

## بررسی اثرات سمیت و ناهنجاری زایی عصاره برگ گیاه خرزهره بر جنین جوجه

نسرین فاروقی<sup>۱</sup>، مسعود ملکی<sup>۲</sup>، کریم اله قاسمی گرمی<sup>۱</sup>، آرش عبدالملکی<sup>۳\*</sup>

۱. استادیار زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲. استادیار تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی؛ گروه زیست شناسی؛ تبریز؛ ایران.
۳. دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، همدان، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** گیاه خرزهره از گیاهان دارویی است که دارای اثرات بیولوژیک متنوعی از جمله اثر های آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال می باشد. در این تحقیق اثر های تراتوژنیک و سمیت عصاره متانولی این گیاه بر جنین جوجه به عنوان مدل جانوری مورد مطالعه قرار گرفته است.

**مواد و روش ها:** عصاره متانولی استخراج شد. عصاره مورد نظر در حلال DMSO حل شده و در غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر در محل کیسه هوای تخم مرغ های نطفه دار در روز سوم گرما گذاری تزریق گردید، و در دمای ۳۷/۷-۳۸ درجه سلسیوس گذاشته شد.

**یافته ها:** در روز ۱۹ پس از گرماگذاری جنین ها از تخم بیرون آورده شدند، مشاهده ها نشان داد که بترتیب ۷/۴، ۶۵، ۵۶/۷، ۴۶/۷، ۳۶/۶۶ و ۲۱/۶۶ درصد از جنین ها در مقایسه با گروه شاهد زنده ماندند و میزان  $LD_{50}$  برابر ۴۳ میکروگرم به ازای هر تخم مرغ بدست آمد. ناهنجاری های ظاهری شامل تاخیر در رشد، بدشکلی منقار و پا چنگکی بود در حالیکه ناهنجاری های اسکلتی شامل حذف مهره های دم و کلسیفیه نشدن مهره های دمی بود.

**نتیجه گیری:** بررسی ها نشان داد که با افزایش غلظت عصاره متانولی درصد مرگ و میر در مقایسه با گروه شاهد افزایش مییابد و این عصاره در غلظت های پایین اثر سمیت و ناهنجاری زایی ناچیزی دارد. با توجه به سمیت کم عصاره در غلظت های پایین این عصاره می تواند برای اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرد، و نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه است.

**کلمات کلیدی:** تخم مرغ نطفه دار، ناهنجاری، سمیت، جنین جوجه، گیاه خرزهره

### مقدمه

دانشمندان تعیین شده است، ترکیبات فعال اصلی گیاه شامل: Triterpenoides, Glycosides, Cardenolides می باشند (۱۱). ترکیبات استخراج شده این گیاه دارای فعالیت ضد دردی چشم گیری در درجات مختلف در موش می باشند، هم چنین ترکیبات اتانولی استخراج شده از گل های این گیاه دارای فعالیت ضدالتهابی قوی در موش هستند (۳).

اصلی ترین سم این گیاه که روی آن مطالعات بیشتری انجام شده ترکیبی به نام اولئاندرین (Oleandrin) است. این ماده در تمام بخش های گیاه وجود دارد، اولئاندرین با فرمول مولکولی  $C_{27}H_{44}O_9$  بی رنگ، بی بو و بسیار تلخ است در آب نامحلول بوده و در الکل قابل حل می باشد، این ماده در مقابل گرما کاملاً مقاوم است ولی در مقابل نور مقاومت نسبتاً کمی دارد. فعالیت های فارماکولوژی با اهمیت این گیاه شامل فعالیت های ضد

گیاهان از دیر باز جزء منابع مهم درمانی محسوب می شوند، مواد شیمیایی گیاهان که به طور عمدی برای اهداف درمانی استفاده می شوند، متابولیت های ثانوی هستند که به طور سنتزی از متابولیت های اولیه گیاه منشاء میگیرند (۲۲). گیاه خرزهره (*Nerium oleander*) به عنوان یک گیاه دارویی موثر در روش های درمانی چین، مصر و یونان می باشد. امروزه فعالیت فارماکولوژیکی متعدد این گیاه توسط

\*نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، همدان، ایران.  
پست الکترونیکی: [Abdolmalekiarash1364@gmail.com](mailto:Abdolmalekiarash1364@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۰۴

حذف شده و این شرایط برای مطالعات ترانژنومی بسیار ایده آل می باشد (۱،۲۷). ولی از آنجایی که این گیاه جزء گیاهان سمی محسوب می شود، بنابراین بررسی اثرات سمیت و ترانژنومیک عصاره های حاصل از این گیاه که حاوی ترکیبات مختلف هستند، امری اجتناب ناپذیر محسوب می گردد. در این تحقیق اثرات عصاره متانولی گیاه بر روی جنین جوجه جهت بررسی اثرات سمیت، ناهنجاری های جنینی ظاهری و ناهنجاری های اسکلتی در روند طبیعی رشد و تکوین جنین مورد ارزیابی قرار گرفت.

## روش کار

**تهیه عصاره:** برگ های گیاه خرزهره در انت های فصل رویش از تالش و آستارا جمع آوری شدند. تعیین هویت گیاه در گروه زیست شناسی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت و نمونه هرباریومی مربوطه در هرباریوم دانشکده کشاورزی نگهداری می شود. نمونه های گیاهی جمع آوری شده، تحت شرایط آزمایشگاهی و به دور از نور آفتاب خشک شده و در کیسه های نایلونی و در محیطی با دمای اتاق و کاملاً خشک نگهداری شدند. اندام برگ با استفاده از آسیاب پودر شده و پودر بدست آمده بعد از توزین جهت استخراج عصاره مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بدست آوردن عصاره، ۵۰ گرم از پودر نمونه ها، در درون کارتریج تهیه شده از کاغذ واتمن ریخته و در داخل دستگاه سوکسیله قرار گرفتند. عصاره گیری با حلال متانول به مدت ۲-۳ روز انجام گرفت. عصاره متانولی بدست آمده به طور جداگانه در دمای پایین و در شرایط خلاء به کمک دستگاه تبخیر در خلا (Rotary Evaporator, Germany) تغلیظ شد.

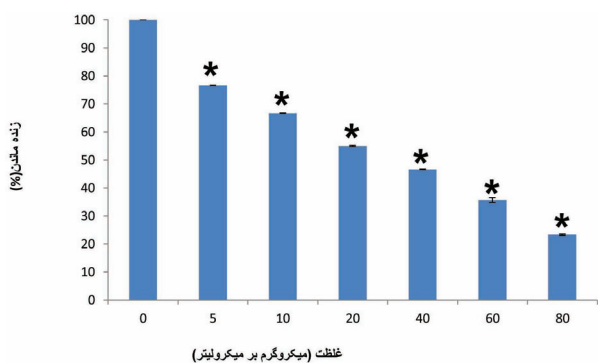
**تیمار جنین جوجه:** تخم مرغ های بارور نژاد راس از شرکت (Arta chicken, Iran) خریداری شدند و در شرایط دمایی مناسب ۱۰-۱۲ درجه سلسیوس نگهداری گردید. ابتدا تخم مرغ ها توسط دستگاه کندلینگ، کندل شده و موقعیت کیسه هوا مشخص شد. سپس در شرایط استریل قرار گرفته و محل تزریق (در بالای کیسه هوا) ضد عفونی گردید، در محل ضد عفونی شده توسط سوزن ته گردی که کاملاً استریل شده بود سوراخی ایجاد شد. غلظت های مختلف عصاره که از قبل آماده شده بود توسط سرنگ هامیلتون از محل سوراخ شده به درون کیسه هوا تزریق گردید و محل تزریق توسط پارافین مذاب کاملاً بسته شد. پس از تزریقات، تخم مرغ ها در داخل راک قرار گرفتند سپس برای گرماگذاری در انکوباتور با دمای در محدوده ۳۷/۷-۳۸ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد قرار

باکتریایی، ضد سرطانی، ضد دردی و ضد التهابی می باشد (۱۶،۲۸). از ترکیبات شیمیایی مختلف گیاه خرزهره برای ساخت دارو ها در درمان بیماری های مختلف استفاده می شود. یکی از این دارو ها Anvirzel می باشد، Anvirzel ترکیب آبی استخراج شده از گیاه خرزهره می باشد که حاوی هر دو ترکیب قطبی و غیر قطبی است. Anvirzel حاوی اولاندین به عنوان ترکیب اصلی با خاصیت سیتوتوکسیسیته می باشد. این دارو دارای فعالیت فارماکولوژیک بر علیه سلول های سرطانی انسان است، علاوه بر فعالیت آن در مهار فعالیت  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$  این دارو باعث القای آپوپتوزیس در سلول های سرطانی می شود (۵،۱۲).

هم چنین خواص ضد سرطانی ترکیبات Monoglycosidic و Cardenolides استخراج شده از گیاه خرزهره مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان دادند که ترکیبات کاردنولید استخراج شده از برگ های این گیاه دارای فعالیت ضد تکثیر از طریق مهار سیکل سلولی در فاز  $\text{G}_2$ ، M و S می باشند که روی سلول های سرطانی مختلف بررسی شدند (۱۵،۲۰). Farahani گزارش داد که عصاره گیاه خرزهره دارای اثرات ضد ویروسی هستند، هم چنین یافته های آزمایش سیتوتوکسیسیته عصاره نشان دهنده کشندگی بسیار بالای عصاره خرزهره در غلظت های بالاتر از ۴/۷۳ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی سلول های Hep-۲ بود (۷). هم چنین در پژوهش دیگری ضد ویروس بودن عصاره خرزهره بر ویروس های هیپاتیت B، C و HIV نشان داده شده است که به علت اثر القاکنندگی عصاره آبی گیاه بر روی اینترفرون بود (۱۴).

در مطالعات مختلف اثرات درمانی این گیاه هم چون اثرات ضد سرطانی، ضد استرس، ضد التهابی و ضد دردی، تعدیل کنندگی سیستم ایمنی هم چنین اثر بر روی مراحل اسپرماتوزن نشان داده شده است (۸،۲۳،۲۴). Hamon-Navard و همکارانش نشان دادند که عصاره آبی برگ و گل گیاه خرزهره بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر مهاری خوبی داشت که حتی در غلظت های متوسط و بالاتر این اثرات مهاری بیشتر از آنتی بیوتیک های اکسی تتراسایکلین و اریترومایسین بودند (۱۳).

جنین جوجه یک مدل مناسب برای مطالعه تکوینی و مورفوژنز مهره داران عالی به حساب می آید چون تخم آن در تمام فصول در دسترس است و هم چنین مراحل تکوینی آن بسیار سریع است، یعنی زمانی که تخم نطفه دار گذاشته می شود جنین آن شامل یک بلاستودرم تخت دولایه است که روی زرده قرار دارد و مراحل بعدی تکوین آن در دمای ۳۸ درجه سرعت اتفاق می افتد. جنین جوجه را میتوان به راحتی کشت داد هم چنین به دلیل جدا بودن جنین از مادر بسیاری از متابولیت های مادر



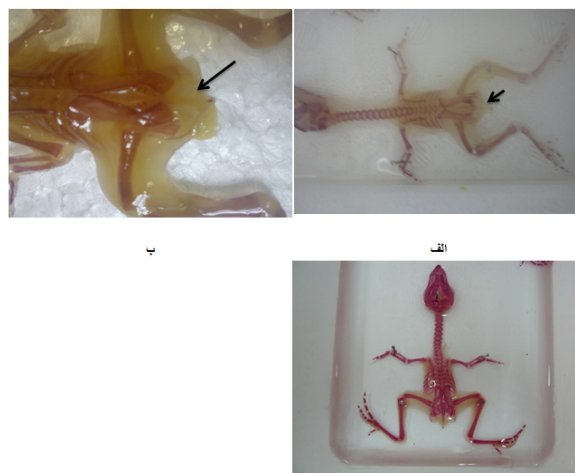
نمودار ۱: تاثیر غلظت های مختلف از عصاره متانولی برگ گیاه خرزهره بر جنین جوجه ( $P < 0.05$  و  $Mean \pm SE$ ).

در بررسی ظاهری جنین ها، ناهنجاری هایی در غلظت های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم به ازای تخم مرغ مشاهده گردید، که این ناهنجاری ها از نوع تاخیر در رشد، پا چنگکی و بدشکلی در منقار بودند (جدول ۱) و (شکل ۱).

غلظت mg/egg	ناهنجاری در بررسی ظاهری (%)	نوع ناهنجاری	ناهنجاری در بررسی با آلیزارین (%)	نوع ناهنجاری
۰	ND	-	ND	مشاهده نگردید
۵	ND	-	ND	ND
۱۰	ND	-	ND	ND
۲۰	٪۱۲/۱۲	کوچک شدن سبب جنین	ND	ND
۴۰	٪۴/۱۶ ٪۱۸/۱۱	کوچک شدن سبب جنین پا چنگکی	ND	ND
۶۰	٪۲۱/۱۸ ٪۴۱/۷	کوچک شدن سبب جنین پا چنگکی	٪۱۶/۴۴	کلسیفه نشدن مهره همی
۸۰	٪۱۶/۲۱ ٪۱۲/۶۶	کوچک شدن سبب جنین بدشکلی در منقار	٪۲۱/۱۸	حذف مهره های دمی

جدول ۱- ناهنجاری های مربوط به غلظت های مختلف عصاره متانولی

برگ گیاه خرزهره بر جنین جوجه



شکل ۱- تصاویر بدست آمده از ناهنجاری های اسکلتی غلظت های مختلف عصاره متانولی برگ گیاه خرزهره می باشند. در تصویر الف ناهنجاری در منقار مشاهده میشود (فلش)، در شکل ب حالت پا چنگکی مشاهده می شود (فلش)، در شکل پ سبب جنین کوچک می باشد و شکل ت هم یک نمونه از جنین های کنترل می باشد.

گرفتند، تخم مرغ ها در طول روز سه بار جهت جلوگیری از چسبیدن جنین به دیواره تخم مرغ چرخانده می شدند.

**بررسی سمیت و ناهنجاری زایی:** جنین های زنده در روز ۱۹ گرماگذاری از پوسته خارج و توسط کلروفورم بیهوش و توزین گردیدند سپس درصد مرگ و میر محاسبه شد. پس از بررسی ظاهری برای بررسی دقیق تر، محتویات شکمی جنین ها تخلیه شده و سپس پوست آن ها کنده شد و در محلول ۲٪ (KOH) **hydroxide Potassium** به مدت سه روز قرار گرفت. پس از این که جنین به حالت ژل های تغییر یافت، به مدت سه روز درون محلول هیدروکسید پتاسیم حاوی **Alizarin** (۱/۰ درصد) رنگ آمیزی شد. در این مرحله مولکول های آلیزارین به دلیل تمایلشان به یون های کلسیم با آن پیوند برقرار کرده و بنابراین هر جایی که کلسیم در بافت استخوانی رسوب کرده باشد توسط آلیزارین شناسایی میشود. شفاف سازی ن های توسط گلیسرول انجام شد، جنین به مدت ۲ روز در گلیسرول ۱۰۰٪ قرار گرفته و باعث شفاف سازی نهایی بافت شده و اسکلت رنگ آمیزی شده توسط آلیزارین را کاملاً مشخص ساخت سپس بررسی های اسکلتی به دقت انجام شد و ناهنجاری ها ثبت گردید (۱۰). **بررسی آماری:** طرح آزمایش از نوع طرح کاملاً تصادفی می باشد، برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ جهت محاسبه تحلیل واریانس از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، جهت مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن (Duncan) و برای محاسبه LD<sub>50</sub> از ارزیابی پروبیت (Probit) استفاده شد. سطح معناداری ( $P < 0.05$ ) به عنوان مرز استنتاج آماری در نظر گرفته شده است.

## یافته ها:

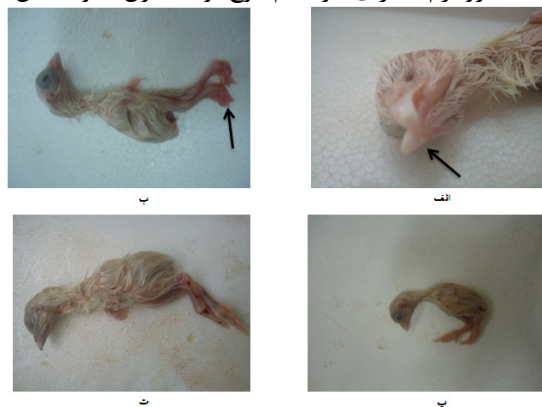
سه گروه آزمایشی ( $n=6$ ) و یک گروه ششم به ازای هر غلظت تزریقی عصاره متانولی به تخم مرغ ها از نظر کسر بقای جنین بررسی شد، این یافته ها نشان داد که در تیمار تخم مرغ ها با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم به ازای هر تخم مرغ به ترتیب ۷۸/۴٪، ۶۵٪، ۵۶/۷٪، ۴۶/۷٪، ۳۶/۶۶٪ و ۲۱/۶۶٪ در روز ۱۹ گرماگذاری زنده مانده اند. بررسی رابطه خطی بین غلظت تیمار و درصد جنین های زنده مانده نشانگر LD<sub>50</sub> برابر ۴۳/۶۰ میکروگرم بود. بررسی آماری داده ها نشان داد که اختلاف بین شاهد و هریک از غلظت های تیمار در سطح احتمال ۵٪ معنی دار می باشد (نمودار ۱).

روز سوم انکوباسیون انجام شد. شاخص ترین ناهنجاری ظاهری مشاهده شده از نوع تاخیر در رشد بود که سبب کوچک شدن سایز جنین در مقایسه با گروه کنترل شده بود، Al-Yahya و همکاران تأثیر سمیت *Neriumoleader* را بر روی موش های مورد مطالعه قرار دادند که روزانه به میزان ۱۰ درصد از کل رژیم روزانه شان از برگ گیاه خرزهره به آن ها داده می شد در این مدت علائمی مثل کاهش وزن و کاهش فعالیت در آن ها مشاهده شد، بررسی های انجام شده بر روی اندام های داخلی موش ها مانند کبد ، کلیه ، قلب و روده نشان داد که ترکیبات سمی گیاه موجب کاهش روند رشد و سرعت جذب مواد غذایی با آسیب به کلیه ها و کبد شده است، با توجه به نتایج بدست آمده قبلی کوچک شدن سایز جنین در بررسی حاضر را می توان به علت آسیب ترکیبات موجود در عصاره گیاه بر روی اندام های حیاتی در رشد جنین مانند کلیه، کبد و روده نسبت داد(۴). ناهنجاری مشهود دیگر پاچنگکی بود که این امر میتواند به علت وجود ترکیباتی باشد که خاصیت تقلیدگری کولین دارند. علت این نوع ناهنجاری تحلیل و عدم تکامل بافت ماهیچه ای است که در نتیجه رقابت با استیل کولین برای متصل شدن به گیرنده های استیل کولین روی می دهد(۲، ۹). KatarzynaWinnacka و همکاران اثرات کاردیاک گلیکوزید گیاه خرزهره را بر روی سلول های سرطان پروستات و درمان آن بررسی کردند. اصلی ترین روش اثر کاردیاک گلیکوزید ها مهار پمپ غشایی Na-K ATPase می باشد که منجر به افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی می شود. کلسیم نقش مهمی در بسیاری از مسیر های سیگنالینگ از جمله تنظیم آپوپتوزیس ایفا میکند. بعضی از این ترکیبات باعث القای آپوپتوزیس در سلول های سرطان پروستات می شوند(۲۶).

### نتیجه گیری

تأثیر عصاره متانولی بر جنین جوجه منجر به ایجاد ناهنجاری های اسکلتی مانند کلسیفیه نشدن مهره های دمی و حذف مهره های دمی شد که به علت القای آپوپتوزیس در سلول های جنینی به ویژه سلول های اندام های انتهایی از جمله مهره های دمی که بیشتر تحت تاثیر مواد ترانوژن قرار می گیرد است(۲۶، ۱۷). بررسی ها نشان داد که با افزایش غلظت عصاره متانولی درصد مرگ و میر در مقایسه با گروه شاهد افزایش می یابد و این عصاره در غلظت های پایین اثر سمیت و ناهنجاری زایی ناچیزی دارد و می تواند برای اهداف درمانی استفاده شود.

بررسی اسکلتی جنین ها، که با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین انجام شد، نشان دهنده ناهنجاری هایی از نوع کلسیفیه نشدن مهره های دمی و حذف مهره های دمی در غلظت های ۶۰ و ۸۰ میکروگرم به ازای هر تخم مرغ بود(جدول ۱) و (شکل ۲).



شکل ۲- تصاویر بدست آمده از ناهنجاری های اسکلتی غلظت های مختلف عصاره متانولی برگ گیاه خرزهره می باشند. در تصویر الف کلسیفیه نشدن مهره های دمی دیده می شود(فلش)، در تصویر ب، حذف مهره های دمی مشاهده می شود(فلش) و تصویر پ، یک نمونه از جنین های کنترل می باشد.

### بحث

مطالعه اثرات تزریق عصاره متانولی برگ گیاه خرزهره بر جنین جوجه در روز سوم گرماگذاری نشان داد که میزان سمیت و اثرات تراژونیک عصاره به غلظت بستگی دارد و با افزایش غلظت درصد مرگ و میر جنین ها نسبت به گروه شاهد افزایش می یابد.

مطالعات نشان داده اند که تا دز آستانه یک عامل ایجاد کننده ناهنجاری، اثرات مخرب آن توسط جنین قابل تحمل می باشد ولی زمانی که دز عامل بیشتر از دز آستانه گردد اثرات سمیت ظاهر می گردد و بین دز عامل ناهنجاریزا و شدت اثرات سوء رابطه مستقیمی مشاهده می شود، آستانه ی تاثیر عصاره متانولی در این مطالعه ۳۰ میکروگرم بود(۶، ۲۵). جنین در مرحله اورگانوژنز حساسیت بیشتری نسبت به مواد ناهنجاریزا دارد، و هر چه از این دوره بگذرد از حساسیت جنین کاسته می شود. زیرا هر اندازه که از شروع رشد جنین میگذرد به علت تکامل سیستم های مختلف بدن اثرات ناهنجاری زایی کمتری را نشان می دهند(۱۹).

سه روز پس از انکوباسیون مرحله اولیه رشد جنین می باشد و همزمان با تحولات مزودرمی است، تزریق مواد ناهنجاری زا به جنین در این مرحله می تواند سبب ایجاد ناهنجاری گردد(۲۱، ۱۸) بنابراین در بررسی فوق تزریق عصاره متانولی در

## سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل  
برای حمایت از این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

## منابع

1. Abdolmaleki A, Zahri S, Bezaatpour A. Teratogenic and cytotoxic effects of VOsalen complex on chicken embryos, hepatic and fibroblastic- cell cultures. *Tehran Univ Med J*. 2013; 71(1):7-14.
2. Al YahyaMA , Al Farhan AH, Adam SEI. preliminary toxicity study on the individual and combined effects of citrulluscolocyn this and Nerium oleander in rats. *Fitoterapia*. 2000 ; 71: 385-391.
3. Al-Farwachi MI, Rhaymah MS, Al-Bandari BA. Acute toxicity of Nerium oleander aques leaf extract in rabbits. *Iraqi j vet sci*. 2008; 22:1-4.
4. Ali H.F.M, ElElla F.M.A. Screening of chemical analysis antioxidant, antimicrobial and antitumor activeteis of essential oil of Nerium oleander flower. *Int. J. Bio. Chem*. 2010; 4: 190-202.
5. Dan NT, Madden T. Murine pharmacokinetics and Metabolism of oleandrin a cytotoxic component of Nerium oleander. *J.exp.thera.onc*. 2002; 2(5): 278-285.
6. Elkington J. *The poisoned womb: Human Reproduction in a polluted world*. New York: Penguin Book. 1985; 89-118.
7. Farahani M. Antiviral effect assay of thymus kotschyanus and nerium oleander on hsv-1 in vitro. *J ShahidSadoughiUniv Med Sci*. 2013; 21(2): 189-96.
8. Farwacchi MI. In vitro and in vivo immunodulatory activities of Nerium oleander aqueous leaf extract in rabbits. *J Anim Vet Adv*. 2007; 6: 1047-50.
9. Forsyth CS, Frank AA, Watrous BJ, Bohn AA. Effect of coniine on the developing chick embryo. *Teratology*.1994; 49: 306.310-
10. Green MC. A rapid method for clearing and staining specimens for the demonstration of bone.Ohaio *J Sci*. 1952; 52: 3134-.
11. Gupta V, Mittal P. Phytochemical and pharmalogical potential of Neriumoleander . *Int. J. Pharm*. 2010; 65:312-329.
12. Haeba M, Mohammed M.A. Toxicity of Nerium oleander leaf extract in mice. *Enver biol*. 2002; 23:231-237.
13. Hamon-Navard S, Bahrami AM, Razmjou M, Asadi-Samani M, Hatami-Lak M. Evaluation of Nerium oleander aqueous extract effect on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermis. *J ShahrekordUniv Med Sci*. 2013; 15(1): 46-54.
14. JuayJamil R, Heinz-herbert F, FaridJamil R. Method of preparing and using a cold extract from the leaves of nerium oleander. *United States Patent Application 20070154573*; 2007.
15. Luay J, Katrin F, Myint M, Gerhard K, Heinz H. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidiccardenolides isolated from Nerium oleander.*J EthnoPharmacol*.2011; 134(3): 781-788.
16. Madden S, Johansen TL, Newman RA. Murine pharmacokinetics and metabolism of oleandrin.a cytotoxic component of Nerium oleander. *J.exp.thera.onc*. 2002; 2:278-285.
17. Manner J, Seidl W, Heinicke F, Hesse H.teratogenic effects of suramin on the chick embryo

- .AnatEmbryol. 2003; 206: 229.237-
18. McBride WG, Vardy PH, French J. Effects of scopolamine hydrobromide on the development of the chick and rabbit embryo. *J Biol sci.* 1982; 35: 173-178.
  19. Muhammed A, Von Borstel R. *Basic and Applied Mutagenesis.* New York: Plenum Press. 1984; 285-298.
  20. Muller BM, Ross K F, Kranus J, Fanz G. Polysaccharides from Nerium Oleander Structure and Biological Activity. *pharmazie.*1991; 46:657-663.
  21. PourMirza A. Lethal and morphological teratogenic effects of a mixture of scopolamine and hyoscyamine on chick embryos. *J Vet Res.* 2001; 56(3): 13-16.
  22. Salim A, Chin AW, Khinghorn YD. *Drug discovery from plants.* New York: Springer; 2008;540-978.
  23. Siddiqui BS, Sultana R, Begum S, Zia A, Suria A. Cardenolides from the methanolic extract of Nerium oleander leaves possessing central nervous system depressant activity in mice. *J Nat Prod.* 1997 Jun; 60(6): 540-4.
  24. Smith JA, Madden T, Vijjeswarapu M, Newman RA. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *BiochemPharmacol.* 2001; 62(4): 469-72.
  25. Sunil Kumar KB, Devi KS. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *J Human Toxicol.* 1992; 34: 408-410.
  26. Winnika K, Bielawski K, Bielawski A. Cardiac Glycosids in cancer Research and Cancer Therapy Department of pharmaceutical Technology. *Acta Pol Pharm.* 2006; 63(2):109-15.
  27. Wollpert L, Brokes J, Jessell T, Lawrence P, Beddington R, Meyerowitz E. *Principles of development.* Oxford University Press. 1997; 460 pp.
  28. Zhang S, Zhao M, Bai L. Bioactive guaianolides from *siyekucai*. *J Nat Prod.* 2006; 69(10): 1425-1428.

