. İnhibitör test bileşiklerinin konformasyonel analizi Avogadro yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi ve en kararlı konformasyonlar MMFF94s ile optimize edildi. Aktif bölge koordinatları Discovery Studio Visualizer 2021 ile belirlendi. Tüm ligand-protein bağlanma hesaplamaları, AutoDock Vina yazılımını kullanarak rijit protein içinde esnek bir ligand olarak gerçekleştirildi. Bağlanma enerjisi (kcal/mol) açısından ligandın en iyi bağlanma modu seçildi ve kullanıldı. Kontrol bağlanma çalışmaları, reseptörlerin X-ışını kristal yapılarında bulunan ligandları kullanarak gerçekleştirildi. Tüm kontrol tekrar bağlanma çalışmaları, ilgili kristal yapılarında bulunan ligand-protein geometrilerini üretti (RMSD ≤1.16). Formestanın iyi bilinen bir CYP19 inhibitörüdür ancak karmaşıktaki çözülen bir kristal yapısı bulunmamaktadır. Bu nedenle CYP19 bağlanma simülasyonlarında karşılaştırma için dahil edildi (Nikolic ve ark. 2015). Tahmin edilen bağlanma enerjileri yaklaşık olarak <10 kcal/mol bulunduğu bildirildi, bu, kontrol bağlanma çalışmalarına dayanarak önemli olarak kabul edildi.

2.3. İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel analizler, varyans analizi (ANOVA) kullanılarak %5 olasılık düzeyinde gerçekleştirildi. ANOVA, farklı gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirlemek için kullanıldı. Tüm ölçümler en az üç tekrar için yapıldı. Tüm çalışmalarda, $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar, her biri ortalama standart hata olarak sunuldu.

2.4. Kısaltmalar ve semboller listesi

ATCC	American Type Culture Collection
A°	Angström
DHEA	Dehidroepiandrostan
DMSO	Dimetilsülfoksit
DOX	Doksorubisin
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle's Medium'u
EDTA	Etilen diamindiamin tetra asetat
FBS	Fetal buzağı serumu
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonunun %50' si
K562	İnsan eritroid lösemi hücre hattı
kCal	Kilo kalori
RMSD	Kök ortalama kare sapma
HeLa	Rahim kanseri hücre hattı
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ER	Östrojen reseptör
MDA-MB-231	Östrojen reseptörü negatif meme adenokarsinomu
PC3	Prostat kanseri
PDB	Protein Data Bank
SI	Selektivite İndeksi
ΔG	Serbest enerji

3. Sonuçlar ve Tartışma

3.1. Steroidal kumarin konjugatların *in vitro* antiproliferatif aktivitesi

Kumarin bileşiği ile konjuge edilmiş steroidlerin antiproliferatif hücre potansiyellerinin ve çeşitli steroid bileşiklerinin etkisinin değerlendirilmesi (konjugatlar **5-9**), insan kanser hücre hatlarına (MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinomu, ER, triple-negatif), PC3 (prostat kanseri) ve A549 (insan akciğer kansinomu)) karşı standart MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazo-liumbromür) testi kullanılarak yapıldı. Sitotoksisite kontrolü olarak, sağlıklı kanser olmayan MRC-5 (fetal akciğer fibroblastları) kullanıldı. Sonuçlar, seçici olmayan sitotoksik bir ilaç olan doksorubisin (DOX) ve steroidal CYP19/aromatizaz inhibitörü formestan karşısında değerlendirildi. Konjugatların antiproliferatif aktiviteleri, Tablo 1'de listelenen IC₅₀ parametreleri olarak ifade edildi. (Tablo 1). Tablo1' de verilen sonuçlar, tüm konjugatların bu üç tümör hücre hattına karşı yüksek ila orta derecede sitotoksisite gösterdiğini ve IC₅₀ değerlerinin nispeten düşük μM konsantrasyon aralığında olduğunu gösterdi (IC₅₀ 16.4-36.7 μM). Diğer yandan, MRC-5 hücre hattı için sitotoksisiteleri kontrol grubuna benzer olup, bu da incelenen bileşiklerin test aralığı içinde toksik olmadığı sonucunu verdi (IC₅₀>100 μM).

Tablo 1 Steroidal konjugatların (5-9) ve anti-kanser ilaçlarının *in vitro* antiproliferatif aktiviteleri

Konjugat	MDA-MB-231		PC3		A549		MRC-5 ^c
	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀
5	22.8	> 4.4	20.1	> 5.0	28.7	> 3.5	> 100
6	30.4	> 3.3	18.6	> 5.4	14.8	> 6.8	> 100
7	33.4	> 3.0	26.4	> 3.8	20.2	> 5.0	> 100
8	16.4	> 6.1	11.3	> 8.8	24.6	> 4.1	> 100
9	33.1	> 3.0	10.5	> 9.5	32.5	> 3.1	> 100
Formestan ^a	56.3	> 1.8	96.3	> 2.1	38.6	> 2.6	> 100
Doksorubisin ^b	0.16	0.8	46.7	< 0.01	16.9	< 0.01	0.12

Her test bileşiği konsantrasyonu için dört kez tekrarlanan iki bağımsız deneme gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için ortalama değerler ve standart sapmalar (SD) hesaplandı ve IC₅₀ değerleri olarak verildi. a. Meme kanseri karşı klinik kullanımda olan kontrol steroid bileşiği, b. Kontrol antiproliferatif bileşiği, c. Kanser dışı kontrol.

Anti-kanser ilaç adaylarının gerçek terapötik potansiyelini belirlemek için normal hücrelere karşı seçiciliklerini değerlendirmek önemlidir. Bileşiğin kanser hücrelerine karşı güvenli seviyesini gösteren Seçicilik İndeksi (SI), bize değerli tahminler sağlar. Daha yüksek SI değeri, daha büyük bir anti-kanser özgüllüğünü gösterir ve SI değeri 3.0'un üzerinde olan bileşikler, yüksek seçici ajanlar olarak kabul edilir (Michalak ve ark. 2020)). Doksorubisin gibi yaygın kullanılan anti-kanser ilacının, SI değerlerine bakıldığında (MDA-MB-231 için 0.8 ve PC3 ve A549 için <0.01), düşük seçicilik indekslerinin hem kanser hem de

normal hücrelere karşı toksik olmalarının dezavantajını gösterdi. Çalışılan steroidal konjugatların ise kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksik aktivite sergilerken sağlıklı hücreye karşı toksik etkilerinin olmadığı, konjugatların yüksek SI değerleri ile desteklendi (SI=3.0–9.5). Yapılan değerlendirmede, referans ilaç DOX'un sağlıklı MRC-5 hücrelerine yüksek toksik etkisi olduğu, seçicilik indeksinin düşük olduğu (SI= 1.0 ve 0.06) ve genel anlamda sitotoksik etkisinin olduğu görüldü. Diğer yandan DOX, PC3 hücreleri üzerinde etkisinin olmadığı daha önceki çalışma raporları ile uyumlu olarak bulundu.

Formestan için elde edilen verilerden hem kanser ham de sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve yüksek IC₅₀ değerlerine sahip olduğu görüldü (SI=>1.8).

Test edilen tüm konjugatlar (**5-9**), meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231) karşısında düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif aktivite sergiledi. IC₅₀ değerleri 16.0 ile 37.0 µM arasında değişmekte olup, bu sonuçların steroid konjugatlarının MDA-MB-231 hücre büyümesini inhibe etmede genel bir rol oynadığını gösterdi. Doksorubisin meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivitesi IC₅₀ değeri olarak 0.16 mM olarak bulundu. Özellikle konjugatlar arasında konjugat **8**, DHEA grubunun varlığı sayesinde, en düşük IC₅₀ (16.4 µM) değerine sahip antiproliferatif aktivite sergiledi. Referans ilaç ile kıyaslandığında, DOX'in aksine konjugat **8**' in inhibe etme konsantrasyonu daha yüksektir ancak SI değeri olarak bakıldığında meme kanseri hücreleri için özgül olabileceğini göstermektedir. DHEA, vücutta hem testosteron hem de estron'a metabolize olur ve laboratuvar hayvanlarında hem androjenik hem de östrojenik etkilere yol açar. DHEA'nın meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını östrojen reseptörü aktivasyon yoluyla inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarda önerildi (Matsuzaki ve Honda, 2006)). MDA-MB-231 meme kanser hücreleri üçlü negatiftir ve üçlü negatif meme kanserleri, hasta öngörüsü zayıf olan kanser türleri ile ilişkilendirilir. Bugüne kadar üçlü negatif meme kanserleri için az sayıda hedefe yönelik tedavi geliştirilmiş olduğundan, MDA-MB-231 hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe eden bileşiklerin tanımlanması, daha etkili tedavilerin gelecekte geliştirilmesi için önemli olabilir.

Neredeyse tüm bileşikler PC3 prostat hücreleri karşısında güçlü antiproliferatif aktivite gösterdi. Konjugatlar arasında, **9**, 3-okso-4-en sistemine sahip olarak en yüksek antiproliferatif etki (IC₅₀ 10.5 µM) sergiledi, konjugatlar **8** ve **6**, kanser hücrelerini benzer olarak düşük konsantrasyon değerlerinde inhibe etti (sırasıyla IC₅₀ 11.3 µM ve 18.6 µM). Tablo 1' den, test edilen tüm bileşiklerin PC3 hücrelerine karşı Formestan' den daha güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği sonucuna varıldı. DOX ise sitotoksik olarak etkisiz olduğu görüldü (IC₅₀ 96.3 µM). Formestan'ın CYP19, 5α-redüktaz ve steroidogenez ve hücre proliferasyonunda yer alan diğer enzimlerin bilinen bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (Savić ve ark., 2020). Formestan'ın PC3 kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi DOX ile kıyaslandığında yüksek olduğu görüldü (IC₅₀ 46.7 µM). Akciğer kanser hücreleri A549 açısından değerlendirildiğinde, konjugatlar arasında **6**' nın, en düşük konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiği elde edildi (IC₅₀ 14.8 µM). Diosgenin yapısındaki hetero şeker bileşiği (E ve F spiro halkalar) ve 5,6-çift bağ, A549 hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilme ve apoptozu tetiklemesinin p13k/Akt yollarının baskılanmasının bir sonucu olduğu, ayrıca A549 hücre hattında hTERT gen ifadesini azalttığı

yapılan çalışmalarda bildirildi (Xu ve ark. 2019; Trouillas ve ark. 2005). DOX' e kıyasla tüm konjugatların etkisi düşüktür. Ancak SI değeri ile karşılaştırıldığında konjugatların kanserli hücreye daha seçici inhibisyon sergiledikleri görüldü. DOX' nin A549 hücrelerine karşı SI değeri < 0.01 iken bu değer konjugat **6** için > 6.8 olarak bulundu.

In vitro çalışma sonuçlarına göre, konjugatların antiproliferatif aktivitesinin öncelikle kumarin halkasının steroid bileşiklerine dahil edilmesi ile ilişkili olduğunu gösterdi. Kumarin halkasının, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptozisin uyarılması ve tümör hücrelerinin büyümesini ve ilerlemesini teşvik eden hiyalüronik asit sentezini inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirildi (Hani ve ark. 2016). Bu çalışmada elde edilen *in vitro* sonuçlar, tüm konjugatların çeşitli hücre hatlarına karşı antiproliferatif etki gösterdiklerini sergiledi. Bu etkilerinin belirleyicilerinden biri, steroid bileşiklerinin lipofilitesidir. Spesifik olarak çalışmada kullanılan steroid bileşiklerin birçok nükleer ve transmembran reseptörün aktivasyonunu veya inhibisyonunu düzenleyerek, kanser hücrelerinin ilerlemesi ve metastazı ile yakından ilgili olduğu yine bildirilen çalışmalarda bulundu (İlkar Erdagi 2023; Kowalczyk ve ark. 2021).

3.2. Steroidal kumarin konjugatlarının *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları

Her canlı sistemde (insan, hayvan, bitki, mantar veya bakteri), herhangi bir fonksiyon veya etkinlik, moleküler, hücresel veya organ seviyesinde biyolojik olaylara çevrilebilir. Steroidal konjugatların antiproliferatif aktiviteleri üzerine bir çalışma yapıldı ve moleküler bağlanma çalışması, moleküllerin temel etkinlik öngörüsü araştırmasından sonra geldi (Mahalakshmi ve Parthasarathy 2023). Moleküler bağlanma çalışmaları, yan etkisi olmayan veya minimum yan etkisi olan ilaçların keşfi için yaygın olarak kullanılan, ilaç tasarımında gerekli ve önemli bir adımdır. Hedef proteinlerin seçimi ve önceliklendirilmesi, bir hastalığa dayalı olarak çalışmak için literatür ve veri tabanlarında veri madenciliği yöntemleri ile gerçekleştirilir, bu sayede proteinle etkileşme sonuçları elde edilir (Yu ve ark. 2018).

Moleküler bağlanma genellikle, ligandın ve hedef biyomolekülün konformasyonlarının reseptörün belirlenen aktif bölgesinde geometrik optimizasyonunu içeren iki aşamalı bir süreçten oluşur (Cortes ve ark. 2005). Ardından, bunları skorlama işlevlerine göre sıralayarak, bu skorlama işlevi, kullanılan yazılımın geliştirilmesinde kullanılan algoritmaya bağlı olarak bir yazılımdan diğerine farklılık gösterir. Potansiyel, *in vitro* uygulamada doğru bağlanma modunu ne kadar iyi tahmin ettiğinde yatar (Sreenatha ve ark. 2022). Bu nedenle, yeni tasarlanan konjugatlara (**5-9**) için aromataz, 17,20-liaz, androjen reseptör ve östrojen reseptör alfa alanına karşı uygulanan moleküler bağlanma çalışmaları yapıldı.

Tablo 2 Steroidal konjugatların (5-9) ve anti-kanser ilaçlarının protein hedefleri olan aromataz (CYP19), 17,20-liaz (CYP17), androjen reseptörü (AR) ve östrojen reseptörü (ER α) ile moleküler bağlanma enerjileri (ΔG (kcal/mol))

Konjugat	CYP19	CYP17	AR	ER α
5	-11.56	-11.38	-9.40	-11.65
6	-11.31	-11.37	-9.64	-11.13
7	-11.94	-12.09	-9.00	-10.61
8	-12.94	-12.37	-9.93	-11.32
9	-12.56	-12.07	-9.14	-10.13
AER		-10.67		
ASD	-10.67			
OHT				-9.94
DHT			-11.19	
Formestan ^a	-11.80			

^a referans inhibitör (Nikolic ve ark. 2015)

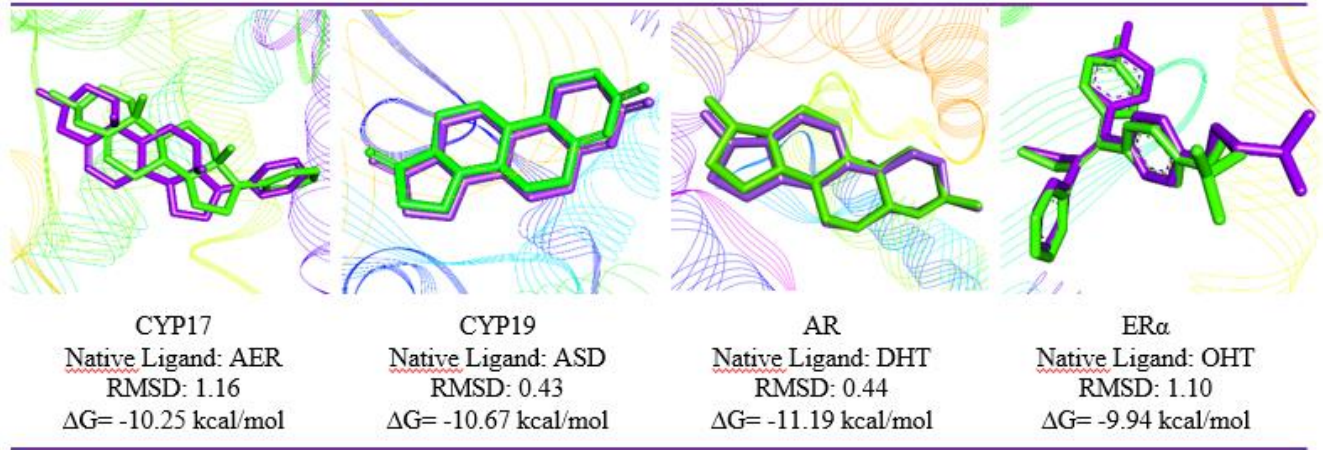
Dört farklı hedef proteine konjugatlar iyi bağlanma afinitesi gösterdi ve elde edilen sonuçlar Tablo 2' de verildi. Konjugat ligandların, genellikle π -alkil, π - π kontakları, π -donör hidrojen, karbon-hidrojen ve konvensiyonel hidrojen bağları gibi çeşitli etkileşimler aracılığıyla proteinlerle etkileşime girdiği görüldü. Bağlanma prosedürünü doğrulamak için kristalize enzim ve reseptör yapılarındaki doğal ligandlar (CYP17A1 için Abirateron (AER), CYP19A1 için Androstendion (ASD), AR için Dihidrotosteron (DHT), ve ER α için 4-hydroxytamoxifen (OHT) kendi orijinal bağlanma bölgelerine tekrar bağlandı. Tüm kontrol bağlanma simülasyonları, ilgili kristal yapıdaki ligand-protein geometrilerini üretti. Kristal yapılarda ligandların tekrar bağlanması, bağlanmış ligandın ve X-ışını kristal yapılarından elde edilen koordinatlar arasında kök ortalama kare sapma (RMSD) ≤ 1.2 Å ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildi (Şekil 2). Formestanın hedefi CYP19 ile çözülmüş bir kristal yapısı olmasa da formestan iyi bilinen bir CYP19 inhibitörüdür ve bu nedenle CYP19 bağlanma simülasyonlarında karşılaştırma amacıyla dahil edildi. Tahmini bağlanma enerjileri yaklaşık olarak $\Delta G < -10$ kCal/mol, kontrol bağlanma çalışmalarına dayanarak önemli kabul edildi.

Tekrar bağlanma işleminden elde edilen RMSD değerleri 1.2 Å' un altındadır bu çalışmada kullanılan protokolün geçerli olduğu ve ligand bileşiklerin (5-9) bağlanma çalışması için uygun olabileceği anlamına gelmektedir (Şekil 2). Her bağlanma hesaplanmasında dokuz bağlanma konumu oluşturuldu ve elde edilen en yüksek bağlanma skoru (serbest enerji = $\Delta G = -$ kcal/mol) seçilerek verildi. Orijinal ligandlar ve konjugatların çalışılan enzim ve reseptörler için bağlanma skorları Tablo 2' de verildi. Tüm bağlanma skorları incelendiğinde, konjugat 8'in dört reseptöre karşı en yüksek bağlanma skoru gösterdiği görüldü. CYP17A1 ve CYP19A1' e karşı yapılan bağlanma skorları, konjugatların tümünün (5-9), sırasıyla referans ligandlar AER ve ASD' den ($\Delta G = -10.25$

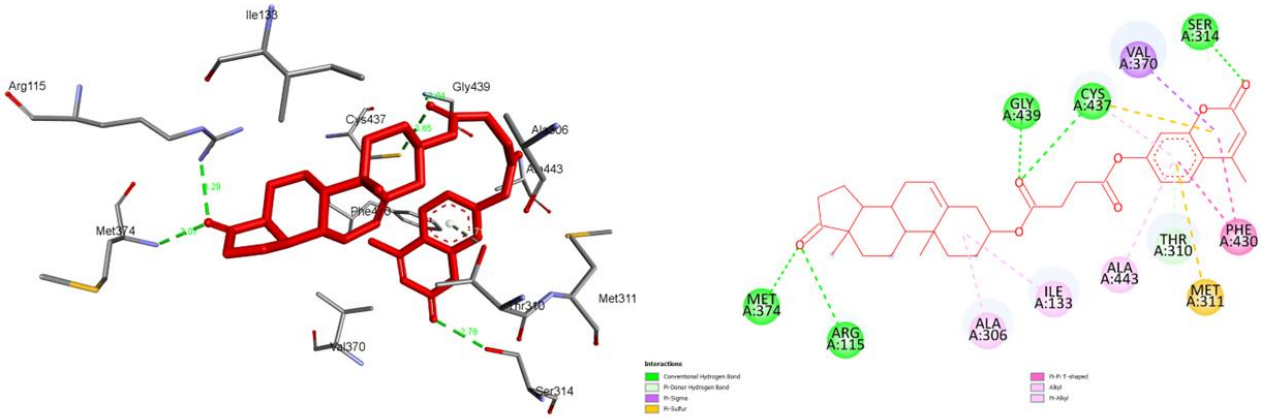
kCal/mol ve $\Delta G = -10.67$ kCal/mol) daha yüksek bağlanma skorlarına ($\Delta G = 11.37$ ile -12.37 kCal/mol ve $\Delta G = -11.31$ ile -12.94 kcal/mol arasında) sahip olduğunu gösterdi.

Diğer yandan AR' e karşı yapılan bağlanma skorları, konjugat 8 ($\Delta G = -9.93$ kcal/mol) için en yüksek olduğu ve referans ligand DHT' den ($\Delta G = -11.19$ kcal/mol) daha düşük bağlanma skorlarına sahip olduğunu gösterdi. Son olarak ER α ' e karşı yapılan bağlanma skorları, tüm konjugatların, referans ligand OHT' den ($\Delta G = -9.94$ kcal/mol) daha yüksek bağlanma skorlarına sahip olduklarını gösterdi. Konjugatlar arasında 8 ve 5 sırasıyla $\Delta G = -11.32$ kcal/mol ve $\Delta G = -11.65$ kcal/mol en iyi bağlanma skorlarına sahip bileşikler olarak belirlendi. Konjugatlar yapılarındaki steroid halkası ve kumarin gruplarının birden fazla protein fonksiyonel grubuyla polar temas oluşturma yeteneği sayesinde, bu konjugatların birden fazla hedefe önemli bir afinite ile bağlanması tahmin edilmektedir. Elde edilen sonuçlardan bu konjugatların, steroid üretiminde dahil olan birden fazla hedefi inhibe edebilecek yeni steroidal hibrit bileşiklerin tasarımı için kullanışlı olabileceğini öne sürmektedir.

Moleküler bağlanma simülasyonları sonrasında elde edilen konjugat 8'in aromataz (CYP19), 17,20-liaz (CYP17) ve AR' e ve konjugat 8 ve 5'in ER' e karşı bağlanma önerilen modelleri sırasıyla Şekil 3-6' da sunuldu. Ligandların reseptör proteinlerine bağlanması genellikle zayıf etkileşimlerle gerçekleşir, bu da iyonik bağlar, hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkiler gibi etkileşimleri içerir. Bu nedenle, mevcut araçların kullanılabilirliğine bağlı olarak, ligandlar ile reseptörler arasındaki hidrojen bağı ve hidrofobik bağ oluşumlarına katılan kalıntıları analiz edildi. İlk olarak, elde edilen konformasyonlar Discovery Studio ile görselleştirildi ve reseptör ile ligandlar arasında oluşan hidrojen bağları incelendi.



Şekil 2. Yeniden bağlanma konformasyonların ve deneysel konformasyonların örtüşmesi

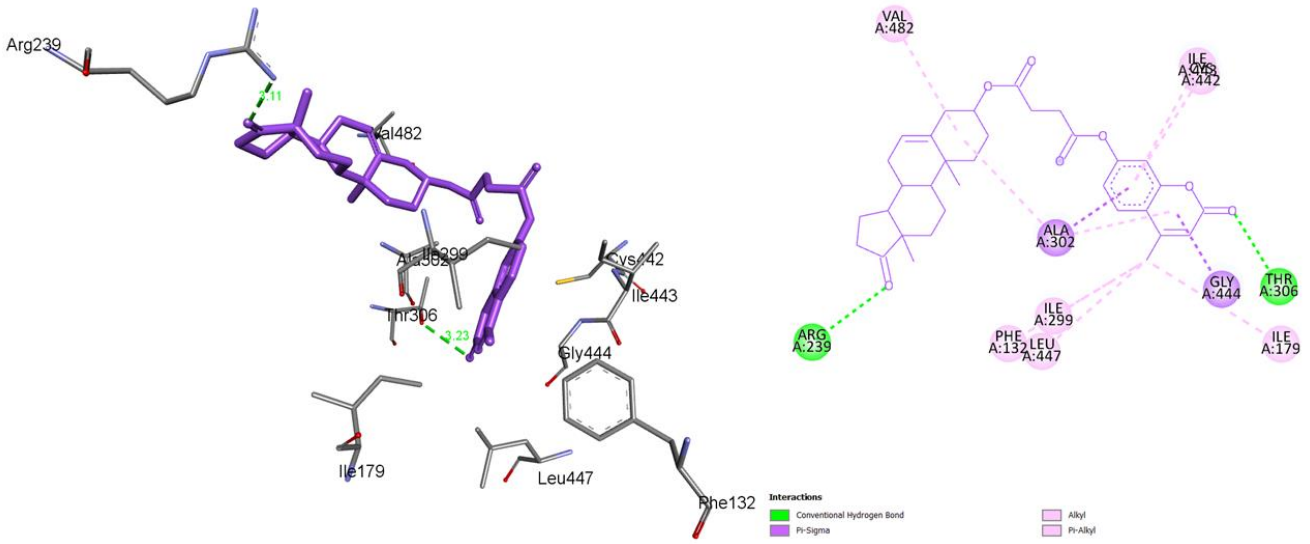


Şekil 3. CYP19 (PDB ID: 3EQM) ile konjugat 8' in ligand-protein etkileşimleri

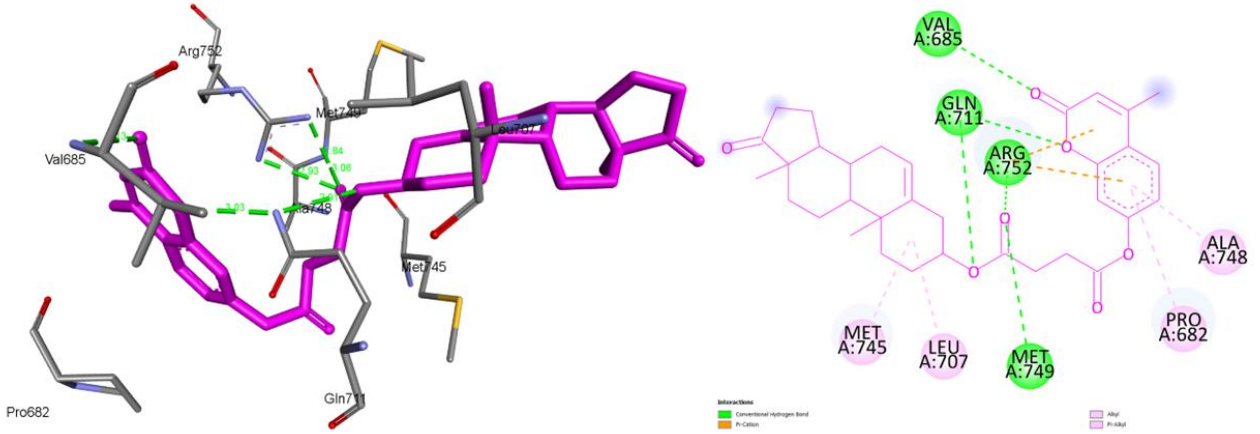
İnsan plasental aromataz sitokrom P450 kristal yapısı (androstendion kompleksi tarafından inhibe edilmiş oksidoredüktaz) 3EQM, tüm konjugatlar (5-9) ile moleküler bağlanma işlemine tabi tutuldu (Ghosh ve ark. 2009). Konjugat arasında 8' in iyi bir bağlanma enerjisi gösterdiği ($\Delta G = -12.94$ kCal/mol) ve π -sülfür, π -alkil, alkil, π - π T şekilli, π -sigma, π -donör hidrojen bağları ve konvensiyonel hidrojen bağları ile güçlü etkileşimler sergilediği tespit edildi. Bu etkileşimlerden konvensiyonel hidrojen bağlarının, sırasıyla Met374 ve Arg115 kalıntıları arasında 4.32 Å ve 4.59 Å açılarında, Gly439 ve Cys437 kalıntıları arasında 3.52 Å ve 4.93 Å açılarında ve son olarak Ser314 kalıntısı ile 4.60 Å açısında olduğu belirlendi. Bu bağlanma etkileşimlerinin 2D ve 3D görüntüleri Şekil 3' te detaylandırıldı. Konjugat 8' in aromataz' a bağlanması, doğal ligand olan androstendion ile kristal yapısında görülenle benzer bir yapı sergilediği öne sürüldü. Steroid molekülünün bir tarafında, 17-keton fonksiyonunun (D halkası) Arg115 kalıntısı ile ve Met374' in amino grubu hidrojen bağları oluşturduğu görüldü. Diğer tarafta ise konjugat 8' in kumarin halkası 2-keton fonksiyonunun Ser314' ün hidroksiline bağlandığı ve konjugasyonu sağlayan süksinat grubu üzerindeki keton

fonksiyonel grubunun Gly439 amino grubu ile Cys437 omurgası ile hidrojen bağları oluşturduğu gözlemlendi.

İnsan sitokrom P450 CYP17A1 kristal yapısı (abirateron kompleksi tarafından inhibe edilen oksidoredüktaz, 17,20-liaz) 3RUK, tüm konjugatlar (5-9) ile moleküler bağlanma işlemine tabi tutuldu (DeVore ve Scott 2012). Konjugat 8' in, 17,20-liaz' a bağlanma çalışmalarında, ligandın reseptöre bağlanmasını önerildi ve Şekil 4' te 2D ve 3D görüntüleri ile verildi. Böylece steroid halkasında polar temaslar oluşurken, süksinat grubu keton gruplarının, Cys442 ve Arg96 kalıntıları ile sırasıyla 5.01 Å ve 6.91 Å açılarında konvensiyonel hidrojen bağları oluşturdukları görüldü. Diğer yandan, kumarin halkası ile Cys442 kalıntısı arasında 5.92 Å açısında konvensiyonel hidrojen bağları olduğu gözlemlendi. Konjugat 8 ile enzim arasında ayrıca π -sülfür ve π -alkil ile etkileşimler yaptığı önerildi. Abirateron doğal ligandının kristal yapısındaki 17, 20-liaz' a bağlanmasıyla konjugat 8' inin benzer olduğu elde edildi. Tahmini bağlanma enerjisi $\Delta G = -12.37$ kCal/mol iken, abirateron ile tekrar bağlanma sonrasında tahmini bağlanma enerjisi $\Delta G = -10.25$ kCal/mol olarak hesaplandı



Şekil 4. CYP17 (PDB ID: 3RUK) ile konjugat 8' in ligand-protein etkileşimleri

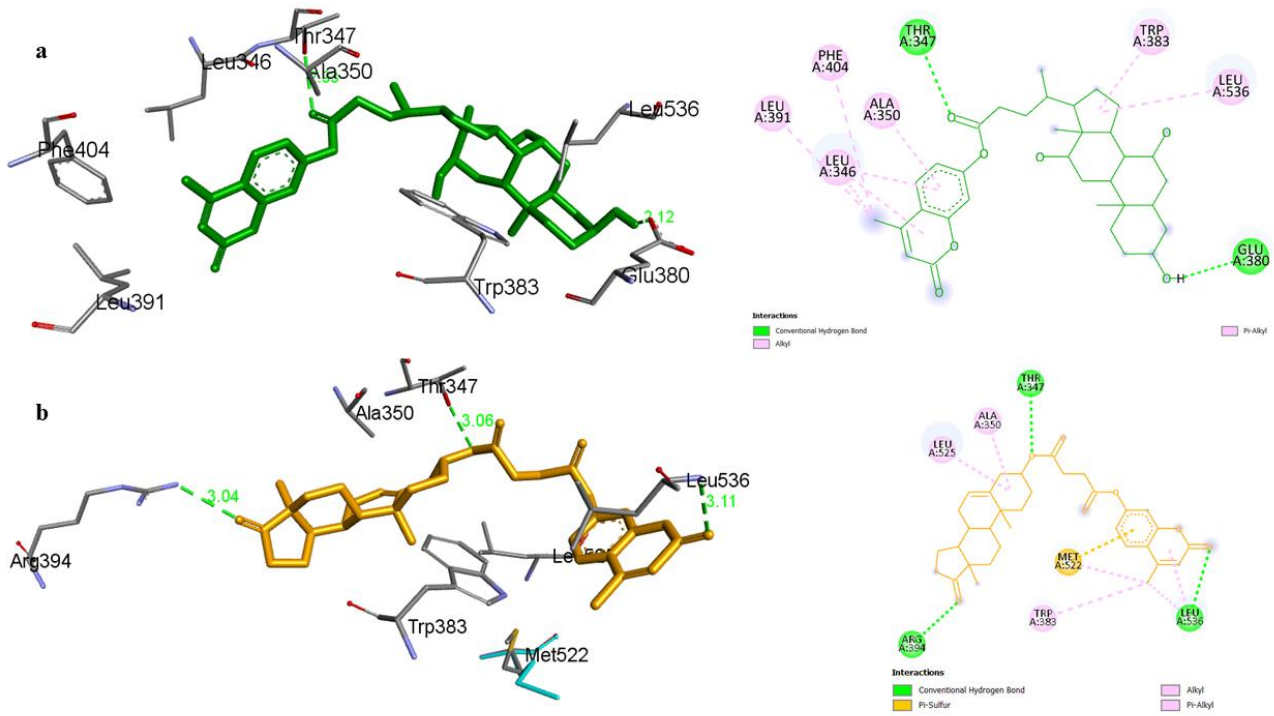


Şekil 5. AR (PDB ID: 2AMA) ile konjugat 8' in ligand-protein etkileşimleri

İnsan androjen reseptörü ligand bağlama bölgesinin dihidrotestosteron (DHT) ile kompleks halindeki kristal yapısı, 2AMA, konjugatlar (5-9) ile ağlanma analizine tabi tutuldu. Hidrofobik ve esnek cepleri içeren kristal yapının Arg 752 ve Gln 711 olmak üzere iki derin kalıntı içerdiği görüldü (Pereira de Jesus-Tran ve ark. 2006). Doğal ligand DHT, AR' e yüksek afiniteye sahiptir ($\Delta G = -11.19$ kCal/mol). Konjugatlar arasında, 8' in güçlü etkileşimler nedeniyle iyi bir bağlanma enerjisi sağladığı belirlendi ($\Delta G = -9.93$ kCal/mol). Bu etkileşimler, π -kation, π -alkil, alkil ve konvansiyonel hidrojen bağlarıdır. Konjugat 8' in süksinat grubu, Gln711, Met749 ve Arg752 kalıntıları ile bağ açılıarı 2.91, 3.06 \AA ve 2.84 (2.93) \AA olan konvansiyonel hidrojen bağları yaptığı ve aynı zamanda kumarin grubu üzerinden bağ açısı 3.13 \AA Val685 kalıntısı ile etkileşimde bulunduğu önerildi. Bu hidrojen bağı etkileşimleri DHT ile görülen ile benzerdir. Konjugat 8' in yaptığı ek hidrofobik etkileşimler, 2D ve 3D görüntüleri ile Şekil 5' te verildi.

İnsan östrojen reseptörü alfa ligand bağlama alanı, sentezlenen konjugatlar (5-9) ile 3ERT' in 4-

hidroksitamoksifen (OHT) ile kompleks halinde bağlanma işlemine tabi tutuldu (Shiau ve ark. 1998). ER' ün OHT ile oluşturdukları hidrojen bağlarına katılan kalıntılar Arg394 ve Glu353 olarak belirlendi (Shiau ve ark. 1998). Konjugatlar arasında, 5, iyi bir bağlanma enerjisine sahip olduğu ($\Delta G = -11.65$ kCal/mol) ve π -alkil, alkil ve π -sigma gibi hidrofobik etkileşimler dışında Thr347 ve Glu380 kalıntıları ile sırasıyla 2.33 ve 2.12 \AA açısında güçlü hidrojen bağları olduğu görüldü (Şekil 6a). Diğer yandan, konjugat 8, ikinci en iyi bağlanma enerjisine sahipti ($\Delta G = -11.32$ kCal/mol) ve π -alkil, π -sülfür, alkil ve konvansiyonel hidrojen bağları etkileşimlerine sahip olduğu tahmin edildi. Konjugat 8' in Arg394, Thr347 ve Leu536 kalıntıları ile sırasıyla 3.04 \AA , 3.06 \AA ve 3.11 \AA açılarında konvansiyonel hidrojen bağı etkileşimleri yaptığı Şekil 6b' de verildi. Konjugat 8' in 17-karbonil grubu ile Arg394 kalıntısının NH_2 grubu arasında güçlü bir hidrojen bağı gözlemlendi. Arg394 hem OHT hem de konjugat 8 ile etkileşimde ortak bir rol oynar. Bu konjugat 8' in ER için önemli bir ligand olabileceğini ve dolayısıyla ER fonksiyonu üzerinde inhibe edici bir etki gösterebileceği sonucuna varıldı.



Şekil 6. ER (PDB ID: 3ERT) ile konjugat 5 ve 8' in ligand-protein etkileşimleri

4. Sonuç

Bu çalışmanın sonuçları, karakterize edilen steroidal kumarin konjugatlarının potansiyel anti-proliferatif ve antikanser etkilerini ortaya koymaktadır. Konjugatlarının *in silico* moleküler bağlanma çalışmaları, *in vitro* anti-proliferasyon ve antikanser potansiyelleri değerlendirildi. Kumarin bileşiğinin steroid halkasına dahil edilmesinin etkileri incelendi. Moleküler bağlanma simülasyonları, meme, prostat ve akciğer kanser tedavisinde klinik olarak kullanılan steroidal kemoterapötik ajanların çeşitli hedefleri (Aromataz (CYP19A1), androjen reseptörü (AR), 17 α -hidroksilaz/17,20-liaz (CYP17A1) ve östrojen reseptörü α (ER α) karşısında gerçekleştirildi. Konjugat 8' in yüksek afiniteli olarak birden fazla moleküler hedefe bağlanabileceği öngörüldü. Antiproliferatif aktivite, üç insan kanser hücre hattında (meme adenokarsinomu (MDA-MB-231); prostat kanseri (PC3) ve akciğer adenokarsinomu (A549)) *in vitro* olarak ölçüldü. Konjugatların antiproliferatif etkileri, formestan ve doksorubisin gibi referans ilaçlarla karşılaştırılarak değerlendirildi. Sitotoksik olarak etkileri belirlenmek için normal kanser olmayan kontrol hücre hattına karşı (MRC-5) minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlendi. Çoğu konjugat, moleküler bağlanma sonuçlarına uyumlu olarak çeşitli kanser hücre hatlarının büyümesini inhibe ettiği görüldü. Bazı konjugatlar, kanser hücre hatlarına karşı referans ilaç doksorubisinden daha yüksek antiproliferatif aktivite sergilerken, tüm konjugatların kanserli olmayan sağlıklı hücrede toksisiteye neden olmadığı tespit edildi. Moleküler bağlanma taramasından elde edilen steroidal konjugatlar ile enzim hedefleri arasında gösterilen iyi bağlanma enerjisi, bu konjugatları potansiyel bir antiproliferatif ajan olarak değerli kılmaktadır. Sonuçlar,

steroidal konjugatların, birden fazla steroidogenez yolunu modüle eden bileşiklerin tasarımında kullanılabilecek esnek yapılar olduğunu göstermektedir. Biyolojik olarak aktif grupların konjugasyonu veya modifikasyonu, yapı-aktivite ilişkilerini daha iyi anlamaya ve ilgili hedef enzimlerin etkin bölgesindeki önemli etkileşimleri belirlemeye yardımcı olabilir.

Teşekkürler

Prof. Dr. Ufuk YILDIZ' a (Kocaeli Üniversitesi, Kimya Bölümü) önerileri ve Kimya Araştırma Laboratuvarını bu çalışmada kullanılmasına izin verdiği için teşekkür ederim.

Yazar katkısı: Sevinç İlkar Erdağı: Kavramsallaştırma, Metodoloji, Veri düzenleme, Formal analiz, Proje yönetimi, Yazım-orijinal taslak, Yazım-gözden geçirme ve düzenleme.

Çıkar çatışması açıklaması: Herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

Kaynaklar

- Bansal R, Suryan A. 2022. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. ACS Bio & Med Chem Au. 2(4): 340–369.
- Cai B, Liao A, Lee K K, Ban J S, Yang, H S, Im Y J, Chun C. 2016. Design, synthesis of methotrexate-diosgenin conjugates and biological evaluation of their effect on methotrexate transport-resistant cells. Steroids. 116: 45–51.
- Cai D, Qi J, Yang Y, Zhang W, Zhou F, Jia X, Guo W, Huang X, Gao F, Chen H, Li T, Li G, Wang P, Zhang Y, Lei H. 2019. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Diosgenin-Amino Acid Derivatives with Dual Functions of Neuroprotection and Angiogenesis. Molecules. 24(22): 4025.

- Cortes J, Simeon T, Ruiz de Angulo V, Guieysse D, Remaud-Simeon M, Tran V. 2005. A path planning approach for computing large-amplitude motions of flexible molecules. *Bioinformatics*. 21(1): 116–125.
- Dembitsky V M, Glorizova T A, Imbs A B. 2018. Ferrocene and titanocene steroid conjugates: Structures and activities a brief review. *Vietnam J. Chem*. 56(2): 127–138.
- DeVore N M, Scott E E. 2012. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature*. 482(7383): 116–119.
- Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, Forli S. 2021. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J. Chem. Inf. Model*. 61(8): 3891–3898.
- Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. 2009. Structural basis for androgen specificity and estrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 457(7226): 219–223.
- Hani U, Osmani R A M, Bhosale R R, Shivakumar H G, Kulkarni P K. 2016. Current Perspectives on Novel Drug Delivery Systems and Approaches for Management of Cervical Cancer: A Comprehensive Review. *Curr. Drug Targets*. 17(3): 337–352.
- İlkar Erdağı S. 2023. Steroid-Hymecromone Conjugates with Improved Antiproliferative and Antimicrobial Potential: Synthesis, Biological Evaluation, and *in silico* ADME Prediction. *ChemistrySelect*. 8(25).
- İlkar Erdağı S, Uyanik C. 2019. Biological evaluation of bioavailable amphiphilic polymeric conjugate based on natural products: diosgenin and curcumin. *Int. J. Poly. Mater*. 69(2): 73–84.
- İlkar Erdağı S, Yildiz U. 2022. Synthesis of diosgenin derivatives by A and B ring modifications and low-valent titanium (Ti0)-catalyzed McMurry coupling reactions and designing to create novel biological agents. *J. Mol. Struct*. 1256: 132511.
- Ke S, Shi L, Yang Z. 2015. Discovery of novel isatin-dehydroepiandrosterone conjugates as potential anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett*. 25(20): 4628–4631.
- Kowalczyk W, Waliszczak G, Jach R, Dulinska-Litewka J. 2021. Steroid Receptors in Breast Cancer: Understanding of Molecular Function as a Basis for Effective Therapy Development. *Cancers*. 13(19): 4779.
- Kurmi B D, Paliwal R, Paliwal S R. 2020. Dual cancer targeting using estrogen functionalized chitosan nanoparticles loaded with doxorubicin-estrone conjugate: A quality by design approach. *Int. J. Biol. Macromol*. 164: 2881–2894.
- Mahalakshmi N, Parthasarathy M. 2023. Growth, structural, spectroscopic, DFT calculations, *in silico* biological analysis of glycine methyl ester hydrochloride (GMEHCl) against human estrogen receptor. *Chem. Phys. Impact*. 7: 100303.
- Matsuzaki Y, Honda A. 2006. Dehydroepiandrosterone and Its Derivatives: Potentially Novel Anti-Proliferative and Chemopreventive Agents. *Curr. Pharm. Des*. 12(26): 3411–3421.
- Michalak M, Lach M S, Antoszczak M, Huczynski A, Suchorska W M. 2020. Overcoming Resistance to Platinum-Based Drugs in Ovarian Cancer by Salinomycin and Its Derivatives-An In Vitro Study. *Molecules*. 25(3): 537.
- Navacchia M L, Marchesi E, Perrone D. 2020. Bile Acid Conjugates with Anticancer Activity: Most Recent Research. *Molecules*. 26(1): 25.
- Nikolic A R, Petri E T, Klisuric O R, Celic A S, Jakimov D S, Djurendic E A, Penov Gasi K M, Sakac M N. 2015. Synthesis and anticancer cell potential of steroidal 16,17-seco-16,17a-dinitriles: Identification of a selective inhibitor of hormone-independent breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem*. 23(4): 703–711.
- Osuji I J, Vera-Bolanos E, Carmody T J, Brown E S. 2010. Pregnenolone for cognition and mood in dual diagnosis patients. *Psychiatry Res*. 178(2): 309–312.
- Pereira de Jesus-Tran K, Cote P, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. 2006. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci*. 15(5): 987–999.
- Rocha-Roa C, Cortes E, Cuesta S A, Mora J R, Paz J L, Flores-Sumozza M, Marquez E A. 2023. Study of potential inhibition of the estrogen receptor α by cannabinoids using an *in silico* approach: Agonist vs antagonist mechanism. *Comput. Biol. Med*. 152: 106403.
- Savic M P, Skoric D, Kuzminac I Z, Jakimov D S, Kojic V V, Rarova L, Strnad M, Djurendic E A. 2020. New A-homo lactam D-homo lactone androstane derivative: Synthesis and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities *in vitro*. *Steroids*. 157: 108596.
- Shiau A K, Barstad D, Loria P M, Cheng L, Kushner P J, Agard D A, Greene G L. 1998. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*. 95(7): 927–937.
- Sreenatha V, Srinivasa S M, Rajendra Prasad K. 2022. Design, synthesis, bioevaluation, DFT, docking, and molecular dynamic simulation for selected novel 1,3,4-Oxadiazole-indole derivatives hybrid against estrogen receptor alpha. *J. Mol. Struct*. 1269: 133789.
- Trott O, Olson A J. 2009. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem*. 31(2): 455–461.
- Trouillas P, Corbiere C, Liagre B, Duroux J L, Beneytout J L. 2005. Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg. Med. Chem*. 13(4): 1141–1149.
- Xu L, Xu D, Li Z, Gao Y, Chen H. 2019. Synthesis and potent cytotoxic activity of a novel diosgenin derivative and its phytosomes against lung cancer cells. *Beilstein J. Nanotechnol*. 10: 1933–1942.
- Xu Z, Zhang T, Prinyawiwatkul W, Samuel Godber J. 2005. Capabilities of different cooking oils in prevention of cholesterol oxidation during heating. *is J. Am. Oil Chem. Soc*. 82(4): 243–248.
- Yu K H, Lee T L M, Wang C S, Chen Y J, Re C, Kou S C, Chiang J H, Kohane I S, Snyder M. 2018. Systematic Protein Prioritization for Targeted Proteomics Studies through Literature Mining. *J. Proteome Res*. 17(4): 1383–1396.