Study of the anticoagulant activity of *Rosa Damascena* extract *in vitro*

Dr. Nouma Hasan*
Dr. Dima Aldiab**
Alaa Ahmad***

(Received 8 / 5 / 2023. Accepted 5 / 6 / 2023)

□ ABSTRACT □

Rosa damascena is a phenols-rich plant with variable pharmacological effects. Despite the well-known anticoagulant properties of phenolic compounds, the anticoagulant effect of *R. Damascena* has not been investigated yet.
Our study aimed to investigate the anticoagulant activity of aqueous *R. damascena* petals extracts, by testing its effect *in vitro* on prothrombin time PT using plasma from healthy adults and warfarin treated patients.
Two aqueous extracts were prepared in two different ways. The total phenolic content of the two extracts were 32.23 g/L and 1.120 g/L. Different concentrations were prepared to test their effect on PT using plasma from both healthy adults and warfarin treated patients. All tested concentrations showed a significant prolongation of PT compared to the blank, and the effect was concentration- dependent. The EC50 of extracts tested using plasma of warfarin treated patients (1110.374 mcg/mL) was lower than the EC50 of extracts tested using plasma of healthy adults (1137.354 mcg/mL).
The results indicate a possible anticoagulant effect of aqueous *R. damascena* petals extracts. This effect might be synergistic to the effect of warfarin.

Keywords: Anticoagulant activity, *Rosa damascena*, Prothrombin time, Warfarin.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Assistant Professor department of Pharmacology and Toxicology- Faculty Of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.**
** **Associate Professor at department of Food control- Faculty Of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*** **Master student at department of Pharmacology and Toxicology- Faculty Of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.**

 Print ISSN: 2079-309X, Online ISSN: 2663-4287

دراسة الفعالية المضادة للتخثر لمستخلص الوردة الدمشقية في الزجاج

د. نعمى حسن*

د. ديمة الدياب **

علاء احمد ***

(تاريخ الإيداع 8 / 5 / 2023. قبل للنشر في 5 / 6 / 2023)

□ ملخّص □

تعتبر الوردة الدمشقية نباتاً غنياً بالمركبات الفينولية، ولها العديد من الفوائد الطبية، حيث تم اقتراح الفعالية المضادة للأكسدة والالتهاب والسرطان وغيرها. لم تتم حتى الآن دراسة الفعالية المضادة للتخثر للوردة بالرغم من الخواص المضادة للتخثر المعروفة للفينولات.

هدفت هذه الدراسة إلى استقصاء الفعالية المضادة للتخثر لمستخلصات بتلات الوردة الدمشقية المائية عبر اختبار تأثيرها على تطاول زمن البروترومبين في الزجاج باستخدام بلاسما من أفراد أصحاء ومن مرضى معالجين بالوارفارين.

تم تحضير مستخلص مائي من البتلات بطريقتين مختلفتين. بلغ محتوى المواد الفينولية في المستخلصين المحضرين 32.23 غ/ل و1.120 غ/ل. تم تحضير عدة محاليل بتراكيز مختلفة انطلاقاً من هذه المستخلصات لاختبار تأثيرها على زمن البروترومبين. أظهرت جميع التراكيز المختبرة على نوعي البلاسما تطاولاً هاماً إحصائياً في زمن البروترومبين مقارنةً بالناصع وكان التأثير معتمداً على التركيز. كانت EC50 للمستخلصات المختبرة على بلاسما مرضى الوارفارين (1110.374 مكغ/مل) أدنى من EC50 للمستخلصات المختبرة على بلاسما الأصحاء (1137.354 مكغ/مل).

تشير النتائج إلى احتمال وجود تأثير مضاد للتخثر للمستخلصات المائية لبتلات الوردة الدمشقية، كما تشير إلى إمكانية وجود تأثير تآزري لها مع الوارفارين.

الكلمات المفتاحية: الفعالية المضادة للتخثر، الوردة الدمشقية، زمن البروترومبين، وارفارين.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

*مدرّسة- قسم علم تأثير الأدوية والسموم- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

**أستاذ مساعد- قسم مراقبة الأغذية- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

***طالب ماجستير- قسم علم تأثير الأدوية والسموم- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

مقدمة:

يعرّف الإرقاء بأنه العملية التي تؤمن إصلاح أذيات الأوعية الدموية والحد من خسارة الدم، وبنفس الوقت تجنب التخثر غير الطبيعي وما يترتب عنه من نقص في تروية الأعضاء الحية. تشمل مراحل الإرقاء تضيق الأوعية ومن ثم تشكل سدادة من الصفيحات الدموية يليها تفعيل شلال التخثر [1]. أما الانصمام الخثاري فهو حالة مرضيّة ويعد المسبب الرئيسي للأمراض القلبية الإقفارية والسكتة الدماغية والخثار الوريدي العميق كما أنه من بين الأسباب الرئيسية للوفيات والإمراضية، وتشير الإحصائيات إلى أن أمراض القلب والسكتة الدماغية هي المسؤولة عن وفاة واحدة من كل أربع حالات في جميع أنحاء العالم [2].

زمن البروترومبين (PT) هو واحد من أكثر اختبارات تقييم التخثر استخداماً في الرعاية الصحية لتشخيص مخاطر النزف ومراقبة العلاج بالوارفارين، حيث يسمح بتقييم السبيل الخارجي للتخثر. يقوم مبدأ الاختبار على تفعيل نظام التخثر في عينة البلاسما (الموجودة في أنبوب سترات) بوجود العامل النسيجي (الصميم البروتيني والفوسفوليبيد) و$CaCl_2$ مما يؤدي إلى تكوين خثرة مستقرة، يتم تسجيل الوقت من التفعيل حتى تكوين خثرة مستقرة بالثواني، ويمثل ذلك زمن البروترومبين [3]. يبلغ زمن البروترومبين الطبيعي حوالي 11−15 ثانية [4].

يشمل علاج الخثار كل من العلاج الدوائي المتمثل بمضادات تكدس الصفيحات مثل الأسبرين والكلوبيدوغريل، مضادات عوامل شلال التخثر مثل الهيبارين والوارفارين وأيضاً حالّات الخثرة مثل الستربتوكيناز والألتيبلاز [5]، كذلك يعد تعديل نمط الحياة أساسياً، حيث يجب اتباع نظام غذائي ملائم والمواظبة على ممارسة التمارين الرياضية مع أخذ العلاجات المساعدة كالمتممات الغذائية والعقاقير بالاعتبار، حيث يوصى عموماً بالنباتات الغنية بالمواد الفينولية [6].

وتشير العديد من الأبحاث بوضوح إلى أن كلاً من عديدات الفينول والمستخلصات الغنية بالفينولات تملك العديد من الخواص الطبية كالفعالية المضادة للأحياء الدقيقة [7]، التأثير الخافض لسكر الدم [8]، الفعالية المضادة للالتهاب [9]، الفعالية المضادة للأكسدة [10]، وكذلك الفعالية المضادة للتخثر [11]. إن امتلاك الفينولات لخصائص مضادة للأكسدة ومضادة للتخثر في آنٍ معاً قد يجعلها مفيدة في تكوين عوامل علاجية جديدة أو مكملات غذائية، واستناداً إلى ذلك، ستكون عديدات الفينول مفيدة جداً في كل من الوقاية والعلاج من مضاعفات الانصمام الخثاري المرتبطة بالفشل المتعدد للإرقاء، خصوصاً وأنَّ العوامل العلاجية المتاحة لا تقدم مثل هذه التأثيرات المزدوجة المضادة للأكسدة والمضادة للتّخثر [6].

ومن النباتات الغنية بالمواد الفينولية، الوردة الدمشقية، اسمها العلمي *Rosa Damascena* من الفصيلة الوردية Rosaceae المنتشرة في العديد من المناطق منها سوريا [12]. تعد من العقاقير شائعة الاستخدام سواء مستخلص بتلاتها، زيتها العطري أو ماء الورد، فهي نبات زينة، مصدر للعطور، مادة أولية في الصناعات الغذائية، مع امتلاكها العديد من الخواص الطبية، حيث يملك هذا العقار العديد من الخواص الدوائية المحتملة كالخواص المضادة للأحياء الدقيقة، الفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب، التأثير المضاد للسعال والموسع للقصبات، كذلك التأثير الخافض لسكر وشحوم الدم، وأيضاً تأثيرات عصبية: منومة، مسكنة، مضادة للاختلاجات [13].

تحتوي الوردة الدمشقية على العديد من المكونات الكيميائية النباتية الهامة، فالبتلات المعزولة تحوي على التربينات والغليكوزيدات والفلافونوئيدات (فلافونولات مثل الكامفيرول والكيرسيتين وأنتوسيانينات). تحتوي هذه الوردة أيضاً على حمض الكربوكسيليك والميرسين والفيتامين C وزيوت دسمة وأحماض عضوية. يعد كل من نيرول nerol وكامفيرول

kaempferol المكونين الرئيسيين للزيت العطري. أظهرت تحليلات الورد المطلق Rose absolute أن فينيل إيتيل الكحول phenyl ethyl alcohol وسيترونيلول citronellol ونوناديكان nonadecane والإيتانول ethanol وجيرانيول geraniol وهينيكوزان heneicosane كانت المركبات الرئيسية. كما وُجد أن المنتج المائي بالتقطير Hydrosol يحتوي على أربعة مكونات أساسية وهي: فينيل إيتيل الكحول ونيرول وجيرانيول وسيترونيلول [13، 14]. إن المركبات الفينولية مسؤولة في الغالب عن الخواص الطبية للفصيلة الوردية فهي موجودة بكميات كبيرة وتعد مسؤولة عن طيف واسع من الفعالية الفارماكولوجية [14].

بالنسبة للتأثير المضاد للتخثر، فقد أقرّت العديد من الدراسات بامتلاك مستخلصات نباتية متنوعة غنية بالمواد الفينولية فعالية مضادة للتخثر [6]. ولمّا كانت الوردة الدمشقية مصدر غني بالمركبات الفينولية، فمن المحتمل أن تملك مستخلصاتها تأثيراً مضاداً للتخثر، وهذا ما هدفت دراستنا إلى استقصائه.

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

لا وجود لدراسات تستقصي الفعالية المضادة للتخثر للوردة الدمشقية بعد، على الرغم من غناها بالمركبات الفينولية، وإذا تم إثبات هذه الفعالية، فقد يكون للوردة الدمشقية خصائص واقية من الخثار عند أولئك الذين لا يتناولون مضادات التخثر، خصوصاً مع شيوع استخدامها في بلادنا. بالمقابل، قد يعزز استخدام الوردة الدمشقية خصائص مضادات التخثر الموصوفة، مما يزيد من خطر النزف.

أهداف البحث:

- استقصاء الفعالية المضادة للتخثر لمستخلص الوردة الدمشقية في الزجاج من خلال قياس زمن البروترومبين باستخدام عينات دم من أفراد أصحاء.
- تقييم خطر النزف للاستخدام المتزامن لكل من مضادات التخثر ومستخلص الوردة الدمشقية في الزجاج من خلال قياس زمن البروترومبين باستخدام عينات دم من مرضى معالجين بدواء الوارفارين.

طرائق البحث ومواده:

تم إجراء البحث في مخابر جامعتي تشرين والمنارة ومشفى تشرين الجامعي.

1- المواد والأجهزة المستخدمة:

المواد المستخدمة:

حمض الغاليك، كربونات الصوديوم، كاشف Folin-Denis (Sigma-Aldrich, Switzerland)، ماء مقطّر حديثاً، كاشف اختبار زمن البروترومبين السائل (عالي الحساسية) Biorex Diagnostics Ltd. United Kingdom.

الأجهزة المستخدمة:

ميزان الكتروني ذو حساسية 0.0001 غ (RADWAG)، حمام مائي (MEMMERT)، مجفدة (Lab TECh®)، مقياس الطيف الضوئي (DIAB SP-UV1100)، مثفلة أنابيب دموية (Scilogex)، جهاز قياس زمن البروترومبين نصف الآلي (URIT).

العيّنات:

تم شراء بتلات الوردة الدمشقية الشائعة في سوريا في موسم إزهارها من السوق المحلية في حلب ثم تم تجفيف هذه البتلات على سطح زجاجي في غرفةٍ مهوّاة بعيداً عن الضوء وبعدها طُحنت البتلات الجافة في خلاطٍ منزلي للحصول على مساحيق ناعمة ووُضعت في عبوات عاتمة لحمايتها من الضوء.

2- تحضير المحاليل:

- **محلول العمل من كاشف Folin Denis:**

حُضّر المحلول بتمديد كاشف Folin Denis بالماء المقطّر بنسبة 1:1، حيث تم تمديد 800 ميكرولتر من الكاشف بـ 800 ميكرولتر من الماء المقطّر.

- **محلول كربونات الصوديوم 2%:**

حُضّر محلول كربونات الصوديوم 2% من خلال وزن 1 غ من كربونات الصوديوم وحلّها في القليل من الماء المقطّر ثم الإكمال بالماء المقطّر حتى خط العيار في بالون معايرة سعة 50 مل.

- **المحلول الأم لحمض الغاليك 5 غ/ل:**

حُضّر هذا المحلول بوزن 0.125 غ من حمض الغاليك وحلّها في القليل من الماء المقطّر ثم الإكمال بالماء المقطّر حتى خط العيار في بالون معايرة سعة 25 مل.

3- تحضير مستخلصات بتلات الوردة الدمشقية المائية:

- **الطريقة الأولى (الاستخلاص بدرجة حرارة 60 لمدة 3 دقائق):**

أُضيف 10 غ من مسحوق بتلات الوردة الدمشقية إلى 100 مل من الماء المقطر ووُضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة ثلاث دقائق ثم تمّ التبريد بالثلج والترشيح والحصول على المستخلص المائي، تمت بعد ذلك عملية التجفيد ثم حُفظت البقية المجفدة في الثلاجة (−20 درجة مئوية) إلى حين الاستخدام.

- **الطريقة الثانية (الاستخدام الشعبي):**

أُضيف 2 غ من مسحوق بتلات الوردة إلى 200 مل من الماء المقطر المغلي ونُقِعَ لمدة ثلاث دقائق ثم تمّ الترشيح للحصول على المستخلص المائي. تمّ الاستخلاص بهذه الطريقة لمحاكاة الاستخدام الشعبي لبتلات الوردة الدمشقية.

4- تحضير سلسلة عيارية من حمض الغاليك:

حُضرت السلسلة العيارية لحمض الغاليك بالتراكيز النهائية التالية: 0.1 - 0.15 - 0.2 - 0.25 - 0.35 غ/ل، وبحجم نهائي 5 مل لكل تركيز انطلاقاً من التركيز البدئي للمحلول الأم 5 غ/ل، وفق الآتي: تم وضع 0.1 مل من كل محلول من محاليل حمض الغاليك في أنبوب اختبار ثم تمت إضافة 2 مل من محلول بيكربونات الصوديوم 2%، تم مزجها جيداً والانتظار لمدة 5 دقائق. تلا ذلك إضافة 0.1 مل من كاشف Folin Denis الممدد بالطريقة التي تم ذكرها، تُرِكَ المزيج الناتج بحرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة في الظلام، وبعد انتهاء المدة تمت قراءة قيم امتصاصية العينات

عن طريق جهاز السبيكتروفوتومتر عند طول الموجة 750 نانومتر بتكرارية ثلاث مرات بعدها تم حساب متوسط القراءات. جرى في نفس الوقت تحضير ناصع blank للطريقة وذلك بتطبيق نفس الخطوات السابقة ولكن باستبدال 0.1 مل من محلول حمض الغاليك بـ 0.1 مل من الماء المقطّر.

5- تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية:

حُدِّد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية وفق طريقة Folin-Ciocalteu التي ذكرها الباحثان Vermerris وNicholson [15].

- **تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في محلول البقية المجفدة:**

حُلّت البقية المجفدة في 4 مل من الماء المقطر (محلول البقية المجفدة)، ثم أُخذ 1 مل من المحلول السابق ومُدّد حتى 100 مل بالماء المقطر، بعد ذلك قيست الامتصاصية في جهاز السبيكتروفوتومتر عند طول موجة 750 نانومتر، وفق نفس الخطوات المذكورة في تحضير السلسلة العيارية من حمض الغاليك.

- **تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في مستخلص الاستخدام الشعبي:**

أُخذ 1 مل من المستخلص ومُدّد حتى 10 مل بالماء المقطر، ثم قيست الامتصاصية في جهاز السبيكتروفوتومتر عند طول موجة 750 نانومتر، وفق نفس الخطوات المذكورة في تحضير السلسلة العيارية من حمض الغاليك.

6- تحضير محاليل بتراكيز مختلفة من المركبات الفينولية بدءاً من محلول البقية المجفدة:

حُضرت ستة محاليل بتراكيز مختلفة (250 - 500 - 750 - 1000 - 1500 - 2000 مكغ/مل) وبحجم نهائي 10 مل لكل تركيز، انطلاقاً من محلول أم بتركيز 3.223 غ/ل (حُضر بأخذ 1 مل من محلول البقية المجفدة ذو التركيز 32.23 غ/ل وتمديده حتى 10 مل بالماء المقطر).

7- تحديد الفعالية المضادة للتخثر في الزجاج *In Vitro*:

- **مجموعة الدراسة:**

جُمِعَت عينات الدم الكامل من 5 أفراد متطوعين أصحاء (3 ذكور و2 إناث)، تتراوح أعمارهم بين 23 - 40 سنة، مع مراعاة معايير الاستبعاد التالية: زمن بروترومبين متطاول لأكثر من 15 ثانية، الإصابة بأي من الأمراض القلبية الوعائية، الداء السكري، البدانة، التدخين، تناول أدوية NSAIDs مؤخراً، صيغة شحمية مضطربة [4]. تم تثفيل العينات للحصول على البلاسما لاستخدامها في اختبار قياس زمن البروترومبين. كذلك، جُمعت عينات الدم الكامل من 5 مرضى معالجين بدواء الوارفارين (2 ذكور و3 إناث)، تتراوح أعمارهم بين 32 - 65 سنة، وتم تثفيلها للحصول على البلاسما لاستخدامها في اختبار قياس زمن البروترومبين.

- **جمع عينات الدم:**

تم الحصول على عينات الدم الوريدي من الذراع باستخدام محاقن معقمة، ووضعت منفصلة في أنابيب تحتوي على سترات الصوديوم لمنع عملية التخثر. تم إجراء التثفيل المركزي لفصل الخلايا الدموية عن البلاسما من أجل الحصول على بلازما الصفيحات الدموية النقية لاختبار زمن البروترومبين. تم عزل كل عينة بلاسما بشكل منفصل في حاويات خاصة باستخدام الممص المكروي [16].

- **اختبار زمن البروترومبين PT:**

تم العمل وفق الطريقة المذكورة في دراسة Taj Eldin وزملائه، مع بعض التعديلات [4]. تم وضع 50 ميكرولتر من البلاسما (من فرد صحيح/من مريض معالج بالوارفارين) في حجرة الاختبار، تلا ذلك حضن العينة بدرجة حرارة 37 لمدة 70 ثانية، ثم إضافة 100 ميكرولتر من كاشف زمن البروترومبين المدفأ مسبقاً عند درجة حرارة 37 لمدة 5 دقائق، تمت قراءة زمن البروترومبين بالثواني. تمّ تطبيق الخطوات السابقة 3 مرات وأخذ متوسط القراءات.

تمت إضافة 50 ميكرولتر من الماء المقطر قبل الحضن كناصع Blank لاستبعاد تأثير المحل على تطاول زمن البروترومبين.

تمت إضافة المحاليل ذات التراكيز المختلفة من الفينولات في كل مرة (250 - 500 - 750 - 1000 - 1500 - 2000 مكغ/مل، بالإضافة إلى مستخلص الاستخدام الشعبي بتركيز 1120 مكغ/مل) قبل الحضن لاختبار تأثيرها على زمن البروترومبين.

8- حساب قيم EC_{50}:

في علم تأثير الأدوية، يتم التعبير عن كفاءة المركب الدوائي من خلال حساب التركيز اللازم لتحقيق 50% من الاستجابة (EC_{50})، والذي يشير إلى تركيز الدواء الذي يحقق استجابة في منتصف المسافة بين الخط القاعدي والحد الأقصى للاستجابة على المنحني تركيز-استجابة [17]. تم حسابها من خلال برنامج RStudio.

9- الدراسة الإحصائية:

تم إجراء الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج RStudio وهو بيئة تطوير متكاملة للّغة R والتي هي لغة برمجة للحوسبة والرسومات الإحصائية، وذلك للقيام بعملية التحليل وتحقيق الأهداف الموضوعة في إطار هذا البحث، كما تم استخدام مستوى دلالة (5%)، ويعد مستوى مقبول بصفة عامة، ويقابله مستوى ثقة يساوي (95%) لتفسير نتائج الدراسة، وتم استخدام الأساليب الإحصائية التالية:

- المتوسطات الحسابية والأخطاء المعيارية.
- تم اللجوء إلى اختبار Shapiro-wilk للتحري فيما إذا كان توزع المتغير يتبع التوزيع الطبيعي.
- تم استخدام اختبار تحليل التباين One-way ANOVA لمقارنة توزع المتغير ضمن المجموعات كافة.
- تمت مقارنة متوسطات المجموعات عبر اختبار pairwise t-test، وتم اعتبار الفروقات معنوية (*) عند قيمة p أصغر من 0.05.

النتائج والمناقشة:

1- تحديد سويات المركبات الفينولية:

حُسبَ المحتوى الكلي من المركبات الفينولية بالاعتماد على المعادلة الخطية للسلسلة العيارية لحمض الغاليك وفقاً لطريقة Folin-Ciocalteu التي تم ذكرها سابقاً والتي تراوحت تراكيزها بين (0.1 - 0.35 غ/ل).

بلغ إجمالي المحتوى الفينولي في محلول البقية المجفدة 32.23 غ/ل معبراً عنه بعدد غرامات حمض الغاليك المكافئة للمركبات الفينولية الموجودة في ليتر من محلول البقية المجفدة، بينما بلغ إجمالي المحتوى الفينولي في مستخلص

الاستخدام الشعبي 1.120 غ/ل، معبراً عنه بعدد غرامات حمض الغاليك المكافئة للمركبات الفينولية الموجودة في ليتر من المستخلص.

2- دراسة الفعالية المضادة للتخثر في الزجاج *In Vitro*:

تمت دراسة الفعالية المضادة للتخثر للمحاليل ذات التراكيز المختلفة من المركبات الفينولية ولمستخلص الاستخدام الشعبي وذلك من خلال اختبار زمن البروترومبين وباستخدام الماء المقطر كناصع.

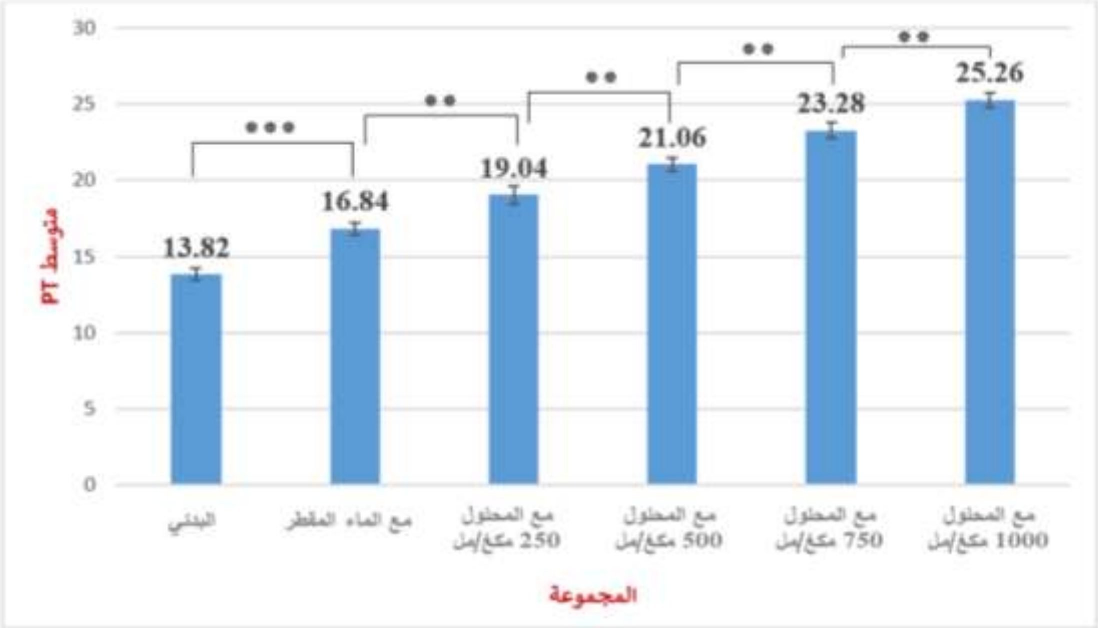
- **الدراسة على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء:**

يوضح الجدول (1) والشكل (1) نتائج اختبار زمن البروترومبين مع المحاليل ذات التراكيز المختلفة من المركبات الفينولية المحضّرة بدءاً من محلول البقية المجفدة عند اختبارها على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء، علماً أن أعلى قيمة يعطيها الجهاز لزمن البروترومبين هي 70 ثانية.

الجدول (1): متوسطات قيم زمن البروترومبين (بالثواني) مع المحاليل ذات التراكيز المختلفة المختبرة على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء في الزجاج مقارنةً مع الماء المقطر والزمن البدئي

العينة / المجموعة	متوسط PT العينة 1	متوسط PT العينة 2	متوسط PT العينة 3	متوسط PT العينة 4	متوسط PT العينة 5	المتوسط النهائي	SEM*
البدئي	13	15	12.9	14.2	14	13.82	0.392938
الماء المقطر	16.3	18.2	15.9	16.9	16.9	16.84	0.389358
250 مكغ/مل	18.3	21.2	17.7	18.9	19.1	19.04	0.592959
500 مكغ/مل	20.6	22.8	20.1	20.8	21	21.06	0.46
750 مكغ/مل	23	25.1	22.1	23	23.2	23.28	0.493356
1000 مكغ/مل	25.1	27.1	24.2	24.9	25	25.26	0.486415
1500 مكغ/مل	> 70	> 70	> 70	> 70	> 70	> 70	0
2000 مكغ/مل	> 70	> 70	> 70	> 70	> 70	> 70	0

*Standard error of mean



الشكل (1): متوسطات قيم زمن البروترومبين (بالثواني) مع المحاليل ذات التراكيز المختلفة المختبرة على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء في الزجاج مقارنةً مع الماء المقطر والزمن البدئي، وتم اعتبار الفرق هام إحصائياً (*) في حال كانت p أصغر من 0.05

نلاحظ زيادة هامة إحصائياً في زمن البروترومبين عند إضافة الماء المقطر (الناصع) (16.84 ثا) بالمقارنة مع الزمن البدئي الذي تم قياسه دون أية إضافات (13.82 ثا)، وعلى هذا الأساس تمت مقارنة المحاليل ذات التراكيز المختلفة مع الماء المقطر، وكانت النتيجة زيادة زمن البروترومبين بشكل هام إحصائياً مع جميع التراكيز، حيث كان متوسط زمن البروترومبين مع المحلول ذو التركيز 250 مكغ/مل (19.04 ثا) بتطاول مقداره (2.2 ثا) بالمقارنة مع الماء المقطر، بينما بلغ متوسط زمن البروترومبين (21.06 ثا) مع المحلول ذو التركيز 500 مكغ/مل بتطاول مقداره (4.22 ثا) بالمقارنة مع الماء المقطر، أما مع المحلول ذو التركيز 750 مكغ/مل والمحلول ذو التركيز 1000 مكغ/مل فقد كان متوسط زمن البروترومبين مساوٍ إلى (23.28 ثا، 25.26 ثا) بمقدار تطاول (6.44 ثا، 8.42 ثا) على الترتيب مقارنةً مع الماء المقطر، أما بالنسبة للتراكيز 1500 و2000 مكغ/مل فقد سببت زيادة في زمن البروترومبين لأكثر من 70 ثانية (أعلى قيمة يعطيها الجهاز).

كانت هذه الزيادة في زمن البروترومبين معتمدة على التركيز كما هو موضح في الشكل (1)، مما سمح بحساب قيمة EC_{50}.

بالنسبة للآلية المحتملة، قدمت العديد من الأبحاث الدلائل على أن المركبات عديدة الفينول قادرة على تثبيط فعالية العديد من الأنزيمات بما فيها أنزيمات السيرين بروتياز [6]، وبما أنه تم اختبار المحاليل على زمن البروترومبين وأدت إلى تطاوله، فإنه من المحتمل أن يكون التأثير عائد للمركبات الفينولية الموجودة فيها على واحد أو أكثر من عوامل السبيل الخارجي والمشترك لشلال التخثر: الثاني، الخامس، السابع، والعاشر، بالإضافة إلى الفيبرينوجين.

توافقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسة Pawlaczyk وزملائه التي اختبرت التأثير المضاد للتخثر للمستخلص القلوي لنبات الفراولة البرية *Fragaria vesca* من الفصيلة الوردية *Rosaceae* الغني بالمركبات الفينولية السكرية المقترنة phenolic glycoconjugates وذات المحتوى العالي من Hexuronic acids وأظهرت فعالية في الزجاج من

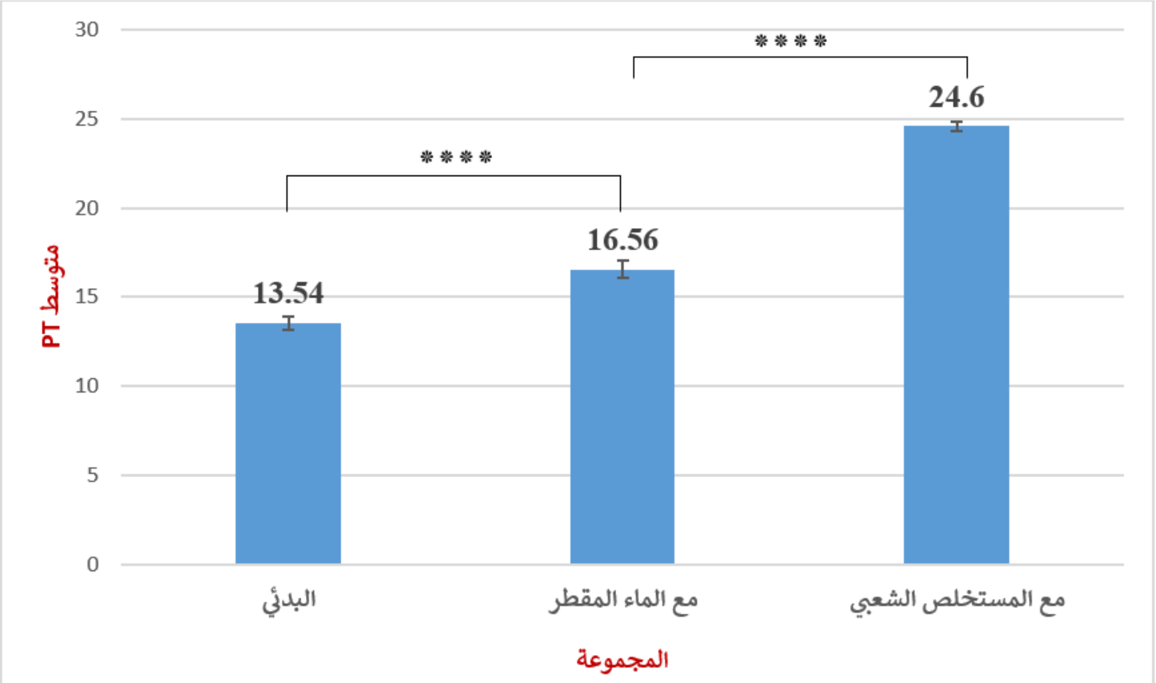
خلال إحداث تطاول معنوي في زمن البروترومبين وبشكل معتمد على التركيز، حيث طاولت المستخلصات ذات التراكيز (100 – 200 – 390 – 780 – 1560 – 3130 مكغ/مل) زمن البروترومبين حتى أصبح (13.4 – 14.2 – 15.5 – 18.0 – 25.0 – 67.8 ثانية) على التوالي مقارنةً مع الشاهد (13.0 ثانية) [18]. مع الأخذ بالاعتبار اختلاف النبات على الرغم من توافق الفصيلة، وكذلك اختلاف طريقة الاستخلاص.

توافقت نتائج دراستنا أيضاً مع نتائج بحث Bijak وزملائه على كل من المستخلصات التجارية المذابة في DMSO 50% لبذور العنب *Vitis vinifera* من الفصيلة العنبية *Vitaceae* (الغنية بالفلافانولات flavanols) والأرونية السوداء *Aronia melanocarpa* المعروفة باسم Black chokeberry من الفصيلة الوردية *Rosaceae* (الغنية بالمركبات الفينولية التالية: أحماض هيدروكسي سيناميك والأنتوسيانينات والفلافونولات flavonols والفلافانولات flavanols)، حيث طاولت مستخلصات بذور العنب بتراكيز 5 و50 مكغ/مل زمن البروترومبين حتى أصبح 18.1 و21.8 ثانية على التوالي مقارنةً مع الشاهد (16.1 ثا)، بينما طاولت مستخلصات الأرونية السوداء بنفس التراكيز 5 و50 مكغ/مل زمن البروترومبين حتى أصبح 17.9 و20.6 ثانية مقارنةً مع نفس الشاهد. في سياق تحليل الآلية المحتملة لهذه التأثيرات وجدت الدراسة أن عديدات الفينول الموجودة في هذه المستخلصات (الفلافانولات والأنتوسيانينات) تعمل كمثبطات مباشرة للترومبين بطريقة معتمدة على التركيز [19]، وبالتالي من الممكن احتواء المستخلصات في دراستنا على مكونات مشابهة قد تكون مسؤولة عن الفعالية المضادة للتخثر وبآلية مماثلة، آخذين بالاعتبار مرة أخرى اختلاف النباتات واختلاف أسلوب الاستخلاص.

يوضح الجدول (2) والشكل (2) نتائج اختبار زمن البروترومبين مع مستخلص الاستخدام الشعبي المختبر على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء.

الجدول (2): متوسطات قيم زمن البروترومبين (بالثواني) مع مستخلص الاستخدام الشعبي المختبر على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء في الزجاج مقارنةً مع الماء المقطر والزمن البدئي

العينة / المجموعة	متوسط PT العينة 1	متوسط PT العينة 2	متوسط PT العينة 3	متوسط PT العينة 4	متوسط PT العينة 5	المتوسط النهائي	SEM
البدئي	13.1	14.8	13	12.8	14	13.54	0.376298
الماء المقطر	15.9	18.3	15.9	16	16.7	16.56	0.46
المستخلص الشعبي	24.2	25.4	24	24.5	24.9	24.6	0.250998



الشكل (2): متوسطات قيم زمن البروترومبين (بالثواني) مع مستخلص الاستخدام الشعبي المختبر على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء في الزجاج مقارنةً مع الماء المقطر والزمن البدئي، وتم اعتبار الفرق هام إحصائياً (*) في حال كانت p أصغر من 0.05

سبب مستخلص الاستخدام الشعبي زيادة في زمن البروترومبين بشكل هام إحصائياً بالمقارنة مع الماء المقطر، حيث بلغ متوسط زمن البروترومبين مع المستخلص (24.6 ثا) بتطاول مقداره (8.04 ثا) بالمقارنة مع الماء المقطر (16.56 ثا). نلاحظ أن مستخلص الاستخدام الشعبي (1120 مكغ/مل) زاد زمن البروترومبين بقيمة قريبة جداً من القيمة التي ازداد بها زمن البروترومبين مع المحلول ذو التركيز 1000 مكغ/مل المحضّر بدءاً من محلول البقية المجفدة.

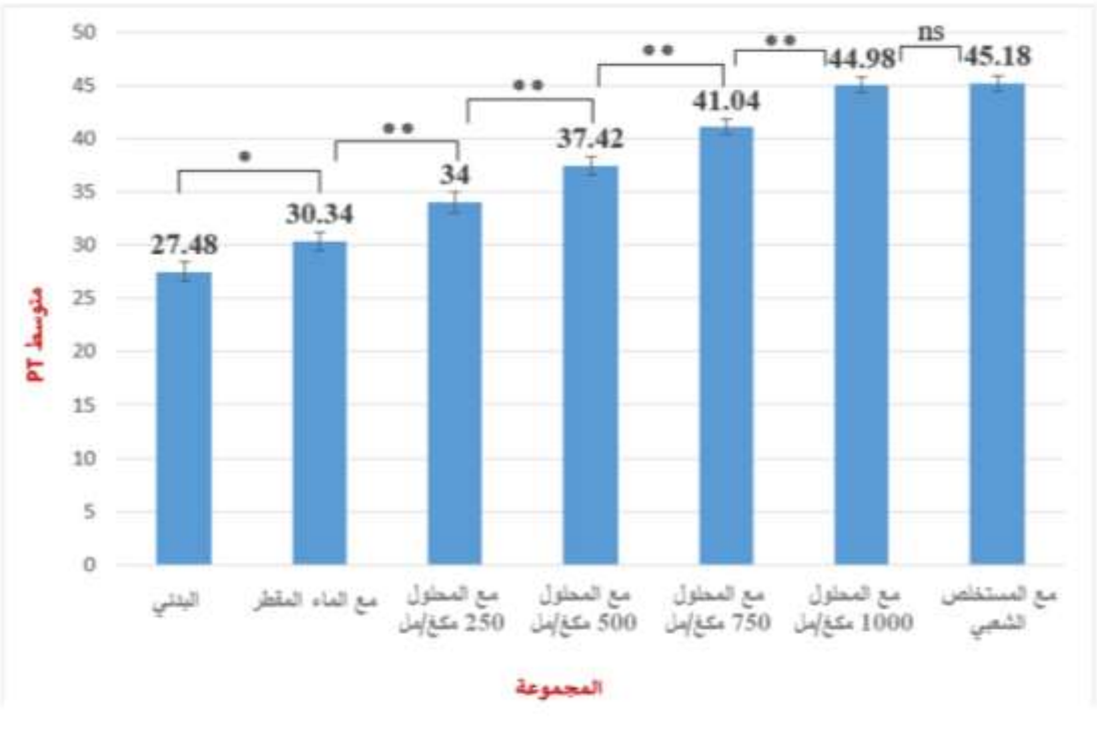
- **الدراسة على بلاسما مأخوذة من مرضى معالجين بالوارفارين:**

يوضح الجدول (3) والشكل (3) نتائج اختبار زمن البروترومبين مع المحاليل ذات التراكيز المختلفة من المركبات الفينولية المحضّرة بدءاً من محلول البقية المجفدة وكذلك مستخلص الاستخدام الشعبي عند اختبارها على بلاسما مأخوذة من مرضى معالجين بالوارفارين، علماً أن أعلى قيمة يعطيها الجهاز لزمن البروترومبين هي 70 ثانية.

الجدول (3): متوسطات قيم زمن البروترومبين (بالثواني) مع المحاليل ذات التراكيز المختلفة ومستخلص الاستخدام الشعبي المختبرة على بلاسما مأخوذة من مرضى معالجين بالوارفارين في الزجاج مقارنةً مع الماء المقطر والزمن البدئي

العينة / المجموعة	متوسط PT العينة 1	متوسط PT العينة 2	متوسط PT العينة 3	متوسط PT العينة 4	متوسط PT العينة 5	المتوسط النهائي	SEM
البدئي	28.4	25	27.3	30.3	26.4	27.48	0.898554
الماء المقطر	31.7	28.1	29.6	33.1	29.2	30.34	0.903659

250 مكغ/مل	34.6	31.9	34.2	37.2	32.1	34.00	0.965919
500 مكغ/مل	38.8	35.3	37.5	40	35.5	37.42	0.915096
750 مكغ/مل	42.4	39.4	40.9	43	39.5	41.04	0.733894
1000 مكغ/مل	46.6	43.8	44.5	46.8	43.2	44.98	0.732393
1500 مكغ/مل	70 <	70 <	70 <	70 <	70 <	70 <	0
2000 مكغ/مل	70 <	70 <	70 <	70 <	70 <	70 <	0
المستخلص الشعبي 1120 مكغ/مل	46.9	44.2	44.3	47.1	43.4	45.18	0.759868



الشكل (3): متوسطات قيم زمن البروترومبين (بالثواني) مع المحاليل ذات التراكيز المختلفة ومستخلص الاستخدام الشعبي المختبرة على بلاسما مأخوذة من مرضى معالجين بالوارفارين في الزجاج مقارنةً مع الماء المقطر والزمن البدئي، وتم اعتبار الفرق هام إحصائياً (*) في حال كانت p أصغر من 0.05

نلاحظ زيادة هامة إحصائياً في زمن البروترومبين عند إضافة الماء المقطر (الناصع) (30.34 ثا) بالمقارنة مع الزمن البدئي الذي تم قياسه دون أية إضافات (27.48 ثا)، وعلى هذا الأساس تمت مقارنة المحاليل ذات التراكيز المختلفة مع الماء المقطر، وكانت النتيجة تطاول زمن البروترومبين بشكل هام إحصائياً مع جميع التراكيز بما فيها مستخلص

الاستخدام الشعبي، حيث كان متوسط زمن البروترومبين مع المحلول ذو التركيز 250 مكغ/مل (34.00 ثا) بتطاول مقداره (3.66 ثا) بالمقارنة مع الماء المقطر، بينما بلغ متوسط زمن البروترومبين (37.42 ثا) مع المحلول ذو التركيز 500 مكغ/مل بتطاول مقداره (7.08 ثا) بالمقارنة مع الماء المقطر. مع المحلول ذو التركيز 750 مكغ/مل والمحلول ذو التركيز 1000 مكغ/مل كان متوسط زمن البروترومبين مساوٍ إلى (41.04 ثا، 44.98 ثا) بمقدار تطاول (10.7 ثا، 14.64 ثا) على الترتيب مقارنةً مع الماء المقطر، فيما بلغ متوسط زمن البروترومبين مع مستخلص الاستخدام الشعبي ذو التركيز 1120 مكغ/مل (45.18 ثا) بمقدار تطاول (14.84 ثا) مقارنةً مع الماء المقطر. أخيراً زادت التراكيز 1500 و2000 مكغ/مل زمن البروترومبين حتى تجاوز 70 ثانية (أعلى قيمة يعطيها الجهاز).

كانت الزيادة في زمن البروترومبين معتمدة على التركيز، كما هو موضح في الشكل (3)، مما سمح بحساب قيمة EC_{50}. تشير هذه النتائج إلى أن الاستخدام المتزامن لكل من مستخلص الوردة الدمشقية والوارفارين ربما يؤدي إلى زيادة ممكنة في خطر النزف [20]، مما يفتح الباب للبحث أكثر في هذا الموضوع، خصوصاً وأنه لم نجد أي دراسة في الأدب الطبي تبحث في التأثير المضاد للتخثر للمستخلصات النباتية الغنية بالمواد الفينولية في الزجاج باستخدام بلاسما من مرضى معالجين الوارفارين.

لم يكن هناك فرق هام إحصائياً بين زمن البروترومبين مع مستخلص الاستخدام الشعبي والمحلول ذو التركيز 1000 مكغ/مل، يمكن تفسير ذلك بإمكانية تواجد نوعية المركبات الفينولية ذاتها في المستخلصين على الرغم من اختلاف طريقة الاستخلاص، حيث حصلنا على نفس النتيجة مع ملاحظة أن التراكيز متقاربة جداً.

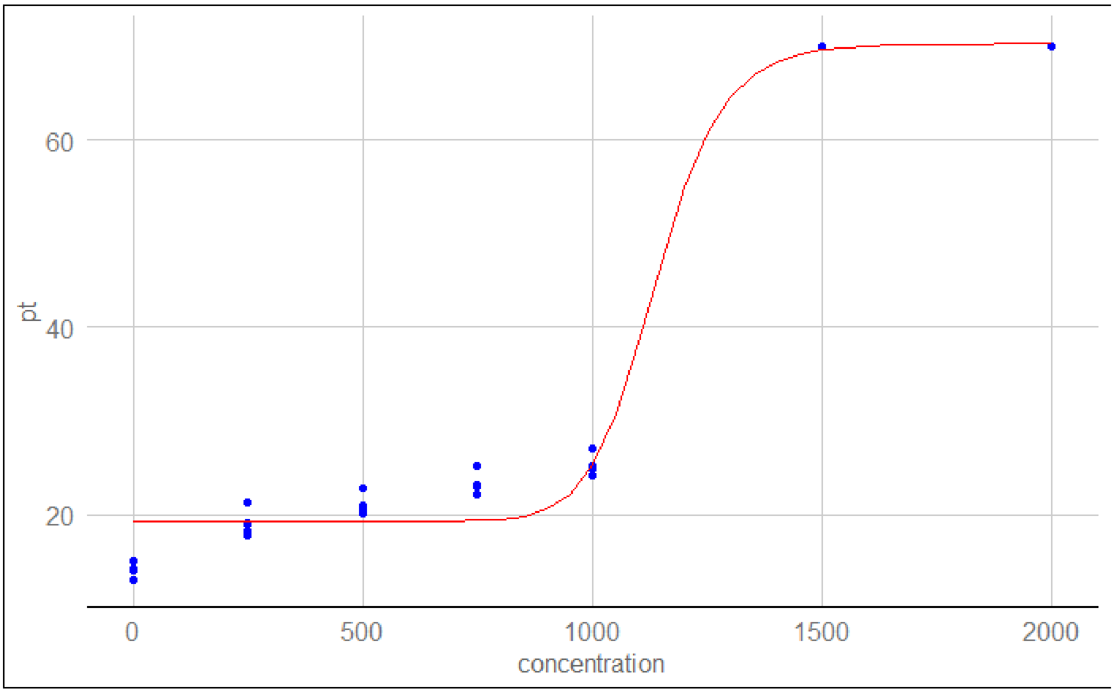
3- حساب قيم EC50 (التركيز اللازم لتحقيق 50% من الاستجابة):

- **حساب قيمة EC50 للمحاليل ذات التراكيز المختلفة المختبرة على بلاسما مأخوذة من أشخاص أصحّاء:**

عبر إدخال بيانات التراكيز وقيم زمن البروترومبين ضمن نموذج لوجيستي رباعي المتغيرات، وتضمنت هذه المتغيرات (الحد الأدنى، الحد الأعلى، ميل المنحني، EC50) للوصول إلى EC50، حصلنا على النموذج التالي:

slope:(Intercept)	-15.5045
lower:(Intercept)	5.426607
upper:(Intercept)	56.52361
EC50:(Intercept)	1137.354

ويمثل الشكل (4) المنحني تركيز – استجابة للنموذج السابق.



الشكل (4): المنحني تركيز – استجابة في التجربة التي تمت على بلاسما الأصحاء

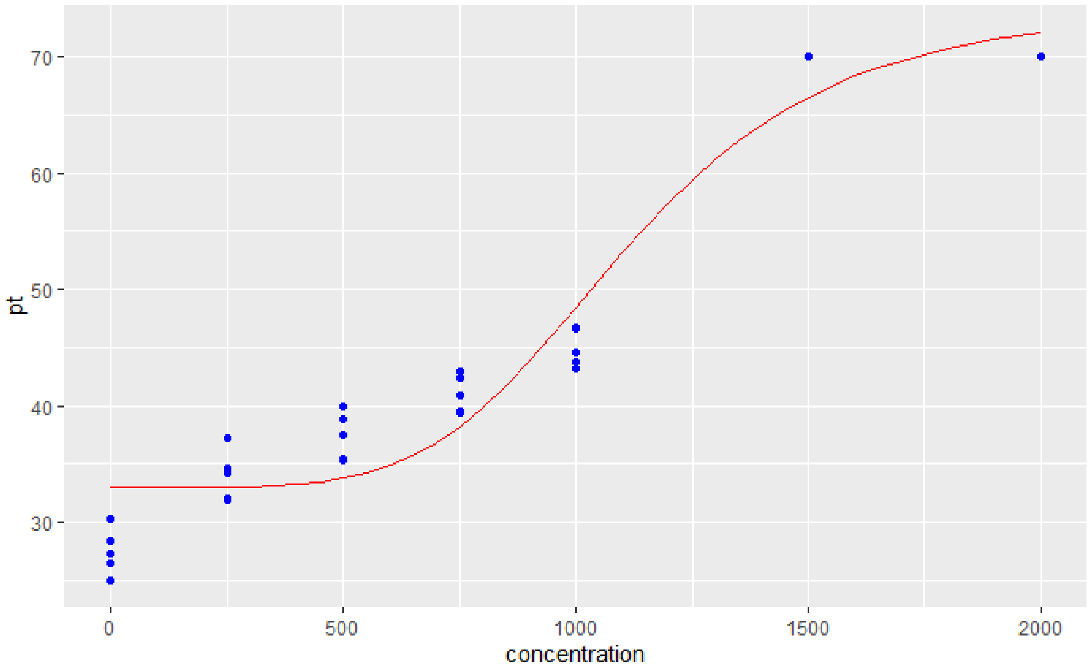
كانت قيمة EC50 وبالتالي التركيز اللازم لتحقيق 50% من الاستجابة (زيادة زمن البروترومبين) بالتجربة على بلاسما الأصحاء تساوي 1137.354 مكغ/مل وهي قريبة من تركيز مستخلص الاستخدام الشعبي، وبالتالي، فإن تناول كأس بحجم 200 مل من مستخلص بتلات الوردة الدمشقية بطريقة الاستخدام الشعبي من المحتمل أن يؤدي إلى تأثير مضاد للتخثر جيّد (في حال كان التوافر الحيوي للمركبات الفينولية المتواجدة فيه جيداً)، مما يشير إلى ضرورة إجراء دراسات على التوافر الحيوي مستقبلاً.

- **حساب قيمة EC50 للمحاليل ذات التراكيز المختلفة المختبرة على بلاسما مأخوذة من مرضى معالجين بالوارفارين:**

عبر إدخال بيانات التراكيز وقيم زمن البروترومبين ضمن نموذج لوجيستي رباعي المتغيرات، وتضمنت هذه المتغيرات (الحد الأدنى، الحد الأعلى، ميل المنحني، EC50) للوصول إلى EC50 حصلنا على النموذج التالي:

slope:(Intercept)	-4.894918
lower:(Intercept)	32.941805
upper:(Intercept)	74.258207
EC50:(Intercept)	1110.37447

ويمثل الشكل (5) المنحني تركيز – استجابة للنموذج السابق.



الشكل (5): المنحني تركيز – استجابة في التجربة التي تمت على بلاسما مرضى الوارفارين

وجدت الدراسة الحالية أن قيمة EC50 وبالتالي التركيز اللازم لتحقيق 50% من الاستجابة (زيادة زمن البروترومبين) بالتجربة على بلاسما مرضى الوارفارين تساوي 1110.37447 مكغ/مل وهي قيمة أقل من قيمة EC50 المحسوبة في التجربة على بلاسما الأصحّاء، مما يشير أيضاً إلى إمكانية حدوث تآزر بين مركبات الوردة الدمشقية والوارفارين.

الاستنتاجات والتوصيات:

- **الاستنتاجات**

➢ بلغ محتوى المواد الفينولية في محلول البقية المجفدة الناتجة عن الاستخلاص بالطريقة الأولى 32.23 غ/ل، أما مع مستخلص الاستخدام الشعبي فبلغ 1.120 غ/ل.

➢ أظهرت المحاليل ذات التراكيز المختلفة المحضرة من محلول البقية المجفدة زيادة هامة إحصائياً في زمن البروترومبين مقارنةً مع الماء المقطر (الناصع) ومعتمدة على التركيز عند اختبارها على بلاسما الأصحاء، بلغت أقصاها مع التراكيز 1500 و2000 مكغ/مل (أكثر من 70 ثانية) وأدناها مع التركيز 250 مكغ/مل (19.04 ثانية).

➢ أظهر مستخلص الاستخدام الشعبي أيضاً زيادة هامة إحصائياً في زمن البروترومبين مقارنةً مع الماء المقطر، وبالتالي نستنتج أنه من المحتمل أن يؤدي تناول كأس بحجم 200 مل من مستخلص بتلات الوردة الدمشقية بطريقة الاستخدام الشعبي إلى تأثير مضاد للتخثر جيّد (في حال كان التوافر الحيوي للمركبات الفينولية المتواجدة فيه جيداً).

➢ أظهرت المحاليل ذات التراكيز المختلفة المحضرة من محلول البقية المجفدة وكذلك مستخلص الاستخدام الشعبي زيادة هامة إحصائياً في زمن البروترومبين مقارنةً مع الماء المقطر (الناصع) ومعتمدة على التركيز عند

اختبارها على بلاسما مرضى الوارفارين، بلغت أقصاها مع التراكيز 1500 و2000 مكغ/مل (أكثر من 70 ثانية) وأدناها مع التركيز 250 مكغ/مل (34 ثانية)، وكانت قيمة EC_{50} المحسوبة في التجربة على بلاسما مرضى الوارفارين (1110.374 مكغ/مل) أقل من قيمة EC_{50} المحسوبة في التجربة على بلاسما الأصحاء (1137.354 مكغ/مل)، مما يشير إلى زيادة ممكنة في خطر النزف للاستخدام المتزامن لمستخلص الوردة الدمشقية والوارفارين.

- **التوصيات:**

➢ دراسة التأثير المضاد للتخثر لمستخلصات الوردة الدمشقية *In vivo* لدى البشر.

➢ دراسة تأثير مستخلصات الوردة في الزجاج على زمن الترومبوبلاستين الجزئي المفعّل وعلى تكدس الصفيحات لمعرفة التأثيرات الأخرى المحتملة للوردة على عملية التخثر، خصوصاً مع افتقاد الأدبيات الطبيّة بالكامل حول هذا الموضوع.

➢ إمكانية استخدام الوردة الدمشقية للوقاية من الحوادث الخثارية لذوي عوامل الخطورة، في حال إثبات تأثيرها لدى البشر، سيما وأنّ نتائجنا يمكن أن تتنبأ بأن يكون مستخلص الاستخدام الشعبي من الخيارات المناسبة لدى هذه الفئة.

➢ تحذير مرضى النزوف والمرضى المعالجين بالوارفارين من إمكانية زيادة مستخلصات الوردة الدمشقية لخطر النزف في حال إثبات تأثيرها لدى البشر .

References

1. Katzung, B.G. and B. Susan, *Masters, and Anthony J. Trevor.* Basic & clinical pharmacology. 15th ed. ed, 2012.
2. Van Hooser, J.C., et al., *Knowledge of heart attack and stroke symptoms among US Native American Adults: a cross-sectional population-based study analyzing a multi-year BRFSS database.* BMC Public Health, 2020. **20**(1): p. 40.
3. Ignjatovic, V., *Prothrombin Time/International Normalized Ratio*, in *Haemostasis: Methods and Protocols*, P. Monagle, Editor. 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 121-129.
4. Taj Eldin IM, et al., *An in vitro anticoagulant effect of aqueous extract of ginger (Zingiber officinale) rhizomes in blood samples of normal individuals.* American Journal of Research Communication, 2016. **4**(1): p. 113-121.
5. Brunton, L.L., R. Hilal-Dandan, and B.C. Knollmann, *Preface*, in *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 13e*. 2017, McGraw-Hill Education: New York, NY.
6. Bijak, M., et al., *Popular naturally occurring antioxidants as potential anticoagulant drugs.* Chemico-Biological Interactions, 2016. **257**: p. 35-45.
7. Jarial, R., et al., *Potent anticancer, antioxidant and antibacterial activities of isolated flavonoids from Asplenium nidus.* Journal of King Saud University-Science, 2018. **30**(2): p. 185-192.
8. Alsalti, A.A., N. Hasan, and D. Dyab, *In-vitro and In-vivo hypoglycemic efficacy of Rosa damascena petals extracts.* Bulletin of Pharmaceutical Sciences. Assiut, 2022.
9. Al-Diab, D., N. Hasan, and A. Nezam, *Using Albumin Denaturation Inhibition Method to Determine the Anti-Inflammatory Activity of Phenolic Compounds in Some Locally Available Fruit Juices.* Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series, 2021.
10. Al-Diab, D. and N. Al-As'aad, *Determination of Phenolic Compounds Levels and Their Antioxidant Activity in Some Local Functional Juices.* Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series, 2015.

11. Hmidani, A., et al., *Antioxidant, anti-inflammatory and anticoagulant activities of three Thymus species grown in southeastern Morocco.* Future journal of pharmaceutical sciences, 2019. **5**(1): p. 1-6.
12. Nassour , M., Mahfoud , H., & Redwan , T., *Micropropagation of some Damask Roses genotypes (Rosa damascena Mill.) dispersed in Lattakia.* Tishreen University Journal -Biological Sciences Series, 42(3). 2020.
13. Labban, L. and N. Thallaj, *The medicinal and pharmacological properties of Damascene Rose (Rosa damascena): A review.* Int. J. Herb. Med, 2020. **8**: p. 33-37.
14. Akram, M., et al., *Chemical constituents, experimental and clinical pharmacology of Rosa damascena: a literature review.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019. **72**(2): p. 161-174.
15. Al-Diab, D. and S. Nasser, *Study of Some Affecting Factors on Phenolic Compounds Levels and Their Antioxidant Activity in Some Functional Juices.* Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series, 2018.
16. Sun, W.Y., et al., *Prothrombin Carora: hypoprothrombinaemia caused by substitution of Tyr-44 by Cys.* British journal of haematology, 1999. **105**(3): p. 670-672.
17. Singh, A., et al., *The reciprocal EC(50) value as a convenient measure of the potency of a compound in bioactivity-guided purification of natural products.* Fitoterapia, 2020. **143**: p. 104598.
18. Pawlaczyk, I., et al., *Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity.* Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(3): p. 568-575.
19. Bijak, M., et al., *Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds.* Fitoterapia, 2011. **82**(6): p. 811-817.
20. Leite, P.M., et al., *Mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy: An updated review.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **143**: p. 112103.