



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Silkkiyrttien steroidiglykosidit ja niiden lääketieteellinen potentiaali

Roosa Koskinen

Pääaine Kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

9.6.2026

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Roosa Koskinen

Otsikko: Silkkiyrttien steroidiglykosidit ja niiden lääketieteellinen potentiaali

Ohjaaja(t): Maarit Karonen ja Juha-Pekka Salminen

Sivumäärä: 21 sivua + liitteet 5 sivua

Päivämäärä: 9.6.2026

Silkkiyrtit (*Asclepias*) tuottavat runsaasti rakenteellisesti monimuotoisia steroidiglykosideja, joilla on merkittäviä biologisia vaikutuksia. Näistä yhdisteistä suvussa esiintyy erityisesti kardenolidiglykosideja sekä C21-steroidiglykosideja, joiden bioaktiivisuus on herättänyt laajaa kiinnostusta kemiallisesta ja lääketieteellisestä näkökulmasta. Tämän tutkielman tavoitteena oli tarkastella silkkiyrttien steroidiglykosidien kemiallista monimuotoisuutta, bioaktiivisuutta ja lääketieteellistä potentiaalia.

Silkkiyrttien kardenolidiglykosidien vaikutus perustuu ensisijaisesti Na⁺/K⁺-ATPaasin estoon, ja yhdisteiden aktiivisuuteen vaikuttavat voimakkaasti rakenteelliset tekijät, kuten laktonirengas, hydroksyyliyhdyntien sijainti ja C-3-aseman sokeriosan rakenne. Useat silkkiyrttien kardenolidiglykosidit ovat osoittaneet merkittävää sytotoksisuutta ja antiproliferatiivista aktiivisuutta syöpäsoluja vastaan. C21-steroidiglykosidit ovat puolestaan osoittaneet pääosin heikompaa sytotoksisuutta, mutta niillä on havaittu muun muassa monilääkeresistenssiä muokkaavia vaikutuksia. Lisäksi silkkiyrttien kasviuutteilla on raportoitu antibakteerisia, antifungaalisia ja antiparasiittisia vaikutuksia.

Silkkiyrttien steroidiglykosidit muodostavat lupaavan luonnonyhdisteiden ryhmän, jonka rakenteellinen monimuotoisuus tarjoaa runsaasti mahdollisuuksia uusien lääkeainekandidaattien kehittämiseen. Erityisesti yhdisteiden rakenne-aktiivisuussuhteiden ja vaikutusmekanismien tarkempi selvittäminen ovat keskeisiä tulevaisuuden tutkimussuuntia.

Avainsanat: antiproliferatiivisuus, asclepias, bioaktiivisuus, C21-steroidiglykosidi, kardenolidiglykosidi, sytotoksisuus, silkkiyrtit, steroidiglykosidit

Sisältö

Lyhenteet.....	
1 Johdanto.....	1
2 Silkkiryttien steroidiglykosidit	2
2.1 Kardenolidiglykosidit.....	2
2.2 Pregnaaniglykosidit	4
3 Steroidiglykosidien bioaktiivisuus	5
3.1 Kardenolidien kardioaktiivisuus	5
3.2 Sytotoksisuus ja antiproliferatiivisuus	10
3.2.1 Kardenolidiglykosidit	10
3.2.2 Pregnaaniglykosidit	14
3.3 Muut havaitut bioaktiivisuudet.....	15
4 Valmistus	16
4.1 Biosynteesi.....	16
4.2 Semisynteesi	19
5 Johtopäätökset ja tulevaisuuden näkymät	20
6 Lähteet	22

Lyhenteet

3 β HDS	3 β -hydroksisteroididehydrogenaasi
GT	glykosyyli transferaasi
MAPK	mitogeenin aktivoiman proteiinikinaasi
MVA	mevalonihappo
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -vaihtajaproteiini
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATP
P450 _{scc}	P450-sivuketjun lohkaisijaentsyymi
PI3K/AKT/mTOR	fosfatidyyl-inositoli-3-kinaasi/proteiinikinaasi B/mTOR-signaalireitti
ROS	reaktiiviset happilajit
SR	sarkoplasmakalvosto
SRC	Src-tyrosiinikinaasi
TNC	troponiini C

Tutkielman kirjoitusprosessissa on hyödynnetty Zotero-ohjelmaa viitteiden hallintaan sekä Microsoft Copilotia kielellisen tuen ja tekstin selkeyttämisen apuvälineenä.

1 Johdanto

Luonnonyhdisteet ovat tärkeä biologisesti aktiivisten yhdisteiden lähde, ja merkittävä osa nykyisistä lääkeaineista on peräisin kasveista tai pohjautuu kasviperäisiin rakenteisiin (Elshafie et al., 2023; Newman & Cragg, 2020). Yksi keskeinen luonnonyhdisteiden ryhmä on kasvien tuottamat erikoistuneet metaboliitit, jotka osallistuvat muun muassa kasvin puolustukseen, vuorovaikutuksiin ympäristön kanssa sekä erilaisiin stressivasteisiin (Elshafie et al., 2023). Näihin metaboliitteihin kuuluvat myös steroidiglykosidit, jotka muodostavat triterpenoideihin kuuluvan rakenteellisesti monimuotoisen ja bioaktiivisen yhdisteryhmän (Tomilova & Nosov, 2025). Tutkimuksellisesti erityisen kiinnostavia ovat kasvisuvut, joissa esiintyy runsaasti rakenteellisesti monimuotoisia steroidiglykosideja, kuten silkkiyrttien (*Asclepias*) suku, joka tunnetaan laajasta ja kemiallisesti monimuotoisista steroidiglykosidiryhmistä (Agrawal et al., 2012).

Silkkiyrtit ovat *Apocynaceae*-heimoon kuuluva kasvisuku, jonka alkuperäinen levinneisyysalue kattaa Amerikan sekä trooppisen ja eteläisen Afrikan, ja jonka useita lajeja on myöhemmin levinnyt vieraslajeina Eurooppaan, Aasiaan ja Australiaan (Plants of the World Online 2026). Sukuun kuuluu noin 210 lajia (Plants of the World Online, 2026), ja se tunnetaan erityisesti ekologisesti merkittävistä puolustusmetaboliiteista, joiden koostumus vaihtelee huomattavasti lajien välillä. Silkkiyrttien tuottamiin steroidiglykosideihin kuuluvat pääasiassa kardenolidiglykosidit tai C21-steroidiglykosidit (Agrawal et al., 2012; Araya et al., 2016). Nämä yhdisteryhmät muodostavat yhden keskeisen osan tätä kemiallista puolustusjärjestelmää. Tämä laajalle levinnyt ja ekologisesti sekä kemiallisesti monimuotoinen suku tarjoaa erinomaisen mallin kasvien puolustusmetabolian ja yhdisteprofiilien vaihtelun tutkimiseen. Lisäksi silkkiyrttejä on hyödynnetty perinteisessä lääketieteessä muun muassa kasvainten hoidossa (Kupchan et al., 1964), raskauspahoinvoinnissa ja hedelmällisyyteen liittyvissä vaivoissa (Ticktin & Dalle, 2005) sekä suolistoloisten ja ripulin hoidossa (Coe & Anderson, 1996), mikä on osittain lisännyt kiinnostusta niiden tuottamien metaboliittien mahdollisiin lääketieteellisiin sovelluksiin.

Silkkiyrttien steroidiglykosideilla on raportoitu olevan useita farmakologisesti merkittäviä vaikutuksia, minkä takia niiden yhdisteillä on potentiaalia lääkeaineina ja niiden esiasteina. Kardenolidiglykosidit tunnetaan erityisesti Na^+/K^+ -ATPaasin estäjinä (Ponce et al., 2025), ja niille on raportoitu myös sytotoksisia, antiproliferatiivisia (Reddy et al., 2019) sekä muita biologisia vaikutuksia (Agrawal et al., 2012). C21-steroidiglykosideilla on puolestaan raportoitu näiden bioaktiivisuuksien lisäksi myös monilääkeresistenssiin vaikuttavia ominaisuuksia (Yuan et al., 2016). Näiden bioaktiivisuuksien perusteella silkkiyrttien steroidiglykosideja voidaan pitää lupaavina yhdisteinä lääketieteellisen tutkimuksen kannalta.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää, millaisia steroidiglykosideja silkkiyrttien suvussa esiintyy ja millaisia rakenteellisia piirteitä niillä on. Tutkimuksessa tarkastellaan erityisesti kardenolidiglykosideja ja pregnaaniglykosideja, niiden kemiallista monimuotoisuutta sekä rakenteiden

ja bioaktiivisuuksien välisiä yhteyksiä. Lisäksi tavoitteena on arvioida kirjallisuuden perusteella, onko näillä yhdisteillä lääketieteellistä potentiaalia, erityisesti kardioaktiivisuuden, sytotoksisuuden, antiproliferatiivisuuden ja muiden havaittujen aktiivisuuksien näkökulmasta.

2 Silkkiyrttien steroidiglykosidit

Steroidiglykosidit ovat triterpeenijohdannaisia, jotka koostuvat steroidisesta aglykoniosasta ja siihen liittyneestä sokeriosasta. Ne jaetaan useisiin alaluokkiin aglykonirakenteen perusteella (Tomilova & Nosov, 2025). Silkkiyrteissä esiintyvät steroidiglykosidit jaetaan pääasiassa kahteen ryhmään, kardenolidiglykosideihin ja C21-steroidiglykosideihin, joilla on merkittäviä biologisia vaikutuksia. Seuraavaksi tarkastellaan näiden kahden yhdisteryhmän rakennetta ja esiintymistä silkkiyrteissä.

2.1 Kardenolidiglykosidit

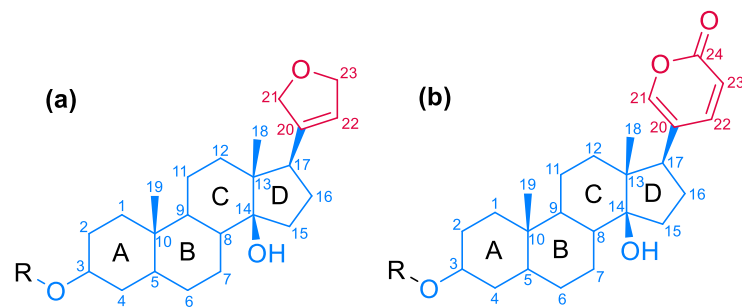
Sydänglykosidit, joita kutsutaan myös sydänaktiivisiksi glykosideiksi, ovat steroidiglykosideihin kuuluva ryhmä. Niitä on tavanomaisesti käytetty lääkkeinä yli 200 vuoden ajan ja käytetään edelleen laajasti, vaikka niillä on korkea toksisuus ja kapea terapeuttinen ikkuna (Bone & Mills, 2013). Sydänglykosidien farmakologinen vaikutus perustuu siihen, että ne voivat lisätä sydänlihaksen supistusvoimaa. Tämän takia ne ovat olleet erittäin tärkeitä sydämen vajaatoiminnan ja rytmihäiriöiden hoidossa (Alamgir, 2018). Viimeaikaisten tutkimuksien perusteella sydänglykosidit pystyvät myös indusoimaan apoptoosia tai estämään kasvaimen kasvua *in vitro* ja *in vivo* (Matsuo & Mimaki, 2024; Tian et al., 2018; Wen et al., 2016). Tämän vuoksi sydänglykosideja pidetään mahdollisina syöpälääkkeinä niiden merkittävän lääketieteellisen potentiaalin vuoksi.

Sydänglykosidit jaetaan kahteen päätyyppiin: kardenolideihin ja bufadienolideihin. Kardenolidien steroidinen aglykoniosa sisältää 23 hiiliatomia, kun taas bufadienolideilla aglykoniosa sisältää 24 hiiliatomia (Agrawal et al., 2012; Malcolm, 1991). Näiden päätyyppien välinen ero nähdään C-17-asemaan kiinnittyneen laktonirenkaan rakenteesta (

Kuva 1). Kardenolideja esiintyy yleisesti kasveissa, ja tähän ryhmään kuuluvat tärkeimmät terapeuttiset steroidiglykosidit, kuten digitoksiini ja digoksiini (Jiao et al., 2026). Bufadienolideja puolestaan esiintyy pääasiassa eläinperäisissä lähteissä sekä joissakin kasvisuissa, kuten tietyissä *Cotyledon*-, *Tylecodon*- ja *Kalanchoe*-sukujen lajeissa (El-Seedi et al., 2019). Bufadienolideja ei ole havaittu silkkiyrttien suvussa, kun taas kardenolidiglykosideja on karakterisoitu runsaasti.

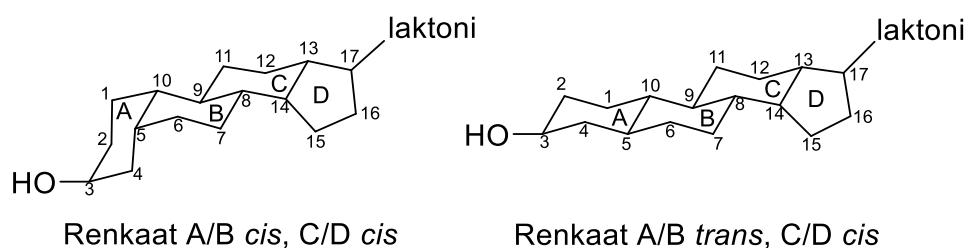
Kardenolidien rakenne koostuu kolmesta pääosasta (Agrawal et al., 2012). Näitä ovat steroidirunko eli aglykoniosa, joka muodostuu neljästä toisiinsa sulautuneesta renkaasta (A, B, C ja D), β -asemassa C-17-kohtaan liittynyt α , β -tyydyttymätön viisijäseninen laktonirengas (butenolidiryhmä) sekä C-3-asemaan liittynyt hiilihydraatti- eli sokeriosa (**Kuva 1**, Agrawal et al. 2012; Malcolm 1991). Suurimpaan osaan kardenolideista on liittynyt 1–4 sokeriyksikköä ketjumaisena rakenteena. Nämä

sokeriosat lisäävät yhdisteen sitoutumista sydänlihakseen ja yhdisteen vesiliukoisuutta. Sokeriryksiköt kiinnittyvät tyypillisesti aglykonin A-renkaan C-3-hiileen hydroksyyliiryhmän kautta (Agrawal et al., 2012; Malcolm, 1991). *Asclepias*-lajeissa esiintyy kuitenkin runsaasti myös kardenolidiglykosidi kalotropiinia sekä siihen liittyviä yhdisteitä, joissa yksittäinen sokeriosa muodostaa syklisten siltarakenteen kiinnittymällä sekä C2- että C3-hiileen. Tällöin muodostuu 1,4-dioksaanirengas (Zhang et al., 2014). Tämä kaksoiskiinnittyminen selittää yhdisteiden poikkeuksellisen stabiilisuuden happoja ja pelkistymistä vastaan (Petschenka et al., 2018). Kardenolidien aglykoniosa sisältää tyypillisesti hydroksyyliiryhmiä (OH-ryhmiä) ja niiden määrä vaihtelee huomattavasti eri kardenolideilla (El-Seedi et al., 2019). Tämä vaihtelu vaikuttaa kardenolidien jakautumiseen solujen vesipitoiseen väliaineeseen, mikä vaikuttaa merkittävästi niiden farmakokineettisiin ominaisuuksiin, kuten vaikutuksen alkamiseen ja keston (El-Seedi et al., 2019)



Kuva 1. kardenolidiglykosidin (a) ja bufadienolidiglykosidin (b) perusrakenne, jossa punaisella on merkitty laktoniosa, sinisellä steroidirunko ja R osoittaa sokerin/sokerien sitoutumiskohdan.

Apocynaceae-heimon monista kasvisuvuista kuten silkkiyrteistä peräisin olevilla kardenolidiglykosideilla on piirteitä, jotka erottavat ne muista tämän heimon sekä muiden heimojen kasveista. Yleisesti muun muassa *Digitalis*- ja *Strophantus*-kasvilajeista peräisin olevissa kardenolideissa, kuten digoksiini ja digitoksiini, A/B- sekä C/D-renkaat ovat molemmat *cis*-konfiguraatiossa (**Kuva 2**). Tämä antaa näille kardenolideille tyypillisen U-muodon. Silkkiyrteiden kardenolideilla on taas tyypillistä steroidirungon A/B-renkaiden *trans*-konfiguraatio (El-Seedi et al., 2019; Malcolm, 1991). Tämä tuottaa aglykonille huomattavasti litteämmän rakenteen verrattuna muihin kardenolideihin.



Kuva 2. Kardenolidien *cis*- ja *trans*-konfiguraatiot A- ja B-renkaiden välillä. *Cis*-konfiguraatio taivuttaa rakennetta verrattuna *trans*-konfiguraatioon (Malcolm, 1991).

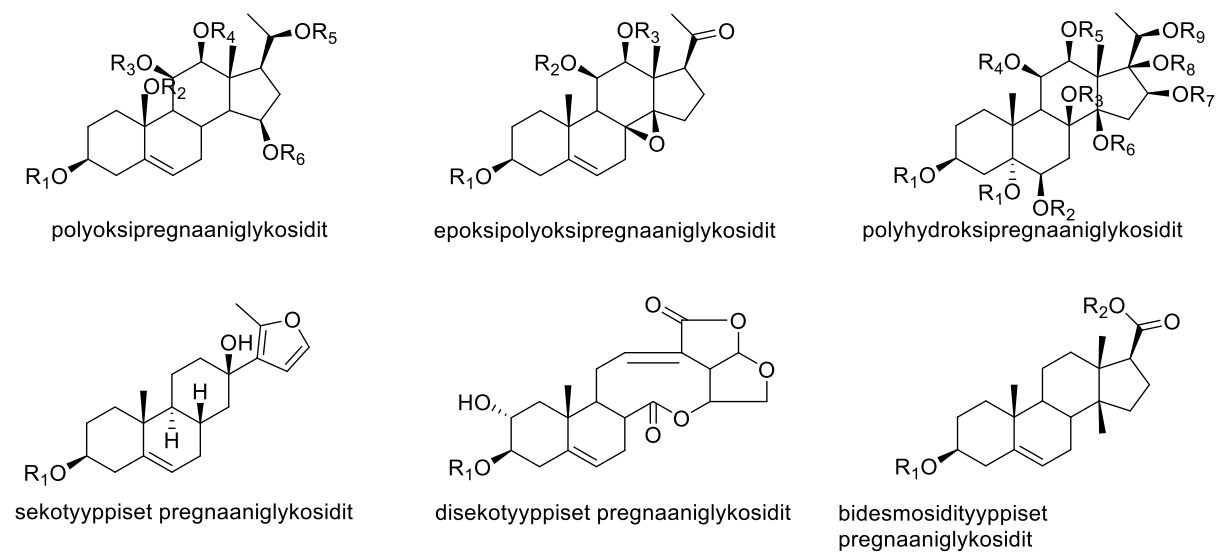
Silkkiyrtit ovat kardenolidiglykosidien kannalta kemiallisesti erittäin monimuotoinen kasviperhe. Kardenolideja voi olla yhdessä kasvissa jopa rakenteeltaan 30 eri yhdistettä (Agrawal et al. 2012). Kardenolidiglykosidien pitoisuudet vaihtelee myös kasvin osan välillä. Niitä on havaittu esiintyvän kaikissa osissa (Rasmann et al., 2009), mutta suurimmat pitoisuudet on havaittu maitiaisnesteestä (Zalucki et al., 2001). Näiden yhdisteiden monimuotoisuuteen vaikuttaa paljon myös kasvin maantieteellinen sijainti (Rasmann and Agrawal 2011). Rasmannin ja Agrawalin fylogeneettinen analyysi 49:stä eri *Asclepias*-lajista osoitti, että trooppisilla leveysasteilla esiintyvät lajit ovat kemiallisesti vahvemmin puolustautuneita kuin lauhkeiden alueiden lajit. Niillä on suurempi ja herkemmin indusoituva kardenolidituotanto, korkeampi yhdisteiden rakenteellinen monimuotoisuus sekä matalampi poolisuus (Rasmann and Agrawal 2011).

2.2 Pregnaaniglykosidit

C21-steroidiglykosidit ovat pregnaanirunkoon perustuvia glykosideja. Pregnaanien perusrunkona on syklopentaaniperhydrofenantreeni (de Souza et al., 2024; Si et al., 2022). Tämä perusrunko koostuu kolmesta kuusijäsenisestä (A-C) ja yhdestä viisijäsenisestä (D) hiilirenkaasta, jotka ovat fuusioituneet toisiinsa (Si et al., 2022). Aglykoniosa on siis samankaltainen kuin kardenolideilla. Tämä rakenne tekee yhdisteistä suhteellisen jäykkiä, eivätkä hiiliatomit pysty kiertymään tai kääntymää vapaasti. Pregnaanien ydinrakenteessa on hydroksyyli-ryhmä kiinnittyneenä C-3-hiileen sekä jokin sivuryhmä C-17-hiileen (Si et al., 2022). Pregnaaneja esiintyy kardenolidien ohella runsaasti monissa *Apocynacea*-heimon kasveissa, kuten silkkiyrteissä (Agrawal et al., 2012). Niitä pidetään todennäköisinä kardenolidien prekursoreina (Agrawal et al., 2012). Kun pregnaaneiden aglykoniosaan kiinnittyy sokeriosia, tyypillisesti C-3-hiilen happiatomiin, kutsutaan yhdisteitä pregnaaniglykosideiksi (de Souza et al., 2024; Si et al., 2022). Sokeriysiköitä on tavallisesti liittynyt yhdestä kuuteen kappaletta, ja ne liittyvät runkoon ketjumaisessa muodossa (Si et al., 2022).

Pregnaaniglykosidit voidaan jakaa erilaisiin alaluokkiin. Si et al. (2022) jakaa yhdisteryhmän kahteen päätyyppiin, monodesmosidi- ja bidesmosidityyppiin, niiden sitoutumistavan ja sokeriketjun lukumäärän perusteella. Monodesmosidityyppiin pregnaaniglykosideihin on kiinnittynyt yksi sokeriketju, usein C-3-asemaan, ja ne jaetaan edelleen neljään eri alaluokkaan erilaisten substituenttityyppien ja renkaan hapettumisasteen mukaan (**Kuva 3**). Näihin alaluokkiin kuuluvat polyoksipregnaaniglykosidit, epoksipolyoksipregnaaniglykosidit, polyhydroksipregnaaniglykosidit ja 17-furaanipregnaaniglykosidit (seko- ja disekotyypit). Bidesmosidityyppisillä pregnaaniglykosideilla on kiinnittynyt kaksi sokeriketjua ligandin C-3- ja C-20-asemissa (Si et al., 2022). Silkkiyrteistä on löydetty erityisesti monodesmosidityyppisiä pregnaaniglykosideja. Näistä yleisimmin esiintyviä alaluokkia ovat polyoksipregnaaniglykosidit, kuten syriakosideiksi nimetyt 12-O-asyloituneet oksipregnaaniglykosidit (Warashina and Noro 2009, 2008), sekä polyhydroksipregnaaniglykosidit

(Araya et al., 2012; Li et al., 2008) ja epoksirakenteiset pregnaaniglykosidit (Warashina et al., 2011; Warashina & Miyase, 2018).



Kuva 3. Pregnaaniglykosidien runkotyyppit (Uudelleen julkaistu lähteestä *Phytochemistry letters*, osa 47, Yuan Si, Xiao-Song Sha, Lei-Ling Shi, Hong-Yan Wei, Yue-Xian Jin, Guo-Xu Ma, Jing Zhang, *Review on Pregnane Glycosides and Their Biological Activities*, s. 1–17, © 2022, Elsevierin luvalla).

3 Steroidiglykosidien bioaktiivisuus

Silkkiyrttien steroidiglykosidit ovat bioaktiivisia luonnonyhdisteitä, joilla on raportoitu monia lääketieteellisesti merkittäviä vaikutuksia (Araya et al., 2012; El-Seedi et al., 2019; Zhang et al., 2014). Ne ovat erityisen kiinnostavia niiden kardioaktiivisuuden sekä syöpäsoluihin kohdistuvien vaikutusten vuoksi. Tässä luvussa tarkastellaan silkkiyrttien steroidiglykosidien keskeisimpiä bioaktiivisuuksia.

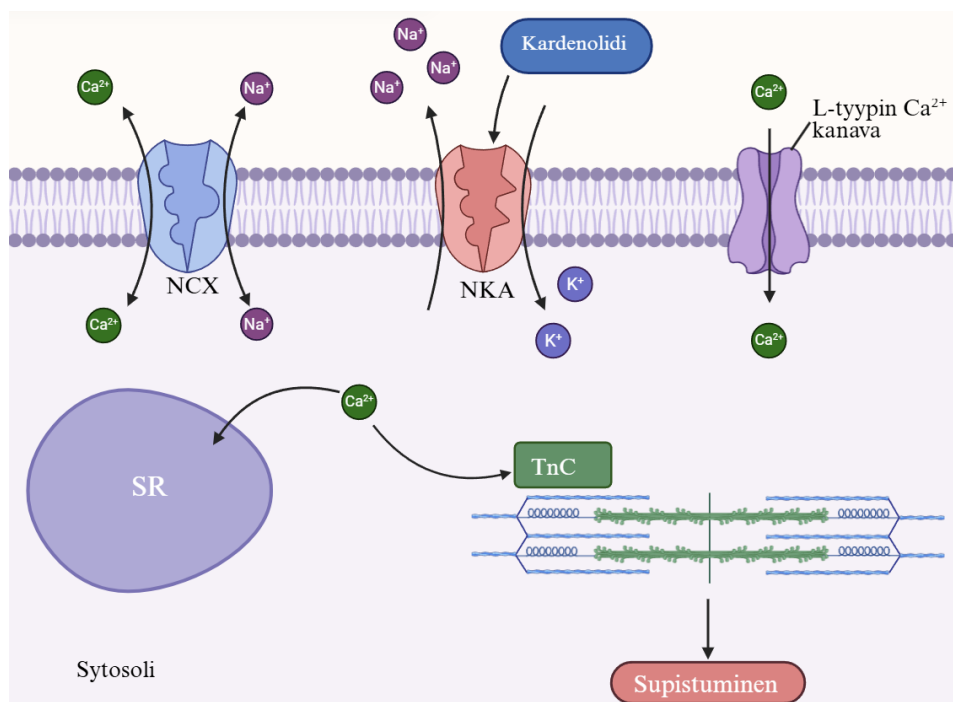
3.1 Kardenolidien kardioaktiivisuus

Na⁺/K⁺-ATPaasi (NKA) on keskeinen solukalvon ionipumppu, jota esiintyy lähes kaikissa selkärangkaisissa soluissa (Ponce et al., 2025). NKA kuljettaa aktiivisesti kolme Na⁺-ionia solusta ulos ja kaksi K⁺-ionia soluun sisään ATP:n hydrolyysistä saatavan energian avulla (Blanco & Mercer, 1998). Ionipumpun tehtävänä on ylläpitää solujen ja koko elimistön natrium- ja kaliumtasapainoa sekä osallistua lukuisiin fysiologisiin prosesseihin. Ionikuljetuksen lisäksi NKA toimii myös solunsisäisenä signaalinvälittäjänä esimerkiksi sydänglykosideille (Xie & Askari, 2002).

Sydänglykosidit, kuten silkkiyrtistä löytyvät kardenolidiglykosidit, vaikuttavat NKA:n toimintaan sitoutumalla NKA:n α -alaysikön solun ulkopuolella sijaitsevaan spesifiseen sitoutumiskohtaan sen toimintasyklin aikana (Ponce et al., 2025). Kardenolidiglykosidin steroidirunko asettuu ionipumpun hydrofobiseen onteloon ja muodostaa vuorovaikutuksia ionipumpun α -alaysikön kalvon läpi kulkevien

rakenteiden sekä solunulkoisten silmukoiden kanssa. Laktonirengas ja sokeriosat stabiloivat sitoutumista muodostamalla vetysidoksia ja muita heikkoja molekyylien välisiä vuorovaikutuksia (Bagrov et al., 2009; Tverskoi et al., 2021). Kardenolidiglykosidien sitoutuminen tapahtuu syklin E2-P-konformaatiotilassa, jossa natriumionit on kuljetettu solun ulkopuolelle ja pumppu on valmis sitomaan kaliumioneja (Jorgensen et al., 2003). Kardenolidiglykosidin sitoutuminen estää NKA:n defosforylaation ja lukitsee pumppun inaktiiviseen tilaan (Kanai et al., 2021).

NKA:n toiminnan estyminen johtaa Na^+ -ionien kertymiseen solun sisällä, eli natriumgradientin heikkenemiseen, mikä vähentää $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -vaihtajaproteiinin (NCX) toimintaa (**Kuva 4**) (Ponce et al., 2025; Tripathi, 2013). Normaalisti NCX poistaa natriumgradientin avulla kalsiumioneja solusta, joten tämän mekanismin heikentyessä myös kalsiumpitoisuus solujen sisällä kasvaa (Tripathi et al., 2013; Zhou et al., 2024). Lisääntynyt Ca^{2+} -ionien määrä sydänlihassoluissa varastoituu osittain sarkoplasmakalvostoon (SR) ja vapautuu sytosoliin suurina määrinä depolarisaation aikana L-tyyppisten Ca^{2+} -kanavien kautta (Ponce et al., 2025; Tripathi et al., 2013). Solunsisäinen kalsiumin lisääntyminen tehostaa troponiini C:n (TnC) kalsiumsitoutumista, mikä mahdollistaa aktiini-myosiinisiltojen tehokkaampaa muodostumista (Zhou et al., 2024). Tämän seurauksena sydänlihassolujen supistusvoima lisääntyy (Ponce et al., 2025), mikä selittää kardenolidien positiivisen inotrooppisen vaikutuksen (Zhou et al., 2024). Supistusvoiman lisääntyminen voi kasvattaa sydämen minuuttilavuutta ja siten lievittää sydämen vajaatoiminnan oireita (Ponce et al., 2025). Lisäksi kardenolidiglykosidit jäljittelevät parasympaattisen hermoston vaikutuksia, mikä hidastaa sydämen sykettä ja eteis-kammiojohtumista (Ponce et al., 2025).

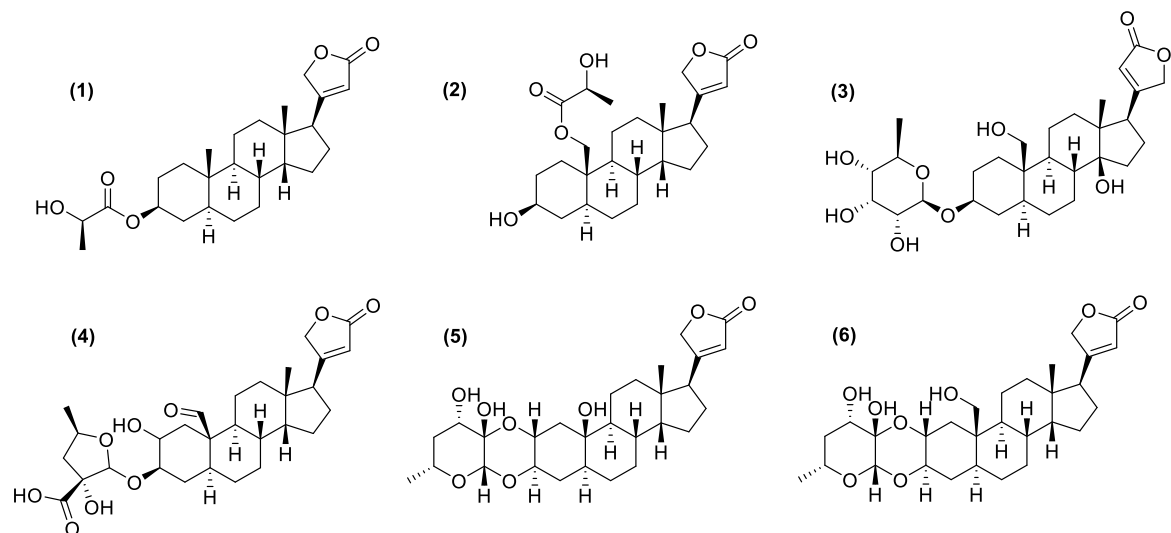


Kuva 4. Kardenolidiglykosidin sitoutuminen Na^+/K^+ -ATPaasiin. SR=sarkoplasmakalvosto, TnC=tronopiini C, NKA= Na^+/K^+ -ATPaasi, NCX= $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -vaihtaja (mukailtu lähteistä Kumavath et al. 2021; Tripathi 2013).

Vaikka kardenolidiglykosidien kyky estää NKA:ta on tunnettu pitkään, niiden terapeuttinen käyttö on haastavaa (Jiao et al., 2026). Nykyisin sydämen vajaatoiminnan ja rytmihäiriöiden hoidossa käytetään ensisijaisesti villasormustinkukasta (*digitalis lanata*) eristettyä digoksiinia (El-Seedi et al., 2019; Lopes et al., 2018). Tämän lisäksi pienissä määrissä lääketieteellisessä käytössä ovat muun muassa digoksigeniini, strofantidiini ja ouabageiini (El-Seedi et al., 2019). Näiden yhdisteiden merkittävin ongelma on niiden erittäin kapea terapeuttinen ikkuna, eli erittäin pieni ero niiden hoidollisen annoksen ja myrkyllisen annoksen välillä (El-Seedi et al., 2019; Jiao et al., 2026). Liian suuret pitoisuudet voivat johtaa vakaviin rytmihäiriöihin, ruoansulatuskavavan oireisiin tai jopa kuolemaan (El-Seedi et al., 2019; Jiao et al., 2026). Tämän takia on välttämätöntä etsiä uusia yhdisteitä, joilla olisi laajempi terapeuttinen ikkuna, ja jotka olisivat siten farmakologisesti parempia ja turvallisempia.

Kardenolidiglykosidien rakenteellinen vaihtelu tekee uusien yhdisteiden etsimisestä myös erityisen lupaavaa, sillä pienetkin rakenteelliset muutokset vaikuttavat yhdisteiden bioaktiivisuuksiin (Ren et al., 2020). Erityisesti C-17-laktonirengas, hydroksyyliyhmiin sijainti sekä C-3-aseman sokeriosan tyyppi ja sitoutuminen vaikuttavat yhdisteen aktiivisuuteen (Ren et al., 2020). Silkkiyrtilt muodostavat tämän takia kiinnostavan kasvisuvun, sillä niistä on raportoitu satoja rakenteellisesti erilaisia kardenolidiglykosideja, joiden pitoisuudet ja aktiivisuudet vaihtelevat huomattavasti (Agrawal et al., 2012; Züst et al., 2019). Silkkiyrtilt kardenolidiglykosidien monet rakenteet myös eroavat monista klassisista sydänglykosideista (Malcolm, 1991).

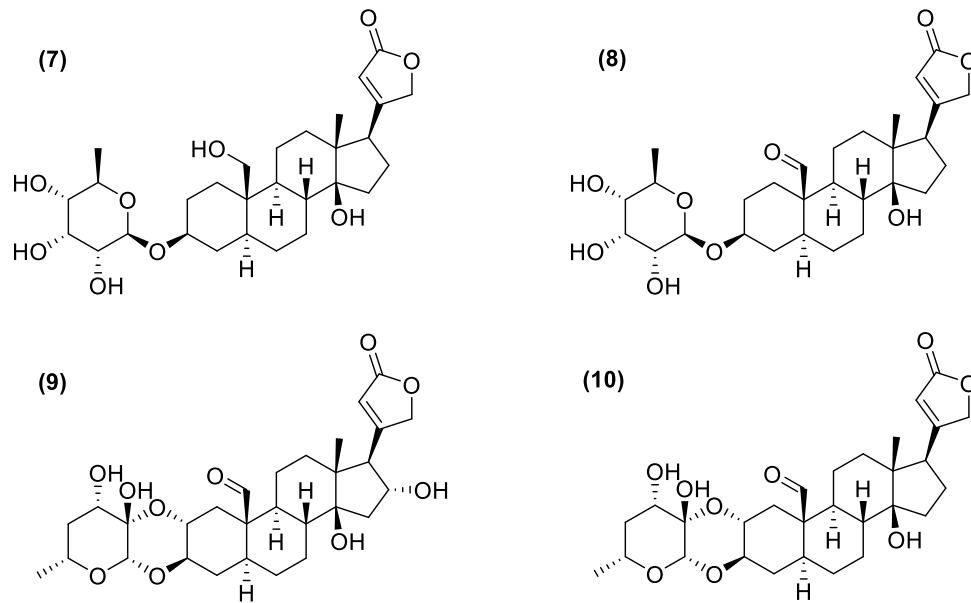
Zhang tutkimusryhmineen (2014) eristi *Asclepias curassavica* -lajista viisi kardenolidilaktaattia sekä viisitoista kardenolidiglykosidia, jotka sisälsivät sekä dioksaanirenkaisia että yhden hydroksyyliyhmiin kautta sitoutuneita sokeriryhmiä. Näitä yhdisteitä testattiin NKA:ta vastaan, mikä antoi hyvän kuvan eri rakenteiden vaikutuksesta aktiivisuuteen. Tutkimustulosten perusteella havaittiin yhdisteen kemiallisen rakenteen vaikutus sen biologiseen aktiivisuuteen erityisesti niillä kardenolidiglykosideilla, joiden sokeriosa oli liittynyt aglykoniin dioksaanisella kaksoissidoksella (Zhang et al., 2014). Nämä yhdisteet osoittautuivat kaikkein potentiaalisimmiksi NKA:n toiminnan estäjiksi, sillä niiden K_i -arvot eli inhibitiivakiot, olivat kaikilla alle 0,05 μM . Näin matalat inhibitiivakiot kertovat yhdisteiden vahvasta sitoutumisesta entsyymin aktiiviseen kohtaan ja siitä, että ne saavuttavat lähes täydellisen inhibition jo hyvin alhaisilla pitoisuuksilla. Kardenolidiglykosideista, jotka eivät sisältäneet dioksaanirengasta, ainoastaan frugosidilla (**3**) oli yhtä hyvä inhibitiivikyky ja kalaktiinihapolla (**4**) suhteellisen hyvä estokyky 0,960 μM (**Kuva 5**). Tämä viittaa siihen, että dioksaanirakenne sokeriosan ja aglykonin välillä vaikuttaa merkittävästi yhdisteen kykyyn estää NKA:ta. Aktiivisuutta ei kuitenkaan voida selittää pelkästään dioksaanirakenteella, sillä myös frugosidin (**3**) estokyky oli yhtä voimakas. Tällöin aktiivisuuteen vaikuttavat todennäköisesti myös muut rakenteelliset piirteet, kuten aglykonin funktionaaliset ryhmät, esimerkiksi frugosidin hydroksimetyyliyhmiin.



Kuva 5. NKA:ta inhiboivien kardenolidiglykosidien rakenteet: 3-*O*-uranigeniinilaktaatti **(1)**, 19-*O*-koroglauxigeniinilaktaatti **(2)**, frugosidi **(3)**, kalaktiinihappo **(4)**, 19β-hydroksikalotropiini **(5)** ja kalotropiini **(6)**.

Vertaillessa kardenolidiglykosideja kardenolidilaktaatteihin, huomataan kuitenkin huomattava ero niiden kyvyssä estää NKA:n toimintaa (Zhang et al., 2014). Kardenolidilaktaattien 3-*O*-uranigeniinilaktaatin **(1)** K_i oli 0,163 μM ja 19-*O*-koroglauxigeniinilaktaatin **(2)** 10,750 μM . Näiden yhdisteiden kyky estää NKA:n toimintaa oli selvästi heikompaa kuin kardenolidiglykosideilla. Tämä korostaa sokeriosien tärkeyttä yhdisteen kyvyssä estää NKA:n toimintaa. Zhangin tutkimusryhmä osoitti myös molekyyylimallinnuksen (molecular docking) avulla, miten kardenolidiglykosidit voivat muodostaa NKA:n sitoutumisontelossa enemmän ja vahvempia vetysidoksia kuin kardenolidilaktaatit (Zhang et al., 2014).

Rubiano-Buitrago tutkimusryhmineen (2022) eristi *Asclepias curassavica*-kasvin siemenistä kymmenen kardenolidiglykosidia, joista neljä oli uusia yhdisteitä. Eristettyjen kardenolidien pitoisuuksia ja biologisia aktiivisuuksia arvioitiin sian NKA:ta vastaan *in vitro*-määrittelyllä (Rubiano-Buitrago et al., 2022). Sytotoksiset vaikutukset ilmaistiin IC_{50} -arvoilla, jotka kuvaavat sitä yhdisteen pitoisuutta, jolla 50 % tutkittavasta biologisesta vaikutuksesta estyy. Tutkimuksessa havaittiin, että NKA:ta estävä vaikutus vaihteli huomattavasti eri kardenolidiglykosidien välillä. Gofrusidilla **(8, Kuva 6)** oli testatuista yhdisteistä voimakkain inhibiitokyky ($\text{IC}_{50}=0,0965$ nM), kun taas heikoin inhibiitokyky havaittiin 16α-hydroksikalotropiinilla **(9)** ($\text{IC}_{50}=3,667$ nM). Tulokset osoittivat, että pelkkä sokeriosien lukumäärä ei yksin selitä yhdisteiden aktiivisuutta, vaan myös muut rakenteelliset erot vaikuttavat aktiivisuuteen (Rubiano-Buitrago et al., 2022).



Kuva 6. NKA:ta inhiboivien kardenolidiglykosidien rakenteet: frugosidi (7), gofrugosidi (8), 16 α -hydroksikalotropiini (9) ja kalotropiini (10).

Tutkimuksessa havaittiin, että aglykoniosan funktionaaliset ryhmät ja hapetusaste vaikuttavat merkittävästi inhibiatioaktiivisuuteen (Rubiano-Buitrago et al., 2022). Esimerkiksi frugosidin (7) ja gofrugosidin (8) rakenteet erosivat toisistaan ainoastaan C-18-hiilen hapetusasteen osalta (Kuva 6). Frugosidilla (7) C-18-hiilessä oli alkoholiryhmä (hydroksimetyyli), kun taas gofrugosidilla (8) samassa asemassa oli aldehydiryhmä (formyyliiryhmä). Yhdisteiden välillä havaittiin selkeitä eroja aktiivisuudessa, vaikka yhdisteiden rakenteellinen ero oli pieni. Aldehydiryhmän sisältänyt gofrugosidi (8) oli aktiivisempi kuin frugosidi (7). Tämä viittaa siihen, että aldehydiryhmän esiintyvyys voi vahvistaa yhdisteen kardioaktiivisuutta. Aldehydiryhmän esiintyminen ei kuitenkaan pelkästään selitä yhdisteen aktiivisuutta, sillä myös 16 α -hydroksikalotropiini (9) sisältää aldehydiryhmän, mutta sen aktiivisuus oli tutkimuksessa heikoin (Rubiano-Buitrago et al., 2022). Kalotropiinille, joka on yhdisteen 16 α -hydroksikalotropiinin (9) deoksiaglykoni, on sian NKA:ta vastaan raportoitu kuitenkin IC₅₀-arvoksi 0,27 μ M (Agrawal et al., 2021). Tämä ero saattaa johtua 16 α -hydroksikalotropiinin (9) 16 α -hydroksylaatiosta, mikä häiritsisi yhdisteen sitoutumista NKA:han (Rubiano-Buitrago et al., 2022).

Tutkimuksessa havaittiin myös, miten kardenolidiglykosidien inhibiitokyky heikkeni glykosylaatioasteen kasvaessa (Rubiano-Buitrago et al., 2022). Yksi mahdollinen selitys estokyvyn heikkenemiseen voisi liittyä molekyylin tilavuuden kasvuun, joka voisi estää pääsyn NKA:n aktiiviseen kohtaan. Tutkimuksessa havaittiin kuitenkin myös se, että kahden sellaisen yhdisteen välillä, jotka erosivat toisistaan toisen sokeriryksikön osalta, ei havaittu merkittävää eroa estokyvyyssä. Tämän takia glykosylaatioasteen vaikutusta NKA:n estoon tulisi tutkia tarkemmin molekyylihallinnuksella (Rubiano-Buitrago et al., 2022).

3.2 Sytotoksisuus ja antiproliferatiivisuus

Kardenolidiglykosideilla ja C21-steroidiglykosideilla on raportoitu sytotoksisia ja antiproliferatiivisia vaikutuksia syöpäsoluja vastaan, minkä takia ne ovat kiinnostavia yhdisteitä syöpätutkimuksessa (Plaza et al., 2005; Reddy et al., 2019; Yang et al., 2019). Tässä alaluvussa tarkastellaan silkkiyrttien steroidiglykosidien vaikutuksia syöpäsoluihin.

3.2.1 Kardenolidiglykosidit

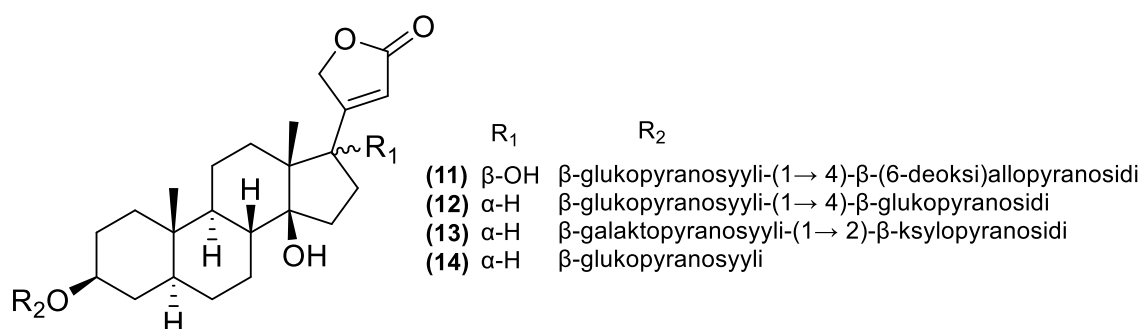
Kardenolidiglykosideilla sytotoksisuuden sekä antiproliferatiivisuuden taustalla olevia vaikutusmekanismeja ei olla vielä täysin selvitetty, mutta niistä on esitetty useita hypoteeseja (Reddy et al., 2019). Ne perustuvat ensisijaisesti yhdisteryhmän kykyyn sitoutua NKA:han, riippumatta yhdisteiden vaikutuksesta natriumin ja kaliumin kuljetukseen (Meneses-Sagrero et al., 2022). Sitoutuminen NKA:han voi aktivoita useita solun sisäisiä signaalintireittejä, jotka liittyvät solujen kasvuun, proliferaatioon tai apoptoosiin (Meneses-Sagrero et al., 2022).

Syövän keskeinen tunnusmerkki on hallitsematon proliferaatio eli liiallinen solujen lisääntyminen sekä kasvua rajoittavien tekijöiden heikentyminen (Hanahan & Weinberg, 2000). Kardenolidiglykosidien uskotaan pystyvän häiritsemään juuri näitä kasvaimen ylläpitämiä prosesseja ja sitä kautta vähentävän syöpäsolujen lisääntymiskykyä (Kumavath et al., 2021). NKA:han sitoutumisen seurauksena kardenolidiglykosidit voivat vaikuttamaan transkriptiotekijöihin, kuten AP-1:een ja NF- κ B:hen sekä estää HIF-1:n toimintaan (Chao et al., 2017; Manna et al., 2000). Tämä on erityisen tärkeää, sillä näiden tekijöiden poikkeava aktiivisuus syöpäsoluissa edistää proliferaatiota, invaasiota, solujen selviytymistä ja metastaasipotentialia (Chao et al., 2017; Manna et al., 2000). Tämän lisäksi NKA:n inhibitio voi aktivoita esimerkiksi Src-tyrosiinikinaasin (SRC), mitogeenin aktivoiman proteiinikinaasin (MAPK) sekä fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi/proteiinikinaasi B/mTOR-signaalireitin (PI3K/AKT/mTOR) (Siti-Syarifah & Nurhanan-Murni, 2018; Xie & Cai, 2003). Näiden signaalintireittien häiriintyminen muuttaa syöpäsolujen kasvua, jakautumista ja muita syöpäsolulle elintärkeitä signaaleja (Siti-Syarifah & Nurhanan-Murni, 2018; Xie & Cai, 2003). Kardenolidien sitoutuminen NKA:han lisää myös reaktiivisten happilajien (ROS) muodostumista, mikä kuormittaa soluja ja edistää vaurioiden syntymistä (Xie & Cai, 2003). Muita hypoteettisia kardenolidiglykosidien sytotoksisuuden vaikutusmekanismeja ovat muun muassa geenien ilmentymisprofiilien muutokset (Johnson et al., 2002), topoisomeraasi II:n esto (Bielawski et al., 2006), solukalvon fluiditeetin muutokset (Haas et al., 2002) sekä p21-tason nousu (Haas et al., 2002). Näiden muutosten kohdistuminen useisiin signaalintireitteihin samanaikaisesti voi johtaa syöpäsolujen solusyklin pysähtymiseen, proliferaation vähenemiseen ja apoptoosin käynnistymiseen (Meneses-Sagrero et al., 2022).

Kardenolidiglykosidien sytotoksinen ja antiproliferatiivinen vaikutus tekee niistä merkittävän tutkimuskohteen syöpätutkimuksissa (Kumavath et al., 2021; Meneses-Sagrero et al., 2022). Vaikka

näiden signalointireittien toimintaa ei täysin tunneta, on kuitenkin havaittu, että niiden käynnistämät vasteet eivät ole syöpäsoluissa samoja kuin normaaleissa soluissa (Prassas & Diamandis, 2008). Tämän vuoksi on esitetty, että NKA:n alayksiköiden ilmentyminen ja toiminta ovat erilaisia kasvainsoluissa verrattuna normaaleihin soluihin (Prassas & Diamandis, 2008). Tästä syystä silkkiyrttien kardenolidiglykosidien sytotoksisuuden ja antiproliferatiivisuuden tutkiminen on tärkeää, sillä niiden rakenteellinen monimuotoisuus auttaa ymmärtämään yhdisteiden rakenne-aktiivisuusteita paremmin ja voi siten edistää myös uusien lääkeainekandidaattien löytämistä (Meneses-Sagrero et al., 2022; Roy et al., 2005).

Juan J. Araya tutkimusryhmineen (2012) eristi *Asclepias syriacan*-kasvista neljä kardenolidiglykosidia 3-*O*- β -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 4)-6-deoksi- β -D-allopyranosyyli-17 β -hydroksiuzarigeniiniin (**11**), 3-*O*- β -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 4)-6-deoksi- β -D-allopyranosyyliuzarigeniiniin (**12**), uzariiniin (**13**) ja desglukouzariiniin (**14**) (Kuva 7). Tutkimuksessa verrattiin näiden yhdisteiden sytotoksisuutta rintasyöpäsolulinjoissa MCF-7, T47D, SK-BR-3 ja Hs578T sekä normaalissa rintasolulinjassa Hs578Bst (Araya et al., 2012). Tuloksia verrattiin klassisiin sydänglykosideihin digoksiiniin, digitoksigeniiniin ja ouabaiiniin (Araya et al., 2012) sekä kemoterapiassa laajasti käytettyyn doxorubisiiniin (Xia & King, 2025).



Kuva 7. Sytotoksisuustutkimuksissa käytettyjen kardenolidiglykosidien 3-*O*- β -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 4)-6-deoksi- β -D-allopyranosyyli-17 β -hydroksiuzarigeniini (**11**), 3-*O*- β -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 4)-6-deoksi- β -D-allopyranosyyliuzarigeniini (**12**), uzariini (**13**) ja desglukouzariini (**14**) rakennekaavat.

Testattujen yhdisteiden sytotoksisuusarvot vaihtelivat välillä 0,59–40 μ M (Taulukko 1) ja 3-*O*- β -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 4)-6-deoksi- β -D-allopyranosyyliuzarigeniini (**12**) osoittautui aktiivisimmaksi kaikissa testatuissa solulinjoissa (Araya et al., 2012). Sen sytotoksisuus oli myös samaa tasoa kuin doxorubisiinilla ja digoksiinilla. Muiden kardenolidiglykosidien heikommat sytotoksisuudet johtuivat mahdollisesti C-17-aseman konfiguraatiosta sekä C-3-asemaan kiinnittyneiden sokerien rakenteesta ja määrästä (Araya et al., 2012).

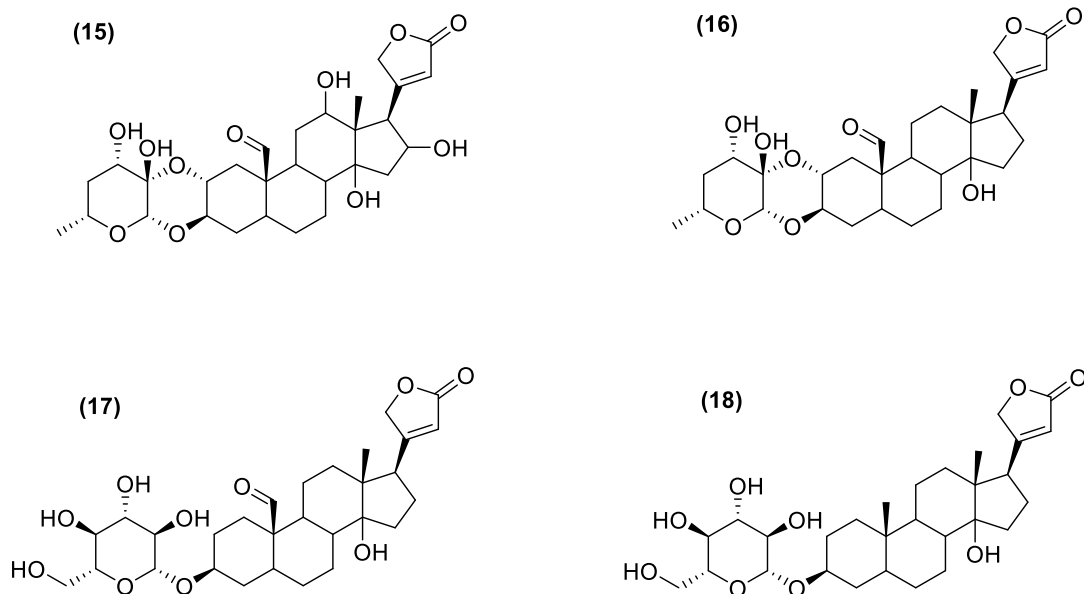
Taulukko 1. Kardenolidiglykosidien (**11-14**) sytotoksisuusarvot (IC_{50} , μM , \pm keskihajonta (KH)) rintasyöpäsolulinjoissa MCF-7, T47D, SKBR-3 ja Hs578T sekä normaalissa rintasyöpäsolulinjassa Hs578Bst (Jäljennetty luvalla julkaisusta *Journal of Natural Products*, 75(3), Juan J. Araya, Kelly Kindscher ja Barbara N. Timmermann, "Cytotoxic Cardiac Glycosides and Other Compounds from *Asclepias syriaca*", © 2012 American Chemical Society).

Yhdiste	IC_{50} ($\mu M \pm KH$)				
	MCF-7	T47D	SK-BR-3	Hs578T	Hs578Bst
11	>40	>40	>40	>40	14,20 \pm 3,30
12	5,30 \pm 1,20	1,76 \pm 0,21	1,76 \pm 0,21	0,59 \pm 0,05	0,04 \pm 0,01
13	11,60 \pm 2,50	9,50 \pm 1,00	9,50 \pm 1,00	4,58 \pm 0,64	0,79 \pm 0,51
14	17,00 \pm 4,90	11,70 \pm 1,30	11,70 \pm 1,30	6,28 \pm 0,27	1,05 \pm 0,11
doksorubisiini	1,54 \pm 0,15	1,90 \pm 1,10	0,21 \pm 0,03	0,55 \pm 0,06	0,18 \pm 0,17
digoksiini	4,70 \pm 3,00	0,66 \pm 0,12	1,08 \pm 0,21	0,25 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02
digitoksigeniini	9,10 \pm 2,60	2,53 \pm 0,34	4,42 \pm 0,51	1,02 \pm 0,06	0,15 \pm 0,12
ouabain	10,60 \pm 0,50	0,39 \pm 0,03	0,40 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01

Selvin aktiivisuuksiin vaikuttava rakenteellinen ero havaittiin 3-O- β -D-glukopyranosyyli-(1 \rightarrow 4)-6-deoksi- β -D-allopyranosyyli-17 β -hydroksiuzarigeniinin (**11**) ja muiden kardenolidiglykosidien välillä (Araya et al., 2012). Sen C-17-asemassa on β -konfiguraatiossa oleva hydroksyyli-ryhmä verrattuna muiden yhdisteiden α -konfiguraatiossa olevaan vetyyn (Araya et al., 2012). Tämä ero substituentissa voi selittää yhdisteen heikompaa sytotoksisuutta, sillä hydroksyyli-ryhmä voi lisätä molekyylin polaarisuutta ja vesiliukoisuutta sekä heikentää solukalvon läpäisyä (Malcolm, 1991).

Koska aktiivisimmalla kardenolidiglykosidilla (**12**) C-17-konfiguraatio oli sama kuin uzariinilla (**13**) ja desglukouzariinilla (**14**) (**kuva 7**), aktiivisuuserot eivät todennäköisesti johdu tästä rakenteellisesta tekijästä vaan C-3-asemaan kiinnittyneistä sokeriosista ja niiden rakenteista (Araya et al., 2012). Aktiivisimmassa yhdisteessä (**12**) ja desglukouzariinissa (**14**) aglykoniosaan on kiinnittynyt glukopyranosyyliyksikkö (Araya et al., 2012). Näiden yhdisteiden välinen aktiivisuusero voi liittyä sokeri-ryksiköiden määrään, sillä aktiivisin yhdiste sisältää disakkaridin. Pelkästään tämä sokeri-ryksiköiden lukumäärä ei kuitenkaan yksin selitä aktiivisuutta, sillä myös uzariini (**13**) sisältää disakkaridin. Tämä viittaa siihen, että sokeriosien läsnäolo, rakenne ja lukumäärä vaikuttavat kaikki yhdessä yhdisteen bioaktiivisuuteen.

Kardenolidiglykosidien antiproliferatiivista aktiivisuutta on tutkinut muun muassa Rascón-Valenzuela tutkimusryhmineen (2015). Tutkimuksessa *Asclepias subulata* -kasvista eristettiin kardenolidiglykosidit 12,16-dihydroksikalotropiini (**15**), kalotropiini (**16**), korotoksigeniini-3-O-glukopyranosidi (**17**) ja desglukouzariini (**18**). Näiden yhdisteiden antiproliferatiivista vaikutusta testattiin ihmisen syöpälinjoissa PC-3, A549 ja LS 180 sekä normaalissa ihmissolulinjassa ARPE-19. Aktiivisuutta verrattiin positiiviseen kontrolliin doksorubisiiniin, ja vaikutukset ilmaistiin IC_{50} -arvojen perusteella (Taulukko 2) (Rascón-Valenzuela et al., 2015).



Kuva 8. Antiproliferatiivisuustutkimuksissa käytettyjen kardenolidien 12,16-dihydroxycalotropin (**15**), kalotropiini (**16**), korotoksigeniini-3-*O*-glukopyranosidi (**17**) ja desclukouzariini (**18**) rakennekaavat.

Taulukko 2. Kardenolidiglykosidien (**15-18**) antiproliferatiivinen vaikutus (IC_{50} , μM , \pm keskihajonta (KH)) ihmisyyöpäsolinjoissa PC-3, A549 ja LS 180 sekä normaalissa ihmissolinjassa ARPE-19. (Mukailtu julkaisusta *Journal of Ethnopharmacology*, osa 171, L. Rascón-Valenzuela, C. Velázquez, A. Garibay-Escobar, L. A. Medina-Juárez, W. Vilegas, R. E. Robles-Zepeda, *Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata**, s. 280–286, © 2015, Elsevierin luvalla).

Yhdiste	IC_{50} ($\mu M \pm KH$)			
	PC-3	A549	LS 180	ARPE-19
15	11,7 \pm 2,48	2,48 \pm 1,13	5,62 \pm 2,12	>300,00
16	0,41 \pm 0,11	0,013 \pm 0,002	0,06 \pm 0,04	149,30 \pm 2,07
17	6,62 \pm 0,42	2,64 \pm 0,30	3,15 \pm 0,44	>300,00
18	9,68 \pm 0,58	0,90 \pm 0,02	6,57 \pm 1,34	>300,00
doksorubisiini	3,18 \pm 0,31	1,78 \pm 0,12	6,99 \pm 0,21	1,02 \pm 0,12

Kardenolidiglykosideista kalotropiini (**16**) osoittautui selvästi aktiivisimmaksi yhdisteeksi kaikissa tutkituissa syöpäsolinjoissa (Rascón-Valenzuela et al., 2015). Sen IC_{50} -arvo ($0,013 \pm 0,002 \mu M$) A549-soluissa oli yli satakertaisesti pienempi kuin doksorubisiiniin ($1,78 \pm 0,12 \mu M$). Tämä osoittaa kalotropiinin (**16**) huomattavan voimakasta antiproliferatiivista aktiivisuutta syöpäsoluja kohden. Myös desglukouzariini (**18**) oli A549-soluissa doksorubisiinia tehokkaampi. Solulinjassa LS180 kaikkien tutkittujen yhdisteiden IC_{50} -arvot olivat doksorubisiinia pienempiä (Rascón-Valenzuela et al., 2015).

Tutkimuksessa ei suoritettu laajaa rakenne-aktiivisuusanalyysia, mutta tulosten perusteella kardenolidien antiproliferatiiviseen aktiivisuuteen voisivat vaikuttaa aglykoniosan hydroksyyliyhmi-

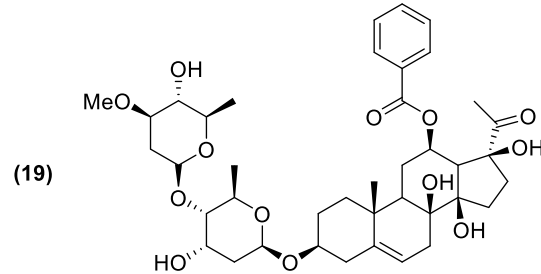
(OH-) määrä sekä sokeriosan sitoutuminen aglykoniosaan. Tutkijoiden mukaan 12,16-dihydroksykalotropiin (15) heikompi aktiivisuus verrattuna kalotropiiniin (16) saattaa johtua C-12- ja C-16-asemien hydroksyyli ryhmistä, jotka vähentäisivät aktiivisuutta (Rascón-Valenzuela et al., 2015). Korotoksigeniini-3-O-glukopyranosidin (17) ja desglukouzariinin (18) rakenteet eroavat toisistaan ainoastaan yhden aglykonin funktionaalisen ryhmän osalta. Korotoksigeniini-3-O-glukopyranosidilla (17) C-19-asemassa on aldehydiryhmä, joka desglukouzariinilta (18) puuttuu. Yhdisteiden aktiivisuuksissa havaittiin eroja, mutta ainoastaan A549-solulinjassa aldehydiryhmän sisältämä korotoksigeniini-3-O-glukopyranosidi (17) osoitti heikompaa aktiivisuutta. Tämä viittaa siihen, että bioaktiivisuuksiin vaikuttavat myös muut kuin rakenteelliset tekijät. Tämän takia tutkimuksessa määritettiin myös solulinjojen kasvukäyrät sekä solumäärien kahdentumisajat. Näiden tulosten perusteella proliferaationopeus ei yksin selittänyt yhdisteiden selektiivisyyttä, mikä viittaa, että aktiivisuuteen liittyy myös syöpäsolujen muita biologisia ominaisuuksia (Rascón-Valenzuela et al., 2015).

3.2.2 Pregnaaniglykosidit

C21-steoidiglykosideista erityisesti prenaaniglykosideilla on raportoitu olevan sytotoksisia sekä antiproliferatiivisia vaikutuksia syöpäsoluja vastaan (Plaza et al., 2005; Yang et al., 2019). Niiden vaikutuksen on havaittu liittyvän useimmiten apoptoosin käynnistymiseen, solusyklin pysäyttämiseen sekä syöpäsolujen kasvua ylläpitävien signaalintireittien häiriintymiseen (Yang et al., 2019). Useissa tutkimuksissa prenaaniglykosidien on osoitettu aktivoivan kaspasivälitteistä apoptoosia, lisäävän DNA:n fragmentoitumista ja heikentävän solujen elinkykyä (Yang et al., 2019). Tämä lisäksi joidenkin prenaaniglykosidien vaikutus on liitetty myös mitokondrion toiminnan häiriintymiseen, ROS:sien kertymiseen sekä solunulkoisten signaalien säätelyn kinaasin (ERK) ja MAPK-signalointireittien vaimenemiseen (Yang et al., 2019). Vaikka prenaaniglykosidien yhdisteluokka on yleisesti biologisesti aktiivinen, yksittäisten prenaaniglykosidien aktiivisuudet vaihtelevat huomattavasti niiden rakenteellisten erojen takia.

Toisin kuin useissa muissa suvuissa esiintyvillä prenaaniglykosideilla, silkkiyrttien yhdisteillä on raportoitu vain vähän sytotoksista aktiivisuutta. Li et al (2008) eristivät *Asclepias curassavica*-lajin maanpäällisistä osista kahdeksan C21-steroidiglykosidia, curassavosidit A-F. Näiden yhdisteiden sytotoksisuutta arvioitiin Raji- ja AGZY-syöpäsolulinjoilla. Tutkituista yhdisteistä ainoastaan curassavosidi A (19, Kuva 9) osoitti heikkoa aktiivisuutta solulinjoja vastaan, IC₅₀-arvoilla 15,46 ja 26,83 µg/ml. Muut yhdisteet olivat täysin inaktiivisia valituissa solulinjoissa, ja niiden IC₅₀ arvot olivat yli 100 µg/ml (Li et al., 2008). Samankaltaisia tuloksia raportoivat Araya et al (2012) tutkiessaan *Asclepias verticillata*-kasvista eristettyjä prenaaniglykosideja verticillosideja A-M. Näiden yhdisteiden sytotoksisuutta arvioitiin rintasyöpäsolulinjalla Hs578T ja normaalilla rintasolulinjalla Hs578Bst, mutta

merkittävää sytotoksista aktiivisuutta ei havaittu (Araya et al., 2012). Näiden kahden tutkimuksen perusteella silkkiyrttien pregnaaniglykosidien sytotoksinen aktiivisuus on ollut erittäin vähäistä tai sitä ei havaittu ollenkaan.



Kuva 9. Curassavosidi A:n (19) rakennekaava.

Useissa silkkiyrttien C21-steroidiglykosidien tutkimuksissa painopiste on ollut juuri yhdisteiden eristämässä ja rakenteiden määrittämisessä, eikä niiden bioaktiivisuuksien tutkimisessa (Abe & Yamauchi, 2000; Araya et al., 2016; Warashina & Miyase, 2018; Warashina & Noro, 2009). Esimerkiksi Warashina ja Noro (2009) raportoivat *Asclepias syriaca* -lajista 20 uutta 12-*O*-asyloitua oksypregnaaniglykosidia, mutta tutkimuksessa keskityttiin ainoastaan yhdisteiden karakterisointiin. Vastaavasti Abe ja Yamauchi (2000) karakterisoivat *Asclepias tuberosa* -lajista 16 erilaista pregnaaniglykosidia. Silkkiyrttien pregnaaniglykosidien vähäinen sytotoksisuus voi siis johtua osittain niiden todellisesta heikosta bioaktiivisuudesta, mutta osittain myös siitä, että eristettyjen yhdisteiden aktiivisuuksia ei ole tutkittu riittävästi.

3.3 Muut havaitut bioaktiivisuudet

Silkkiyrtteillä on havaittu antibakteerista (Neto et al., 2002), antifungaalista (Duraipandiyani & Ignacimuthu, 2011; Navarro García et al., 2003) sekä antiparasiittista aktiivisuutta (Maciel et al., 2019). Näitä vaikutuksia on tutkimuksissa tarkasteltu pääasiassa kasviuutteiden avulla, jonka takia aktiivisuuksia ei voida suoraan yhdistää yksittäisiin yhdisteisiin tai yhdisteryhmiin. *Apocynaceae*-heimon muissa suvuissa tehdyissä tutkimuksissa näitä aktiivisuuksia on kuitenkin yhdistetty muun muassa kardenolidiglykosideihin sekä pregnaaniglykosideihin (Abdel-Sattar et al., 2008; Song et al., 2014; D. Zhao et al., 2016).

Asclepias curassavica -lajilla on havaittu antibakteerista aktiivisuutta *Escherichia coli* - ja *Clostridium histolyticum* -bakteereja vastaan (Neto et al., 2002) sekä antifungaalista aktiivisuutta *Trichophyton rubrum* -sientä vastaan (MIC-arvo 2,0 mg/ml) (Navarro García et al., 2003). *A. curassavica* n etyyliasetaatit osoitti myös antifungaalista aktiivisuutta *T. mentagrophytes*, *T. simii*, *T. rubrum* 57, *C. lunata*, *E. floccosum* ja *Scopulariopsis* -sieniä vastaan (Duraipandiyani & Ignacimuthu,

2011). Lisäksi *A. curassaciva* -kasvin uute osoitti erittäin korkeaa tehoa loisia vastaan, sillä se aiheutti *Eimeria* -ookystien täydellisen (100 %) kuolleisuuden jo 24 tunnin altistuksen jälkeen (Maciel et al., 2019). Vaikutuksen oletetaan johtuvan uutteen sisältämistä erikoistuneista metaboliiteista, etenkin kardenolidiglykosideista, vaikka tarkkaa vaikutusmekanismia ei olla vielä tutkittu (Maciel et al., 2019). Myös muilla silkkiyrttilajeilla on havaittu antimikrobiaalista aktiivisuutta. *Asclepias subulata* -kasvin etanoliuutteella ei havaittu antimikrobista vaikutusta *Bacillus subtilis* -, *Staphylococcus aureus* -, *Escherichia coli* - tai *Candida albicans* -bakteereihin, mutta kasvin etanoliuute kuitenkin esti 45 %:lla *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin kasvua pitoisuudella 100 µg/ml (Murillo-Alvarez et al., 2001).

Näiden aktiivisuuksien lisäksi silkkiyrttien C21-steroidiglykosideilla on havaittu myös monilääkeresistenssiin liittyvää aktiivisuutta (Yuan et al., 2016). *Asclepias curassavica*-kasvista eristetty asclepiasteroli ei ole itsessään merkittävästi sytotoksinen syöpäsoluille, mutta se pystyy lisäämään esimerkiksi paklitakselin ja doksorubisiinin kertymistä soluihin ja voimistamaan niiden vaikutusta monilääkeresistenteissä (MDR) soluissa. Asclepiasterolin bioaktiivisuus on ajateltu liittyvän sen kykyyn vähentää P-glykoproteiinin (P-gp) ilmentymistä, estämällä MAPK/ERK-viestintäreitien aktivaatiota (Yuan et al., 2016).

4 Valmistus

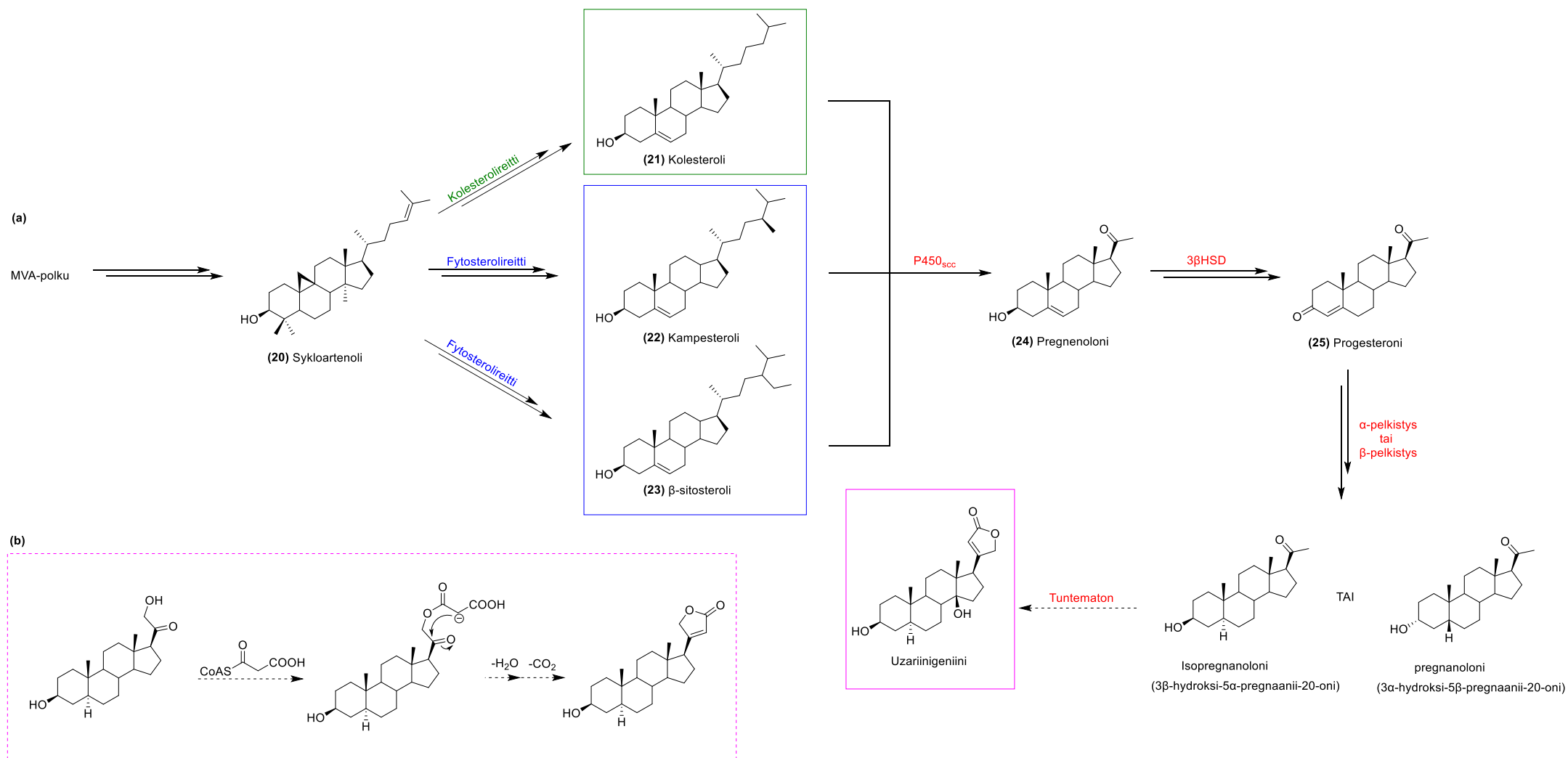
Kardenolidiglykosidit ja C21-steroidiglykosidit muodostuvat rakenteellisesti samankaltaisista pregnaanirunkoisista steroideista. Tämän vuoksi niiden varhaiset biosynteesivaiheet ovat yhteisiä ennen reittien eriytymistä kohti omia lopputuotteita. Seuraavissa alaluvuissa käsitellään näiden yhdisteiden biosynteesivaiheita ja yhdisteiden semisynteettisiä lähestymistapoja.

4.1 Biosynteesi

Kardenolidiglykosidien ja C21-steroidiglykosidien biosynteettireittien tutkimus on tärkeä ja lupaava tutkimusalue, sillä reittien selvittäminen auttaa ymmärtämään luonnollisen synteessin taustalla olevia molekyylimekanismeja, joita pystytään hyödyntämään yhdisteiden tuotannossa (Jiao et al., 2026). Näiden yhdisteryhmien steroidiytimen biosynteesi (**a**, **Kuva 10**) alkaa hiilen lähteistä sytoplasmaattisen mevalonaatti (MVA) -reitien (Jiao et al., 2026) kautta sykloartenolin (**20**) muodostumisella (Dewick, 2002; H. Zhao et al., 2017). Tämä toimii fytosterolireitin, jonka kautta muodostuu kampesterolia (**22**) ja β -sitosterolia (**23**), sekä kolesterolireitin (**21**) yhteisenä esiasteena (Lindemann & Luckner, 1997). Näiden kolmen sterolin muuntuminen pregnenoloksi (**24**) tapahtuu sytokromi P450-sivuketjua pilkkovan entsyymin (P450sc) katalysoimana (Lindemann & Luckner, 1997). Tämän jälkeen pregnenoloni muuntuu edelleen isoprogesteronin kautta progesteroniksi (**25**), 3β -hydroksisteroididehydrogenaasin (3β HSD) sekä isomerisaation välityksellä (de Souza et al., 2024; Dewick, 2002; Munkert et al., 2014). Muodostunut progesteroni pelkistetään joko 5β -pelkistyksellä tai

5 α -pelkistyksellä. 5 β -pelkistys johtaa *cis*-fuusioituneiden A/B-rengasliitoksen muodostumiseen, kun taas 5 α -pelkistys johtaa *trans*-fuusioituneen A/B-rengasliitoksen muodostumiseen (Dewick, 2002; Munkert et al., 2014), mikä on silkkiyrttien suvun yhdisteissä erittäin yleistä (Malcolm, 1991).

Tämän jälkeen pregnaaniglykosidien muodostuminen jatkuu tyypillisesti useisiin hydroksylaatioihin, glykosylaatioon ja mahdollisten sivuketjujen liittämiseen (de Souza et al., 2024), kun taas kardenolidiglykosidien biosynteesi edellyttää C-17-laktonirenkaan muodostumista (Jiao et al., 2026). Kardenolidiglykosidien myöhempiä biosynteesivaiheita ei kuitenkaan tunneta täysin (Jiao et al., 2026). Erityisesti 14 β -hydroksylaatiota ja C-17-aseman laktonirenkaan muodostumista katalysoivia entsyymejä ei ole vielä tunnistettu (Jiao et al., 2026). Laktonirenkaan muodostuminen tapahtuisi kuitenkin Dewickin (2002, s. 243) mukaan todennäköisesti malonaattiesterin aldolilisäysreaktion avulla **(b, Kuva 10Kuva 10)**.



Kuva 10. (a) Kardenolidin ja C21-steroidin aglykoniosan biosynteesireitti (Dewick, 2002; Jiao et al., 2026; Lindemann & Luckner, 1997; Munkert et al., 2014; H. Zhao et al., 2017) ja **(b)** hypoteettinen laktonirenkaan muodostumisreitti (Dewick, 2002). Katkoviivat kuvaavat biosynteesireitin vielä tuntemattomia tai vahvistamattomia vaiheita. Tuplanoilet osoittavat, että välissä tapahtuu useita peräkkäisiä reaktiovaiheita, joita ei ole esitetty kuvassa. 3 β HSD=3 β -hydroksisteroididehydrogenaasiin, P450_{scc}=P450-sivuketjun lohkaisijaentsyymi. Sykloartenoli (20), kolesterololi (21), kampesteroli (22), β -sitosteroli (23), pregnenoloni (24) ja progesteroni (25).

Silkkiyrttien suvun kannalta erittäin kiinnostava biosynteesireitin vaihe on steroidirungon glykosylaatio. Biosynteesissä glykosyylitransferaasit (GT:t) toimivat biokatalyytteinä, joilla on joustavuutta sekä substraattien että sokeriluovuttajien suhteen (Gantt et al., 2011). Jotkin GT:t pystyvät glykosyloimaan kardenolidiglykosien esiasteita *in vitro* (Wen et al., 2018), mikä viittaa siihen, että glykosylaatio ei ole pelkästään biosynteesin viimeinen vaihe (Jiao et al., 2026). Wen et al. (2018) raportoivat ensimmäistä kertaa, että *Asclepia curassavica* tunnistettu UDP-glukosyylitransferaasi UGT74AN1 katalysoi 3-*O*- β -glykosidien muodostumista kardenolidiglykosien biosynteesireitin useista välituotteista. UGT74AN1 on ensimmäinen GT, jonka on osoitettu katalysoivan sydänglykosidien 3 α -hydroksyglykosylaatiota (Wen et al., 2018). Tämä GT käyttää aktivoitua UDP-glukoosia (UDP-Glc) ensisijaisena sokeriluovuttajana ja hyödyntää UDP-N-asetyyliglukosamiinia (UDP-GlcNAc) vain vähäisesti. Tämä silkkiyrttien suvusta erityisen kiinnostava mallin kardneolidiglykosien glykosylaation tutkimuksessa (Wen et al., 2018).

4.2 Semisynteesi

Sydänglykosideille on raportoitu useiden aglykonien ja yksittäisten glykosidien kokonaissynteesiä (Renata et al., 2012, 2015). Silti niiden kokonaissynteettinen ja semisynteettinen valmistus on edelleen haastavaa (Jiao et al., 2026). Suurimmat haasteet liittyvät rakenteiden monimuotoisuuden vaihteluihin, sillä C-3-, C-5- ja C-17-asemien stereokonfiguraatioiden vaihtelut, hydroksyyliyhmiä määrät, kaksoissidosten sekä erilaisten sivuryhmien esiintyminen vaikuttavat huomattavasti yhdisteen biologiseen tehoon (El-Seedi et al., 2019). Kasveista saadut uutteen eivät pysty vastaamaan markkinoiden kysyntään, koska yhdisteiden biosynteesireittejä tunnetaan rajallisesti, jolloin yhdisteiden rakenteellinen muokkaaminen on rajallista ja haastavaa (Jiao et al., 2026). Tämän takia kemiallinen synteesi on vielä päätapa valmistaa sydänglykosideja (Jiao et al., 2026).

Semisynteesissä pystytään käyttämään lähtöaineina kaupallisia tai helposti valmistettavia steroideja, joita muokataan rakenteellisesti (Jiao et al., 2026). Erityisen haastavaa on C-14-aseman hydroksyyliyhmiä muodostaminen, jonka takia se tehdään epäsuorasti kaksoissidoksen sekä hydraation avulla. Myös sydänglykosidien laktonirenkaan rakentaminen on haastavaa ja vaatii monivaiheisia kytkentäreaktioita, kuten Stille- tai Suzuki-kytkentöjä. Tämän lisäksi myös steroidirungon glykosylaatio on haastavaa, sillä steroidirungon eri hydroksyyliyhmiä reaktiivisuus vaihtelee huomattavasti sekä α - ja β -selektiivisyyteen vaikuttavat voimakkaasti käytetyt katalyytit ja reaktio-olosuhteet (Jiao et al., 2026).

Semisynteesin ongelmiin on löydetty apuja yhdisteiden biosynteesireittien avulla (Jiao et al., 2026). Viime vuosina esimerkiksi kemoentsyymaattiset lähestymistavat ovat tarjonneet ratkaisuja erityisesti C-14-hydroksylaation muodostamiseen P450-entsyymien avulla (Zhang et al., 2020). Myös GT:teiden käyttö biokatalyytteinä poistaisi synteesissä esiintyvän heikon regioselektiivisyyden ja

stereoselektiivisyyden sekä funktionaalisten ryhmien suojaamiseen ja näiden suojauksien poistamiseen liittyvät haasteet (Jiao et al., 2026). Yhdistämällä biokatalyyysin ja kemiallisen synteessin strategiat voidaan kehittää edullisempia ja ympäristöystävällisempiä menetelmiä luonnontuotteiden tuottamiseen. Näin voidaan valmistaa yhdisteitä, joiden synteesi on ollut aiemmin vaikeaa tai mahdotonta pelkästään kemiallisilla menetelmillä (Jiao et al., 2026).

5 Johtopäätökset ja tulevaisuuden näkymät

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, millaisia steroidiglykosideja silkkiyrttien suvussa esiintyy, millaisia rakenteellisia piirteitä niillä on sekä arvioida niiden bioaktiivisuuksia ja lääketieteellistä potentiaalia. Kirjallisuuden perusteella silkkiyrtilt tuottavat kahta keskeistä steroidiglykosidiluokkaa: kardenolidiglykosideja ja C21-steroidiglykosideja. Näiden yhdisteiden rakenteellinen monimuotoisuus on huomattava, ja erityisesti kardenolidiglykosidien rakenteissa esiintyvät vaihtelut, kuten sokeriesien määrä ja kiinnittymistapa, aglykonin hapetusaste sekä C17-konfiguraatio, vaikuttavat selvästi yhdisteiden biologisiin ominaisuuksiin.

Bioaktiivisuuksien kannalta silkkiyrttien kardenolidiglykosidit osoittautuivat selvästi aktiivisimmaksi yhdisteryhmäksi, ja niiden vaikutukset perustuvat ensisijaisesti Na^+/K^+ -ATPaasin estoon, mikä selittää niiden kardioaktiivisuuden. Kardenolidiglykosidit osoittivat lisäksi voimakasta sytotoksisuutta ja antiproliferatiivisuutta useissa syöpäsolulinjoissa, mikä liittyy yhdisteiden kykyyn vaikuttaa solunsisäisiin signaalintireitteihin. Tämä tukee niiden lääketieteellistä potentiaalia erityisesti syöpätutkimuksissa. C21-steroidiglykosidien aktiivisuus oli kokonaisuutena heikompaa, mutta yksittäiset yhdisteet, kuten asclepiasteroli, osoittivat kiinnostavia vaikutuksia monilääkeresistenssiin, mitä voisi hyödyntää yhdistelmähoidoissa. Silkkiyrteistä eristetyt C21-steroidiglykosidit osoittivat vain vähäistä sytotoksisuutta tai antiproliferatiivisuutta tai eivät lainkaan havaittavaa aktiivisuutta syöpäsoluja vastaan. Tämä poikkeaa joidenkin muiden *Apocynaceae*-heimon sukujen C21-steroidiglykosideista, joille on raportoitu selkeää sytotoksisuutta tai antiproliferatiivista aktiivisuutta.

Vaikka silkkiyrttien steroidiglykosidien rakenteet ja perusominaisuudet tunnetaan melko hyvin (Agrawal et al., 2012; Warashina & Noro, 2000), niiden biosynteesireitit ovat edelleen puutteellisesti selvitettyjä. Erityisesti prenaanien ja kardenolidien välinen biosynteettinen yhteys, oksidatiiviset muuntumisvaiheet sekä biosynteesiä ohjaavat entsyymit ovat huonosti tunnettuja (Züst et al., 2019). Myös prenaaniglykosidien epoksi-, seko- ja disekorakenteiden muodostumismekanismit kaipaavat lisäselvitystä (Warashina et al., 2011; Warashina & Miyase, 2018). Tulevaisuuden tutkimuksissa on keskeistä yhdistää rakenteellinen analytiikka, metabolomiikka ja isotooppileimatut prekursorit biosynteesireittien tarkentamiseksi. Lisäksi tarvitaan systemaattista rakenne-aktiivisuussuhteiden tutkimuksia, farmakokineettisiä selvityksiä ja toksikologisia arvioita, jotta yhdisteiden todellinen terapeuttinen potentiaali voidaan arvioida. Silkkiyrttien kardenolidiglykosidien voimakas aktiivisuus ja rakenteellinen monimuotoisuus tekevät niistä erityisen lupaavia jatkotutkimuksen kohteita, mutta niiden

kapea terapeutinen ikkuna ja toksisuus hankaloittavat yhdisteiden käyttöä lääketieteessä. Pregnaaniglykosidien osata tulevaisuuden tutkimuksissa voitaisiin keskittyä erityisesti yhdistelmähoitoihin. Kokonaisuutena silkkiyrttien steroidiglykosidit muodostavat lupaavan, mutta vielä osittain kartoittamattoman luonnonyhdisteiden ryhmän, jonka tutkiminen voisi tarjota uusia mahdollisuuksia sekä kasvin puolustusmetabolian ymmärtämiseen että lääkeainetutkimuksen edistämiseen.

Tulevaisuudessa myös tekoälyllä ja koneoppimisella voi olla merkittävä rooli steroidiglykosidien tutkimuksessa. Laajoista kemiallisista aineistoista voidaan tekoälyn avulla tunnistaa uusia potentiaalisia bioaktiivisia rakenteita, mikä nopeuttaa lupaavien yhdisteiden seulontaa huomattavasti. Koneoppimismallit voivat lisäksi paljastaa, mitkä rakenteelliset piirteet vaikuttavat voimakkaimmin yhdisteiden aktiivisuuteen, ja näin tukea rakenne-aktiivisuussuhteiden tarkempaa mallintamista. Myös molekyylihallinnusmenetelmät voivat tehostua tekoälyn avulla, mikä mahdollistaisi entistä tarkemman ennusteen yhdisteiden sitoutumisesta NKA:han tai muihin kohdeproteiineihin. Lisäksi tekoälyä voidaan hyödyntää lääkeaineoptimoinnissa, jossa pyritään parantamaan yhdisteiden selektiivisyyttä, vähentämään toksisuutta ja laajentamaan terapeutista ikkunaa. Näiden menetelmien kehittyessä tekoäly voi tarjota tehokkaita työkaluja uusien steroidiglykosidijohdannaisten suunnitteluun ja niiden biologisen potentiaalin arviointiin.

6 Lähteet

- Abdel-Sattar, E., Harraz, F. M., Al-ansari, S. M. A., El-Mekawy, S., Ichino, C., Kiyohara, H., Ishiyama, A., Ootoguro, K., Omura, S., & Yamada, H. (2008). Acylated pregnane glycosides from *Caralluma tuberculata* and their antiparasitic activity. *Phytochemistry*, 69(11), 2180–2186. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.017>
- Abe, F., & Yamauchi, T. (2000). Pregnane glycosides from the roots of *Asclepias tuberosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(7), 1017–1022. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.1017>
- Agrawal, A. A., Böröczky, K., Haribal, M., Hastings, A. P., White, R. A., Jiang, R.-W., & Duplais, C. (2021). Cardenolides, toxicity, and the costs of sequestration in the coevolutionary interaction between monarchs and milkweeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(16), e2024463118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024463118>
- Agrawal, A. A., Petschenka, G., Bingham, R. A., Weber, M. G., & Rasmann, S. (2012). Toxic cardenolides: Chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions. *New Phytologist*, 194(1), 28–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04049.x>
- Alamgir, A. N. M. (2018). Secondary metabolites: Secondary metabolic products consisting of C and H; C, H, and O; N, S, and P elements; and O/N heterocycles. In A. N. M. Alamgir (Ed.), *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds* (pp. 165–309). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_3
- Araya, J. J., Binns, F., Kindscher, K., & Timmermann, B. N. (2012). Verticillosides A–M: Polyoxygenated pregnane glycosides from *Asclepias verticillata* L. *Phytochemistry*, 78, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.019>
- Araya, J. J., Kindscher, K., & Timmermann, B. N. (2012). Cytotoxic cardiac glycosides and other compounds from *Asclepias syriaca*. *Journal of Natural Products*, 75(3), 400–407. <https://doi.org/10.1021/np2008076>
- Araya, J. J., Kindscher, K., & Timmermann, B. N. (2016). Sullivantosides A–F: Pregnane glycosides from *Asclepias sullivantii* L. *Phytochemistry Letters*, 16, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.04.011>
- Bagrov, A. Y., Shapiro, J. I., & Fedorova, O. V. (2009). Endogenous cardiotonic steroids: Physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacological Reviews*, 61(1), 9–38. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000711>
- Bielawski, K., Winnicka, K., & Bielawska, A. (2006). Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(7), 1493–1497. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1493>
- Blanco, G., & Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275(5), 633–650. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633>
- Bone, K., & Mills, S. (2013). Principles of herbal pharmacology. In *Principles and Practice of Phytotherapy* (pp. 17–82). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06992-5.00002-5>
- Chao, M.-W., Chen, T.-H., Huang, H.-L., Chang, Y.-W., HuangFu, W.-C., Lee, Y.-C., Teng, C.-M., & Pan, S.-L. (2017). Lanatoside C, a cardiac glycoside, acts through protein kinase Cδ to cause apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*, 7(1), 46134. <https://doi.org/10.1038/srep46134>
- Coe, F. G., & Anderson, G. J. (1996). Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(1), 29–50. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01424-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01424-9)
- de Souza, T. A., Lins, F. S. V., da Silva Lins, J., Alves, A. F., Cibulski, S. P., Brito, T. de A. M., Abreu, L. S., Scotti, L., Scotti, M. T., da Silva, M. S., & Tavares, J. F. (2024). *Asclepiadoideae* subfamily (*Apocynaceae*): Ethnopharmacology, biological activities and chemophenetics based on pregnane glycosides. *Phytochemistry Reviews*, 23(4), 1027–1063. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09914-2>

- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2011). Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 204–215. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60157-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60157-3)
- El-Seedi, H. R., Khalifa, S. A. M., Taher, E. A., Farag, M. A., Saeed, A., Gamal, M., Hegazy, M.-E. F., Youssef, D., Musharraf, S. G., Alajlani, M. M., Xiao, J., & Efferth, T. (2019). Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. *Pharmacological Research*, 141, 123–175. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.015>
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
- Haas, M., Wang, H., Tian, J., & Xie, Z. (2002). Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18694–18702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111357200>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Jiao, D., Zhang, Y., Guo, W., Liu, S., Su, P., & Huang, L. (2026). Cardiac glycosides: Structural diversity, chemical ecology, bioactivity, and artificial synthesis. *Natural Product Reports*, 43, 167–199. <https://doi.org/10.1039/D5NP00050E>
- Johnson, P. H., Walker, R. P., Jones, S. W., Stephens, K., Meurer, J., Zajchowski, D. A., Luke, M. M., Eeckman, F., Tan, Y., Wong, L., Parry, G., Morgan, T. K., Jr., McCarrick, M. A., & Monforte, J. (2002). Multiplex gene expression analysis for high-throughput drug discovery: Screening and analysis of compounds affecting genes overexpressed in cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(14), 1293–1304.
- Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O., & Karlsh, S. J. D. (2003). Structure and mechanism of Na⁺/K⁺-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annual Review of Physiology*, 65(Volume 65, 2003), 817–849. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558>
- Kanai, R., Cornelius, F., Ogawa, H., Motoyama, K., Vilsen, B., & Toyoshima, C. (2021). Binding of cardiotonic steroids to Na⁺,K⁺-ATPase in the E2P state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(1), e2020438118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020438118>
- Kumavath, R., Paul, S., Pavithran, H., Paul, M. K., Ghosh, P., Barh, D., & Azevedo, V. (2021). Emergence of cardiac glycosides as potential drugs: Current and future scope for cancer therapeutics. *Biomolecules*, 11(9), 1275. <https://doi.org/10.3390/biom11091275>
- Kupchan, S. M., Knox, J. R., Kelsey, J. E., & Renauld, J. A. S. (1964). Calotropin, a cytotoxic principle isolated from *Asclepias curassavica* L. *Science*, 146(3652), 1685–1686. <https://doi.org/10.1126/science.146.3652.1685>
- Li, J.-Z., Liu, H.-Y., Lin, Y.-J., Hao, X.-J., Ni, W., & Chen, C.-X. (2008). Six new C21 steroidal glycosides from *Asclepias curassavica* L. *Steroids*, 73(6), 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.015>
- Lindemann, P., & Luckner, M. (1997). Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 46(3), 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00315-4)
- Lopes, R. D., Rordorf, R., De Ferrari, G. M., Leonardi, S., Thomas, L., Wojdyla, D. M., Ridefelt, P., Lawrence, J. H., De Caterina, R., Vinereanu, D., Hanna, M., Flaker, G., Al-Khatib, S. M., Hohnloser, S. H., Alexander, J. H., Granger, C. B., & Wallentin, L. (2018). Digoxin and mortality in patients with atrial fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(10), 1063–1074. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.060>
- Maciel, L., Pereira, F. B. S., Akisue, G., Silva-Coelho, F. A. D., & Coelho, M. D. G. (2019). Anticoccidial and toxicological activity of *Asclepias curassavica* L. and *Euphorbia pulcherrima* Willd. *Ex Klotzsch* decocts against *Eimeria bovis* oocysts. *Pubvet*, 13(4). <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a308.1-8>

- Malcolm, S. (1991). Cardenolide-mediated interactions between plants and herbivores. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites* (Vol. 1, pp. 251–296). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-597183-6.50012-7>
- Manna, S. K., Sah, N. K., Newman, R. A., Cisneros, A., & Aggarwal, B. B. (2000). Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Research*, *60*(14), 3838–3847.
- Matsuo, Y., & Mimaki, Y. (2024). Search for new steroidal glycosides with anti-cancer potential from natural resources. *Journal of Natural Medicines*, *78*(4), 807–827. <https://doi.org/10.1007/s11418-024-01830-1>
- Meneses-Sagrero, S. E., Rascon-Valenzuela, L. A., Garcia-Ramos, J. C., Vilegas, W., Arvizu-Flores, A. A., Sotelo-Mundo, R. R., & Robles-Zepeda, R. E. (2022). Calotropin and corotoxigenin 3-*O*-glucopyranoside from the desert milkweed *Asclepias subulata* inhibit the Na⁺/K⁺-ATPase activity. *PeerJ*, *10*, e13524. <https://doi.org/10.7717/peerj.13524>
- Munkert, J., Ernst, M., Müller-Uri, F., & Kreis, W. (2014). Identification and stress-induced expression of three 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Erysimum crepidifolium* Rehb. And their putative role in cardenolide biosynthesis. *Phytochemistry*, *100*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.006>
- Murillo-Alvarez, J. I., Encarnación, D. R., & Franzblau, S. G. (2001). Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology*, *39*(6), 445–449. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.6.445.5877>
- Navarro García, V. M., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M. Y., Zepeda, G., & Rojas, M. G. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *87*(1), 85–88. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00114-4)
- Neto, C. C., Owens, C. W., Langfield, R. D., Comeau, A. B., Onge, J. St., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2002). Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. *Journal of Ethnopharmacology*, *79*(1), 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00398-1)
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, *83*(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Petschenka, G., Fei, C. S., Araya, J. J., Schröder, S., Timmermann, B. N., & Agrawal, A. A. (2018). Relative selectivity of plant cardenolides for Na⁺/K⁺-ATPases from the monarch butterfly and non-resistant insects. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1424. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01424>
- Plaza, A., Perrone, A., Balestrieri, M., Felice, F., Balestrieri, C., Hamed, A., Pizza, C., & Piacente, S. (2005). New unusual pregnane glycosides with antiproliferative activity from *Solenostemma argel*. *Steroids*, *70*(9), 594–603. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.02.019>
- Ponce, A., Flores-Maldonado, C., & Contreras, R. G. (2025). Cardiac Glycosides: From natural defense molecules to emerging therapeutic agents. *Biomolecules*, *15*(6), 885. <https://doi.org/10.3390/biom15060885>
- Prassas, I., & Diamandis, E. P. (2008). Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews Drug Discovery*, *7*(11), 926–935. <https://doi.org/10.1038/nrd2682>
- Rascón-Valenzuela, L., Velázquez, C., Garibay-Escobar, A., Medina-Juárez, L. A., Vilegas, W., & Robles-Zepeda, R. E. (2015). Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *Journal of Ethnopharmacology*, *171*, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.057>
- Rasmann, S., Johnson, M. D., & Agrawal, A. A. (2009). Induced Responses to Herbivory and Jasmonate in Three Milkweed Species. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(11), 1326–1334. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9719-0>
- Reddy, D., Kumavath, R., Ghosh, P., & Barh, D. (2019). Lanatoside C induces G2/M cell cycle arrest and suppresses cancer cell growth by attenuating MAPK, Wnt, JAK-STAT, and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways. *Biomolecules*, *9*(12), 792. <https://doi.org/10.3390/biom9120792>
- Ren, Y., Ribas, H. T., Heath, K., Wu, S., Ren, J., Shriwas, P., Chen, X., Johnson, M. E., Cheng, X., Burdette, J. E., & Kinghorn, A. D. (2020). Na⁺/K⁺-ATPase-targeted cytotoxicity of (+)-digoxin

- and several semi-synthetic derivatives. *Journal of Natural Products*, 83(3), 638–648. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01060>
- Renata, H., Qianghui, Z., & Baran, P. S. (2012). Strategic Redox Relay Enables A Scalable Synthesis of Ouabagenin, A Bioactive Cardenolide. *Science*, 339(6115), 59–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1230631>
- Renata, H., Zhou, Q., Dünstl, G., Felding, J., Merchant, R. R., Yeh, C.-H., & Baran, P. S. (2015). Development of a Concise Synthesis of Ouabagenin and Hydroxylated Corticosteroid Analogues. *Journal of the American Chemical Society*, 137(3), 1330–1340. <https://doi.org/10.1021/ja512022r>
- Roy, M. C., Chang, F.-R., Huang, H.-C., Chiang, M. Y.-N., & Wu, Y.-C. (2005). Cytotoxic principles from the Formosan Milkweed, *Asclepias curassavica*. *Journal of Natural Products*, 68(10), 1494–1499. <https://doi.org/10.1021/np0501740>
- Rubiano-Buitrago, P., Pradhan, S., Paetz, C., Rowland, H. M., Rubiano-Buitrago, P., Pradhan, S., Paetz, C., & Rowland, H. M. (2022). New structures, spectrometric quantification, and inhibitory properties of cardenolides from *Asclepias curassavica* seeds. *Molecules*, 28(1). <https://doi.org/10.3390/molecules28010105>
- Si, Y., Sha, X.-S., Shi, L.-L., Wei, H.-Y., Jin, Y.-X., Ma, G.-X., & Zhang, J. (2022). Review on pregnane glycosides and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, 47, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.007>
- Siti-Syarifah, M. M., & Nurhanan-Murni, Y. (2018). Therapeutic potential of cardiac glycosides against cancer. In M. S. Akhtar & M. K. Swamy (Eds.), *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements: Volume 2* (pp. 67–81). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8064-7_4
- Song, C.-W., Lunga, P.-K., Qin, X.-J., Cheng, G.-G., Gu, J.-L., Liu, Y.-P., & Luo, X.-D. (2014). New antimicrobial pregnane glycosides from the stem of *Ecdysanthera rosea*. *Fitoterapia*, 99, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.10.008>
- Tian, L., Xie, X.-H., & Zhu, Z.-H. (2018). Calotropin regulates the apoptosis of non-small cell cancer by regulating the cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4-mediated TGF- β /ERK signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 7683–7691. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8853>
- Ticktin, T., & Dalle, S. P. (2005). Medicinal plant use in the practice of midwifery in rural Honduras. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1), 233–248. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.015>
- Tomilova, S. V., & Nosov, A. M. (2025). Steroidal glycosides in intact plants and plant cell culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, 72(6), 240. <https://doi.org/10.1134/S1021443725605786>
- Tripathi, K. D. (2013). *Essentials of medical pharmacology*. JP Medical Ltd.
- Tripathi, P. K., Awasthi, S., Kanojiya, S., Tripathi, V., & Mishra, D. K. (2013). Callus culture and in vitro biosynthesis of cardiac glycosides from *Calotropis gigantea* (L.) Ait. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(4), 455–460. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9481-9>
- Tverskoi, A. M., Poluektov, Y. M., Klimanova, E. A., Mitkevich, V. A., Makarov, A. A., Orlov, S. N., Petrushanko, I. Y., & Lopina, O. D. (2021). Depth of the steroid core location determines the mode of Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cardiotonic steroids. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13268. <https://doi.org/10.3390/ijms222413268>
- Warashina, T., & Miyase, T. (2018). New 8,12;8,20-diepoxy-8,14-secopregnane hexa- and heptaglycosides from the roots of *Asclepias tuberosa*. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 347–356. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1155-9>
- Warashina, T., & Noro, T. (2000). Steroidal glycosides from the aerial part of *Asclepias incarnata*. *Phytochemistry*, 53(4), 485–498. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00560-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00560-9)
- Warashina, T., & Noro, T. (2009). Acylated-oxypregnane glycosides from the roots of *Asclepias syriaca*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(2), 177–184. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.177>
- Warashina, T., Umehara, K., Miyase, T., & Noro, T. (2011). 8,12;8,20-Diepoxy-8,14-secopregnane glycosides from roots of *Asclepias tuberosa* and their effect on proliferation of human skin fibroblasts. *Phytochemistry*, 72(14), 1865–1875. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.05.012>

- Wen, C., Huang, W., Zhu, X.-L., Li, X.-S., Zhang, F., & Jiang, R.-W. (2018). UGT74AN1, a permissive glycosyltransferase from *Asclepias curassavica* for the regiospecific steroid 3-*O*-Glycosylation. *Organic Letters*, 20(3), 534–537. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03619>
- Wen, S., Chen, Y., Lu, Y., Wang, Y., Ding, L., & Jiang, M. (2016). Cardenolides from the *Apocynaceae* family and their anticancer activity. *Fitoterapia*, 112, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.04.023>
- W. Gantt, R., Peltier-Pain, P., & S. Thorson, J. (2011). Enzymatic methods for glyco(diversification/randomization) of drugs and small molecules. *Natural Product Reports*, 28(11), 1811–1853. <https://doi.org/10.1039/C1NP00045D>
- Xia, W., & King, M. W. (2025). Advances in targeted delivery of doxorubicin for cancer chemotherapy. *Bioengineering*, 12(4), 430. <https://doi.org/10.3390/bioengineering12040430>
- Xie, Z., & Askari, A. (2002). Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, 269(10), 2434–2439. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x>
- Xie, Z., & Cai, T. (2003). Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function. *Molecular Interventions*, 3(3), 157. <https://doi.org/10.1124/mi.3.3.157>
- Yang, J., Chen, L., Yan, Y., Qiu, J., Chen, J., Song, J., Rao, Q., Ben-David, Y., Li, Y., & Hao, X. (2019). BW18, a C-21 steroidal glycoside, exerts an excellent anti-leukemia activity through inducing S phase cell cycle arrest and apoptosis via MAPK pathway in K562 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108603. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108603>
- Yuan, W.-Q., Zhang, R.-R., Wang, J., Ma, Y., Li, W.-X., Jiang, R.-W., & Cai, S.-H. (2016). Asclepiasterol, a novel C21 steroidal glycoside derived from *Asclepias curassavica*, reverses tumor multidrug resistance by down-regulating P-glycoprotein expression. *Oncotarget*, 7(21), 31466–31483. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8965>
- Zalucki, M. P., Brower, L. P., & Alonso-M, A. (2001). Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepias humistrata*. *Ecological Entomology*, 26(2), 212–224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00313.x>
- Zhang, R.-R., Tian, H.-Y., Tan, Y.-F., Chung, T.-Y., Sun, X.-H., Xia, X., Ye, W.-C., Middleton, D. A., Fedosova, N., Esmann, M., Tzen, J. T. C., & Jiang, R.-W. (2014). Structures, chemotaxonomic significance, cytotoxic and Na⁺/K⁺-ATPase inhibitory activities of new cardenolides from *Asclepias curassavica*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(44), 8919–8929. <https://doi.org/10.1039/C4OB01545B>
- Zhang, X., King-Smith, E., Dong, L.-B., Yang, L.-C., Rudolf, J. D., Shen, B., & Renata, H. (2020). Divergent synthesis of complex diterpenes through a hybrid oxidative approach. *Science*, 369(6505), 799–806. <https://doi.org/10.1126/science.abb8271>
- Zhao, D., Feng, B., Chen, S., Chen, G., Li, Z., Lu, X., Sang, X., An, X., Wang, H., & Pei, Y. (2016). C21 steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum paniculatum*. *Fitoterapia*, 113, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.001>
- Zhao, H., Tang, Q., Mo, C., Bai, L., Tu, D., & Ma, X. (2017). Cloning and characterization of squalene synthase and cycloartenol synthase from *Siraitia grosvenorii*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.012>
- Zhou, S., Liu, Y., Huang, X., Wu, C., & Pórszász, R. (2024). Omecamtiv Mecarbil in the treatment of heart failure: The past, the present, and the future. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 11, 1337154. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1337154>
- Züst, T., Petschenka, G., Hastings, A. P., & Agrawal, A. A. (2019). Toxicity of Milkweed leaves and latex: Chromatographic quantification versus biological activity of cardenolides in 16 *Asclepias* Species. *Journal of Chemical Ecology*, 45(1), 50–60. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1040-3>