

Nerium oleander'in liyofilize sıvı distilatının rat embriyoları gelişimi üzerine toksik ve teratojen etkilerinin in vitro kültür ortamında araştırılması

Ahmet Kağan Karabulut¹, İsmihan İlknur Uysal¹, Ahmet Levent Baş², Nadire Ünver Doğan¹, Zeliha Fazlıoğulları¹, Hasan Acar³

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi¹ ve Tıbbi Genetik Anabilim³ Anabilim Dalları, Konya

²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Konya

Amaç: *Nerium oleander*, her mevsimde yeşil kalan bir çalı türüdür. Halk arasında antidiabetik, antilipidemik ve geniş spektrumlu bir ilaç olarak kullanılır. Bu çalışmada *Nerium oleander* sıvı distilatının kültür ortamında gelişen rat embriyolarına etkilerinin araştırılması planlandı. **Gereç ve yöntem:** 9,5 günlük rat embriyoları, değişik konsantrasyonlarda (0.2 - 8 mg/ml) *Nerium oleander* ilave edilen rat serumunda 48 saat kültüre edildi. Her bir konsantrasyon için en az 10 embriyo kullanıldı. İlacın sıvı distilatı hidrodistilasyon metodu ile elde edildi. *Nerium oleander*'in toplam morfolojik skor, yolk sak çapı, tepe-kıç mesafesi ve somit sayısı gibi embriyonik gelişimsel parametreler üzerine doz bağımlı etkileri morfolojik metod ile karşılaştırıldı. Embriyolar malformasyonlar bakımından da değerlendirildi. İlacın genotoksitesisi DNA fragmentasyon metodu ile değerlendirildi. **Bulgular:** Değişik konsantrasyonlardaki *Nerium oleander* ilavesi ile kültüre edilen embriyolar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ilacın herhangi bir büyüme geriliği ya da malformasyona sebep olmadığı gözlemlendi. **Sonuç:** Bu sonuçlar *Nerium oleander*'in gebelikte, gelişen embriyo üzerine negatif etkisi olmadığını göstermiştir. Ancak bu veriler ileri in vivo deneyler ve hücre hattı çalışmaları ile desteklenmelidir.

Anahtar sözcükler: : *Nerium oleander*, toksisite, teratojenite, embriyo kültürü

Investigation of developmental toxicity and teratogenicity of lyophilised aqueous distillate of *Nerium oleander* on rat embryos cultured in vitro

Objectives: *Nerium oleander*, an evergreen shrub, is used in folklore medicine as an antidiabetic and antilipidemic and exhibits a wide spectrum of bioactivities. This study was planned to investigate the effects of *Nerium oleander* lyophilised distillate on developing rat embryos in culture. **Materials and methods:** Postimplantation rat embryos of day 9.5 were cultured for 48 h in whole rat serum with the addition of various concentrations of *Nerium oleander* distillate (0.2- 8 mg/ml). At least 10 embryos were used for each concentration. Aqueous distillate of *Nerium oleander* was obtained by hydrodistillation method. Dose-dependent effects of *Nerium oleander* on embryonic developmental parameters such as total morphological score, yolk sac diameter, crown-rump length and somite number were compared using morphological method. Embryos were also evaluated for the presence of any malformations. **Results:** Compared with the controls, the addition of different concentrations of *Nerium oleander* did not cause any growth retardation and/or malformations. **Conclusions:** These results indicate that the use of *Nerium oleander* in pregnancy may not affect the developing embryos negatively. However, these findings should be supported by further in vivo experiments as well as cell-line studies.

Keywords: *Nerium oleander*, toxicity, teratogenicity, whole embryo culture

Giriş

Türkiye'de "Zakkum" olarak bilinen *Nerium oleander*, Apocynaceae familyasına ait tropikal süs bitkisidir. Özellikle Akdeniz ülkelerinde ve subtropikal Asya ülkelerinde

yaygın bulunur (1). Her daim yeşil kalan ve beyaz, sarı, pembe, kırmızı ve şeftali rengi gibi geniş bir renk yelpazesine sahip çiçekleri olan bir bitkidir. *Nerium oleander*, Türkiye'de ve değişik Akdeniz ülkelerinde kanser (2), diabetes mellitus (3), solunum sistemi (4) ve kardiyovasküler hastalıklar, hemoroid, ülser, cüzzam ve yılan sokması gibi durumlarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (5). Yapılan çeşitli çalışmalarda bitkinin merkezi sinir sistemini basıklayıcı etkisi (1) ve doza bağımlı olarak da kardiyotonik etkisi gösterilmiştir (6). *Nerium oleander* hem yabancı ola-

Yazışma Adresi:

Zeliha Fazlıoğulları
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Konya

E-posta: z_topal@yahoo.com

rak yetişen hem de süs bitkisi olarak yetiştirilen bir çiçek olmasına rağmen bütün bölümleri insanlar, hayvanlar ve belirli böcek türleri için zehirlidir (7,8). *Nerium oleander* zehirlenmesine bağlı çok sayıda ölüm vakası bildirilmesine karşın halk arasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Bitkinin bütün bölümlerinde özellikle de yapraklarında oleanderin ve neriine olmak üzere iki güçlü kardiak glikozid bulunur. Bu glikozidler kardiak hücre membranındaki sodyum-potasyum ATPaz pompalarına bağlanıp, inaktif hale getirirler. Bunun sonucu olarak hücre içi sodyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak hücre içi kalsiyum iyonlarının artışı gerçekleşir. Bu durumun sonucu olarak da kontraksiyon gücü artar. Artan hücre içi kalsiyum iyonları dinlenme halindeki spontan hücre depolarizasyonunu ve miyokardın uyarılabilirliğini artırır. Potasyum iyonlarının artışı ile hiperkalemi gelişir. Akut zehirlenmede hiperkaleminin derecesi toksisitenin ciddiyeti ile orantılıdır (9).

Nerium oleander'in toksik etkilerini araştırmak için sığırlarda, koyunlarda ve keçilerde yapılmış çeşitli çalışmalar (10-14) bulunmasına rağmen, gebelik döneminde embriyo gelişimi üzerine etkilerini gösteren çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada gebeliğin özellikle ilk döneminde yani ana organ taslaklarının geliştiği birinci trimesterde *Nerium oleander* distilatı kullanıldığında ortaya çıkabilecek etkiler in vitro kültür ortamında araştırıldı. Araştırmada rat embriyosunda gebeliğin 9,5 ve 11,5 günleri arasında in vitro olarak embriyonun takibinde oldukça elverişli olan, New (15) tarafından bulunan embriyo kültür tekniği kullanıldı. Deneylerden elde edilen sonuçların, folklorik ilaç olarak kullanılan bu bitkinin gebelik dönemindeki olası toksik ve teratojen etkilerinin ortaya konulmasında önemli veriler sağlayacağı düşünüldü.

Gereç ve yöntem

Nerium oleander ekstresinin hazırlanması

Nerium oleander, Mersin bölgesinden Nisan-Mayıs döneminde toplandı. Taze toplanmış *Nerium oleander* yaprakları yıkandıktan sonra parçalandı (100 gr/1000 ml) ve sıcak suda kaynatılarak distilasyonu yapıldı. Elde edilen ekstre, 0.1, 1 ve 10 ml'lik miktarlarda liyofilize (FDT-8618 Freeze Dreyer, Operon, Korea) edilerek yoğunlaştırıldı. Son olarak da deney gruplarında kullanılacak dozlara göre (0,2 - 8 mg/ml) çözülerek sulandırıldı.

Embriyo kültürü aşamaları

Deney hayvanlarının seçimi ve çiftleştirilmesi

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Hayvanların bakımı ve beslenmesi aynı merkezde yapıldı. 21°C ortam ısısında ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve

besin gereksinimleri sağlanan, ağırlığı 150-200 g arasında değişen üç veya dört dişi ve iki erkek Wistar rat (*Rattus Norvegicus*) akşam saatlerinde çiftleşme kafesine konularak gece bir arada bırakıldı. Ertesi sabah dişi ratlara vajinal smear yapıldı. Vajinal plak varlığı veya vajinal smarda sperm saptanması ile çiftleşmenin gece yarısı civarında olduğu düşünülüp o günün öğle saati dışının 0,5 günlük gebe olduğu varsayılarak dişiler ayrı bir kafese alınıp 9 gün optimum şartlarda bakıldı.

Rat embriyolarının (9,5 günlük) eksplantasyonu ve kültürü

Gebeliklerinin 9,5'uncu gününde dişi ratların karın ön duvarı anestezi altında açılıp, abdominal aortadan kan alındı ve serum hazırlamada kullanıldı. Daha sonra içerisinde embriyo bulunan uterus diseke edilip, desidia ve Reichert zarı da ayrılarak embriyo kültüre hazır hale getirildi. Bu işlemler steril 37°C Hanks' dengeli tuz solüsyonu (Sigma, USA) içerisinde ve aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Embriyolar arasında hasarlanmış olanlar, gelişimi geri kalanlar ya da anormal görünümlü olduğu saptananlar çalışmaya dahil edilmedi. Serum hazırlanırken alınan kan örnekleri, pıhtılaşmasına izin verilmeden hemen 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum 56°C'lik su banyosunda 30 dakika süreyle bekletilerek protein inaktivasyonu sağlandı. Bakteriyel kontaminasyonu engellemek amacıyla serumu penisilin G (100 IU/ml) ve streptomisin (100µg/ml) eklenerek kültür ortamı hazırlandı.

Kültür ortamı olarak; kontrol grubunda normal rat serumu kullanılırken, deney grupları için rat serumuna değişen konsantrasyonlarda *Nerium oleander* sıvı distilatı (0.2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml and 8 mg/ml) ilave edildi. Kontrol grubu ve her bir ilaç konsantrasyonu için en az 10 rat embriyosu kullanıldı. *Nerium oleander* ile ilgili daha önce yapılmış in vitro bir çalışma ya da plasental geçiş oranını gösteren herhangi bir çalışma tespit edilemedi. Bu nedenle çalışmada deney grupları belirlenirken Osterloh ve ark (1982)'nin çalışmasında bildirdiği üzere yetişkin bir insanda 4 g *Nerium oleander* yaprağı letal doz olarak kabul edilip, sadece rat-insan ağırlık oranına göre (1/500) hesaplanan dozlar 0.2 mg/ml'den başlanarak 8 mg/ml'ye kadar araştırıldı. Çalışmada biri kontrol grubu ve sekizi de deney grubu olmak üzere toplam dokuz grup ile deneyler gerçekleştirildi.

Eksplantasyonu takiben embriyolar 60 ml'lik steril cam şişelere alınıp, 1 embriyo/ml serum olacak şekilde, New (15)'in belirttiği gibi %5 O₂, %5 CO₂, %90 N₂ içeren gaz karışımı ile 1 dakika süre ile gazlandı ve böylece embriyoların oksijen gereksinimleri karşılandı. Kültür şişeleri 48 saat boyunca 37°C sabit kabin ısısına sahip bir inkübatörde dakikada 30-40 devirle dönen tüpler üzerinde tutuldu. Embriyolara, 24 saat sonra oksijen konsantrasyonu %20'ye çıkarılıp azot içeriği %75'e düşürülen, son gün ise 40. saatte oksijen konsantrasyonu %40'a çıkarılıp azot içeriği %55'e düşürülen ve karbondioksit oranı sabit kalan gaz

karışımı verildi.

Morfolojik Değerlendirme

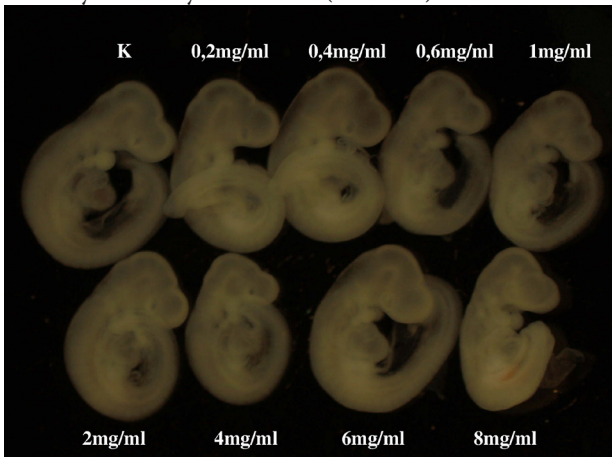
48 saat sonunda kültür süresi tamamlanan embriyolar büyüme ve gelişme açısından değerlendirilmek üzere, kültür ortamından alınarak, steril Hanks' dengeli tuz solusyonu içerisine aktarıldı. 1981'de Brown ve Fabro (16) tarafından yayınlanan ve 1990'da Van Maele Fabry (17) tarafından geliştirilen bir sistem ile 11,5 günlük embriyolar morfolojik açıdan 17 parametre ile mikroskop altında değerlendirildi. Morfolojik parametreler; ortalama yolk sak çapı, yolk sak damarlanması, allantois gelişimi, embriyonun fleksiyonu, kalp gelişimi, nöral tüp kuyruk kısmının gelişimi, ön, orta ve arka beyin gelişimi, göz, kulak, burun ve yutak kavislerinin gelişimi, maxilla ve mandibula gelişimi, ön ve arka ekstremite tomurcuklarının gelişimi, tepe-kıç mesafesi ile somit sayısı değerlendirildi. Embriyolarda herhangi bir malformasyon gelişip gelişmediği ayrıca incelendi.

DNA analizi

Kültüre edilen rat embriyolarında *Nerium oleander*'in olası teratojenik etkilerini değerlendirmek üzere DNA fragmentasyonuna bakıldı. Morfolojik değerlendirmeleri tamamlanan tüm embriyolar her bir grup için ayrı ayrı omak üzere RPMI-1640 içerisine alındı ve kullanılabildiği kadar +4°C de saklandı. Tüm grupların çalışması tamamlandıktan sonra toplanan embriyo örneklerinden standart metodlar kullanılarak total DNA izole edildi. Elde edilen DNA örnekleri %2'lik agaroz jelde elektroforez ile ayrıldı, ethidium bromide ile boyandı ve UV ışık altında DNA fragmentasyon analizi gerçekleştirildi.

İstatistik

Kültür sonrası yapılan morfolojik değerlendirmede elde edilen toplam morfolojik skor ve somit sayısı normal dağılım göstermediği için non-parametrik Kruskal Wallis ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak de-



Resim 1: Rat serumuna eklenmiş, artan konsantrasyonlardaki *Nerium oleander* varlığında in vitro ortamda büyütülen 11,5 günlük rat embriyolarının sağ lateral görüntüsü (X9)

ğerlendirildi. İstatistiksel analizler SPSS version 15.0 (Inc, Chicago, Illinois, USA)'da yapıldı. Yolk sak çapı, tepe kıç mesafesi gibi diğer iki büyüme değişkeni ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan's test ile değerlendirildi.

Bulgular

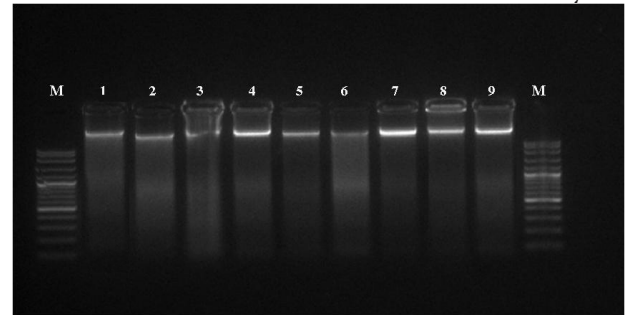
Nerium oleander sıvı distilatı'nın gelişen embriyo üzerine etkilerini araştırmak için yapılan deneylerde bütün kontrol grubu embriyoları normal gelişim gösterdi. Değişen konsantrasyonlardaki (0,2 – 8 mg/ml) *Nerium oleander* sıvı distilatı ile kültüre edilen embriyolar ile kontrol grubu embriyoları karşılaştırıldığında, deney gruplarında gelişimsel parametrelerin (toplam morfolojik skor, somit sayısı, tepe kıç uzunluğu ve yolk sak çapı) hiç birisinde istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmadı ve embriyolarda herhangi bir malformasyon saptanmadı (Resim 1, Şekil 1, 2, 3, 4).

Apoptozis Değerlendirmesi

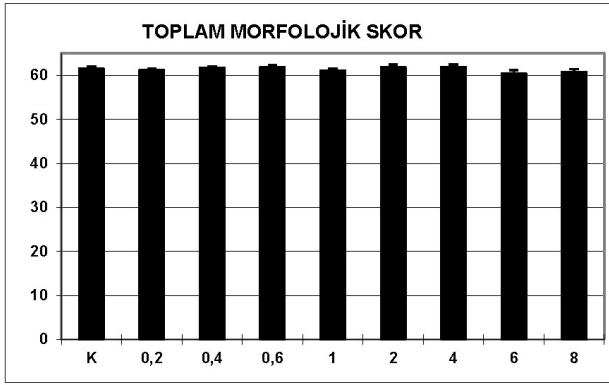
Morfolojik değerlendirmeleri tamamlanan embriyolardan elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yapılan değerlendirme sonucunda marker olarak kullanılan 100 baz çiftlik DNA parçaları jel üzerinde ayırt edilebilirken, bizim embriyolarımızdan elde ettiğimiz DNA'ların herhangi bir fragmentasyon görülmemesine karşılık merdivenleşme oluşturmadığı ve yayma (smear) şeklinde yürüdüğü gözlemlendi. Sonuçta DNA fragmentasyonu oluşumunda kontrol grupları ile deney grupları arasında fark olmadığı ve kullanılan dozlar arasında da fark olmadığı tespit edildi (Resim 2). Bu bulgu çalışmada kullanılan *Nerium oleander* sıvı distilatının apoptozise etkisinin olmadığını gösterdi.

Tartışma

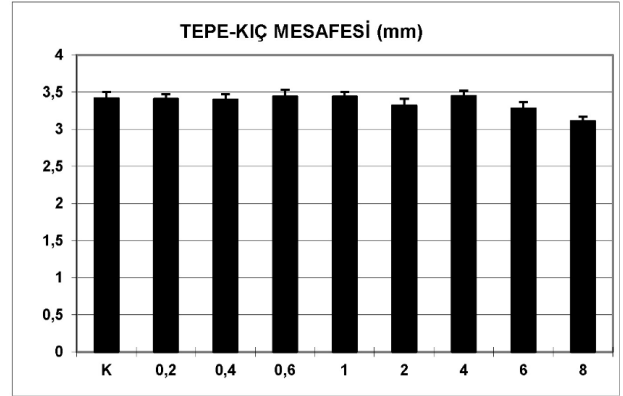
Son zamanlarda strese bağlı hastalıkların tedavisinde bitkisel ilaçların kullanımı yaygınlaşmıştır. Özellikle antioksidanca zengin bitkisel ilaçlar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde büyük rol oynamaktadır (18). Gayathri ve ark (8), yaptıkları in vitro çalışma sonucunda deneysel miyokardial nekroz üzerinde *Nerium oleander*'in antioksidanların koruyucu



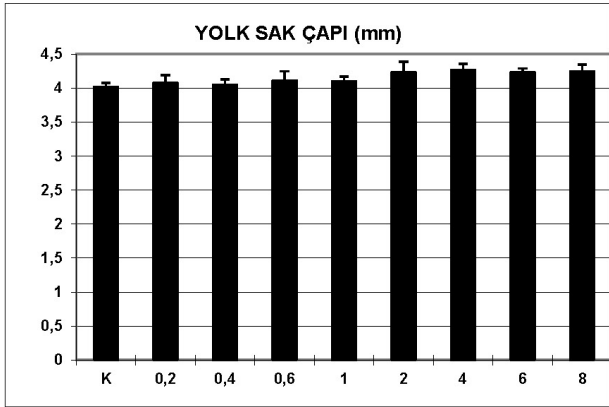
Resim 2: *Nerium oleander* sıvı distilatı varlığında kültüre edilmiş embriyo DNA'ları; M: marker, 1: Kontrol, 2-9. Kuyucuklar sırasıyla; 0,2 mg /ml, 0,4 mg /ml, 0,6mg /ml, 1mg /ml, 2 mg /ml, 4 mg /ml, 6 mg /ml ve 8mg/ml'lik sıvı distilat dozları.



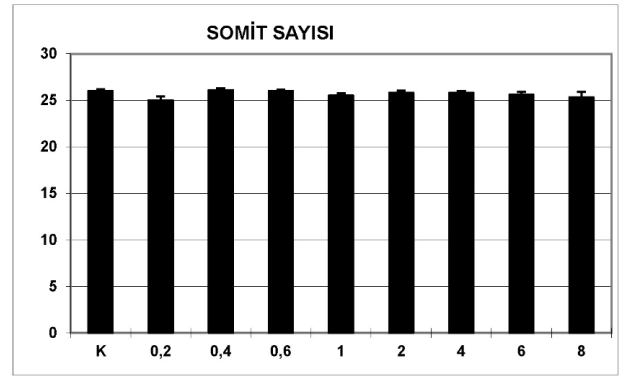
Şekil 1: *Nerium oleander*'in (0,2, 0,4, 0,6, 1, 2, 4, 6 and 8mg/ml) toplam morfolojik skor üzerine etkileri. Değerler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. K: Kontrol



Şekil 3: *Nerium oleander*'in (0,2, 0,4, 0,6, 1, 2, 4, 6 and 8mg/ml) tepe-kiç uzunluğu üzerine etkileri. Değerler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. K: Kontrol



Şekil 2: *Nerium oleander*'in (0,2, 0,4, 0,6, 1, 2, 4, 6 and 8mg/ml) yolk sak çapı üzerine etkileri. Değerler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. K: Kontrol



Şekil 4: *Nerium oleander*'in (0,2, 0,4, 0,6, 1, 2, 4, 6 and 8mg/ml) somit sayısı üzerine etkileri. Değerler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. K: Kontrol

etkisini geliştirerek etkili olduğunu göstermişlerdir. Gayathri ve ark (19)'nın yüksek oranda yağ ağırlıklı diyetle beslenmiş olan ratlarda yaptıkları çalışmada *Nerium oleander*'in beslenmeye bağlı olarak artmış olan kardiyak lipit ve lipoproteinlerin oranını ve vücut ağırlığını önemli oranda düşürdüğünü göstermişlerdir. Baş ve ark (20) Tip 2 diyabetli ratlarda yaptıkları çalışmada *Nerium oleander*'in glikoz metabolizması, insülin direnci, insülinotropik etkinlik, leptin, dislipidemi ve karaciğer enzimleri üzerinde olumlu etkilerini tespit etmişler. Ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan PPAR (peroxisome proliferator- activated-receptor)'in yağ dokuda ve karaciğerdeki ekspresyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla *Nerium oleander*'in diyabetli hastaların tedavisinde etkili bir yaklaşım olabileceğini ve normal populasyonda da yüksek glikoz seviyesinin ve kandaki lipit seviyesinin kontrolünde kullanılabileceğini önermişlerdir. Adome ve ark (6) ise kobay kalpleri ile yaptıkları çalışmalarında *Nerium oleander*'in kalbin kontraksiyon gücünü artırdığını ve kardiyak akışı güçlendirdiğini bildirmişlerdir. Citrullus colocynthis ve *Nerium oleander* bitkilerinin hem tek başlarına hem de kombine

ilaç olarak halk arasında kullanıldığı Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada 6 hafta boyunca ratların diyetlerine %10 oranında bu bitkiler eklenmiş ve biyokimyasal ve hematolojik incelemeler yapılmıştır (21). Bu süreçte *Nerium oleander* yapraklarının toksik olduğunu ancak öldürücü olmadığını bildirmişlerdir. Kombine kullanıldığında ise daha da zararlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Pathak ve arkadaşları (22) yapmış oldukları çalışmalarında, insan, fare ve köpek tümör hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda Anvirzel® (*Nerium oleander* ekstraktı) (1 ng/ml – 500 µg/ml) ve oleandrinin (0,01 ng/ml – 50 µg/ml) tümör hücrelerinde sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. İnsan kanser hücrelerinde her iki ekstraktın da etkili olduğu, diğer yandan fare kanser hücrelerinde oleandrinin anvirzelden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Burada türe özgü etki mekanizmaları ortaya çıkmaktadır.

Nerium oleander ile ilgili letal dozu belirlemek oldukça zordur, bununla ilgili miktar bildiren çok az yayın mevcuttur. Bununla birlikte toksik doz, tüketilen miktar, bitkinin bölümü, tüketilme şekli, kişinin yaşı ve o andaki sağlık

durumu gibi birçok faktöre bağlıdır (23). Al-Farwachi ve ark (24) ortalama letal dozu hesaplamak için tavşanlarda sıvı yaprak ekstresi kullanmışlar ve ortalama letal dozu 157,37 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Szabuniewicz ve ark (25)'nin değişik hayvan türlerinde yaptıkları çalışmada köpek, kedi, keçi ve maymun gibi hayvanların *Nerium oleander*'e karşı çok duyarlı olduğu buna karşın fare, sıçan ve civcivlerin daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Değişik hayvan türleri için ortalama letal doz 0,5 mg/kg olarak bildirilmiştir. Buradan hesapladığımızda embriyo kültüründe ortalama 1 embriyo için kullanılacak maksimum doz 0,75 mg'dır. Biz de çalışmamızda embriyo başına 0,2-8 mg etken madde olacak şekilde sıvı ekstresi kullandık, ancak herhangi bir toksik veya teratojenik etki gözlenmedi. Aslani ve ark (13), *Nerium oleander* ile ilgili toksisite çalışmalarında koyun, keçi gibi geviş getiren hayvanların, laboratuvar hayvanlarına göre daha uygun olduklarını ileri sürmüşlerdir.

Gebelikte *Nerium oleander* kullanımı ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamakla birlikte, yine bir zakkum türü olan sarı oleander olarak bilinen *Thevetia peruviana* ile ilgili bir vaka bildirilmiştir. Thilagar ve ark (26)'nın bildirdikleri bu vakada anne adayı doğumdan 12 saat önce kullanmıştır. Yenidoğanda nöbetler ve bradikardi izlenmiştir, ancak semptomatik tedavi ile bebek sağlığına kavuşmuştur.

Teratojenik ajanlar, gelişen hücre ve dokularda özel mekanizmalar aracılığıyla anormal embriyogeneze sebep olurlar. Teratojenik patogeneze, çoğunlukla apoptozis, biyosentez ve morfogenezde değişikliklere sebep olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte, embriyo kültürü yapılarak teratojenite bakımından değerlendirilen ajanların ilave teknikler (apoptozis tespiti için tunel (27); immünohistokimyasal olarak TNF α ekspresyonu, apoptozis (tunel metodu) ve kaspaz aktivitesi (28); flow sitometri, tunel ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile apoptozis değerlendirmesi (29); flow sitometri ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile apoptozis değerlendirmesi (30)) kullanılarak etki mekanizmaları da araştırılmaktadır. Mevcut çalışmada *Nerium oleander*'in olası toksik ve teratojenik etkilerini in vitro embriyo kültürü tekniği ile değerlendirdikten sonra, apoptozise olan etkileri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle değerlendirildi. Çalışmada kullanılan *Nerium oleander* sıvı distilatının tüm dozlarının kontroller ile karşılaştırıldığında apoptozis yollarını uyarmadığı tespit edildi. Yapılan literatür araştırmasında ise bu distilatın apoptozise etkisi ile ilgili bir çalışma tespit edilemedi.

Yaptığımız çalışmada *Nerium oleander*'in in vitro ortamda istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir teratojenik ya da toksik etkisi tespit edilmezken (Resim 1, 2 ve Şekil 1, 2, 3, 4), insanlarda bildirilen letal dozların üzerine çıkıldığında dahi gelişimsel toksisite ve teratojenite bakımından bir etki gözlenmemiştir. Ancak distilatın türler arasında toksik etki açısından farklılıklar gösterdiğinin belirtilmiş

olması nedeniyle gebelerde *Nerium oleander* kullanımında ilacın türe özgümlük karakteri göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sonuçların ileri in vivo deneyler ve hücre kültürü çalışmaları ile de desteklenmesi uygun olacaktır.

Kaynaklar

1. Begum S, Siddiqui BS, Sultana R, Zia A, Suria A. Bio-active cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry* 1999;50:435-8.
2. Wang X, Plomley JB, Newman RA, Cisneros A. LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment. *Anal Chem* 2000;72:3547-52.
3. Ishikawa A, Yamashita H, Hiemori M, et al. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2007;53:166-73.
4. Al-Qura'n S. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *J Ethnopharmacol* 2009;123:45-50.
5. Osterloh J, Herold S, Pond S. Oleander interference in the digoxin radioimmunoassay in a fatal ingestion. *JAMA* 1982;247:1596-7.
6. Adome RO, Gachihi JW, Onegi B, Tamale J, Apio SO. The cardiotoxic effect of the crude ethanolic extract of *Nerium oleander* in the isolated guinea pig hearts. *Afr Health Sci* 2003;3:77-82.
7. Longford SD, Boor PJ. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology* 1996;109:1-13.
8. Gayathri V, Ananthi S, Chandronitha C, et al. Cardioprotective effect of *Nerium oleander* flower against isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in experimental rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011;16:96-104.
9. Heard K. Digoxin and therapeutic cardiac glycosides. In: Dart RC, ed. *Medical Toxicology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA 2004;1667.
10. Siemens LM, Galey FD, Johnson B. The clinical, cardiac and pathophysiological effect of oleander toxicity in horse. *J Vet Intern Med* 1995;9:217.
11. Oryan A, Maham M, Rezakhani A, Maleki M. Morphological studies on experimental oleander poisoning in cattle. *Zentralblatt für Vet Med* 1996;43:625-34.
12. Adam SE, Al-Yahya MA, Al-Farhan AH. Toxicity of *Nerium oleander* and *Rhazya stricta* in Najdi sheep: hematologic and clinicopathologic alterations. *Am J Chin Med* 2002;30:255-62.
13. Aslani MR, Movassaghi AR, Janati-Pirouz H and Karazma M. Experimental oleander (*Nerium oleander*) poisoning in goats: a clinical and pathological study. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2007;8:58-63.
14. Barbosa RR, Fontenele-Neto JD, Soto-Blanco B. Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). *Res Vet Sci* 2008;85:279-81.
15. New DAT. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol* 1978;53:81-122.
16. Brown NA, Fabro SE. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology* 1981;24:65-

- 78.
17. Van Maele-Fabry G, Delhaise F, Picard JJ. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *Toxicol In Vitro* 1990;4:149-56.
 18. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 2002;113:71-88.
 19. Gayathri V, Ananthi S, Chandronitha C, Sangeetha MK, Vasanthi HR. Hypolipidemic potential of flowers of *Nerium oleander* in high fat diet-fed Sprague Dawley rats. *Nat Prod Res* 2011;25:1110-4.
 20. Bas AL, Demirci S, Yazihan N, Uney K, Ermis Kaya E. Nerium oleander Distillate Improves Fat and Glucose Metabolism in High-Fat Diet-Fed Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Endocrinol* 2012;2012:947187.
 21. Al-Yahya MA, AL-Farhan AH, Adam SE. Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. *Fitoterapia* 2000;71:385-91.
 22. Pathak S, Multani AS, Narayan S, Kumar V, Newman RA. Anvirezal, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. *Anticancer Drugs* 2000;11:455-63.
 23. Bandara V, Weinstein SA, White J, Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicol* 2010;56:273-81.
 24. Al-Farwachi MI, Rhaymah MS, Al-Badrani BA. Acute toxicity of *Nerium oleander* aqueous leaf extract in rabbits. *Iraqi J Vet Sci* 2008;22:1-4.
 25. Szabuniewicz M, Schwartz WL, McCrady JD. Experimental oleander poisoning and treatment. *Southwestern Vet* 1972;25:105-14.
 26. Thilagar S, Thirumalaikolundusubramanian P, Gopalakrishnan S, akshimikandan R, Ayyappan A, Subramanian R. Possible yellow oleander toxicity in a neonate. *Indian Pediatr* 1986;23:393.
 27. Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F, Giavini E. Acetaldehyde in vitro exposure and apoptosis: a possible mechanism of teratogenesis. *Alcohol* 2001;23:35-9.
 28. Torchinsky A, Brokhman I, Shepshelovich J, et al. Increased TNF-alpha expression in cultured mouse embryos exposed to teratogenic concentrations of glucose. *Reproduction* 2003;125:527-34.
 29. Singh G, Sinha N, Mahipag GS. Role of apoptosis in mediating salicylic acid-induced teratogenesis in vitro. *Toxicol Mech Methods* 2009;19:161-8.
 30. Singh G, Sinha N. Involvement of apoptosis in mediating mitomycin C-induced teratogenesis in vitro. *Toxicol Mech Methods* 2010;20:190-6.