In vitro study of the anticoagulant efficacy of lemon verbena and lemongrass extracts

Dr. Nouma Hasan*

(Received 20 / 6 / 2024. Accepted 19 / 8 / 2024)

□ ABSTRACT □

Aloysia citrodora or Lemon verbena is a plant rich in phenolic compounds, and exhibits lots of medical properties, such as antioxidant, antimicrobial, sedative, narcotic and anxiolytic properties. Andropogon citrates or Lemongrass is used as a traditional remedy in folk medicine to treat many diseases such as digestive disorders, cough, and others. It is known for its antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal effects, due to its content of phenolic compounds. The anticoagulant effect of the two mentioned plants has not yet been studied, although phenols have a known anticoagulant activity.

This study aimed to investigate the in vitro anticoagulant activity of aqueous extracts of Lemon verbena and Lemongrass by testing their effect on prothrombin time using plasma from healthy individuals and comparing the efficacy of both plants.

Aqueous extracts of the two plants were prepared and the total phenolic content TPC was determined. The TPC in lemon verbena extract was 10.825 g $_{GAE}$ /l and 8.235 g $_{GAE}$ /l in lemongrass extract. Different concentrations were prepared to investigate their effect on prothrombin time. The studied concentrations of lemon verbena showed a significant increase in prothrombin time compared to distilled water and the effect was concentration dependent. Also, the increasing concentrations of lemongrass showed an increase in PT but the difference was not significant at all studied points. The results indicate that the two extracts have anticoagulant activity in vitro due to their content of phenolic compounds with a superior effect of lemon verbena.

Keywords: Anticoagulant activity, lemongrass, verbena, prothrombin time.

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.**

دراسة الفعالية المضادة للتخثر لمستخلصي اللويزية وحشيشة الليمون في الزجاج

د. نعمى حسن*

(تاريخ الإيداع 20 / 6 / 2024. قبل للنشر في 19 / 8 / 2024)

□ ملخّص □

تعد اللويزية Aloysia citrodora أو Lemon verbena نباتاً غنياً بالمركبات الفينولية، وتمتلك العديد من الخصائص الطبية، كالخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات والمهدئة والمخدرة والمزيلة للقلق. يستخدم نبات حشيشة الليمون Andropogon citrates أو Lemongrass كعلاج تقليدي في الطب الشعبي لعلاج العديد من الأمراض كالاضطرابات الهضمية والسعال وغيرها وعرف بفعاليته المضادة للأكسدة والالتهاب والمضادة للبكتيريا وللفطريات، نظراً لاحتوائه أيضاً على المركبات الفينولية. لم تتم حتى الآن دراسة الفعالية المضادة للتخثر للنباتين المذكورين بالرغم من امتلاك الفنولات فعالية مضادة للتخثر معروفة.

هدفت هذه الدراسة إلى تقصي الفعالية المضادة للتخثر للمستخلصات المائية لنباتي اللويزية وحشيشة الليمون عبر اختبار تأثيرها على زمن البروترومبين في الزجاج باستخدام بلاسما من أشخاص أصحاء ومقارنة هذه الفعالية بين النباتين.

تم تحضير مستخلص مائي من النباتين بطريقة النقع وقياس تركيز المركبات الفنولية. بلغ محتوى المواد الفينولية في مستخلص اللويزية l/ $_{GAE}$ g 10.825 وفي مستخلص حشيشة الليمون l/ $_{GAE}$ g 8.235. تم تحضير عدة محاليل بتراكيز مختلفة انطلاقاً من الخلاصات الأم لتقصي تأثيرها على زمن البروترومبين. أظهرت التراكيز المدروسة للويزية زيادة معنوية في زمن البروترومبين مقارنةً بالماء المقطر وكان التأثير معتمداً على التركيز. كما وأبدت التراكيز المتزايدة من حشيشة الليمون زيادة في PT ولكن لم يكن الفرق معنوياً في جميع النقاط المدروسة. تشير النتائج إلى امتلاك الخلاصتين فعالية مضادة للتخثر في الزجاج تعود لاحتوائهما على المركبات الفنولية مع تفوق اللويزية في التأثير.

الكلمات المفتاحية: الفعالية المضادة للتخثر، حشيشة الليمون، اللويزية، زمن البروترومبين.

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

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

مقدمة:

تخثر الدم هو عملية معقدة تضمن الحفاظ على تدفق الدم في ظل الظروف الفيزيولوجية الطبيعية وتمنع فقدان الدم بشكل كبير بعد إصابة الأوعية الدموية. تعتمد الاستجابة الطبيعية لتخثر الدم على التفاعل الوثيق بين الصفيحات الدموية والخلايا البطانية في جدار الأوعية الدموية وعوامل تخثر الدم. بعد إصابة الأوعية الدموية، تنقبض جدران الأوعية الدموية على الفور لإبطاء تدفق الدم إلى موقع الإصابة ومنع استنزاف الدم. وينكشف الكولاجين ويتلامس مع الدم المتدفق مما يؤدي إلى تراكم وتنشيط الصفيحات الدموية في موقع تلف جدار الوعاء الدموي وتكوين سدادة الصفيحات الدموية وهذا ما يدعى بالإرقاء الأولي. أما الإرقاء الثانوي فيتضمن تفعيل عوامل التخثر ويعرف على أنه تحول الفيبرينوجين إلى فيبرين وتكون خثرة الفيبرين الصلبة وغير القابلة للذوبان [1]. توجد ثلاثة مسارات لتفعيل شلال التخثر: داخلية وخارجية ومشتركة. يبدأ تنشيط المسار الخارجي بتفعيل العامل النسيجي TF الذي يرتبط بالعامل السابع المفعل VIIa والكالسيوم لتعزيز تحويل العامل العاشر X إلى عامل عاشر مفعل Xa . يستجيب المسار الداخلي للضرر الداخلي التلقائي للبطانة الوعائية ويبدأ بالعامل الثاني عشر XII ،ويتضمن تنشيط العامل الحادي عشر XI والعامل التاسع IX والذي يعمل بعد ذلك مع العامل الثامن على تنشيط العامل العاشر. يلتقي المساران الداخلي والخارجي في نقطة مشتركة لمواصلة عملية التخثر، فيما يسمى بالمسار المشترك، حيث يشكل العامل العاشر المفعل Xa مع العامل الخامس Va والدهون الفوسفاتية في الأنسجة، والدهون الفوسفاتية في الصفيحات الدموية والكالسيوم معقد البروثرومبيناز الذي يحول البروثرومبين إلى ثرومبين. يقوم هذا الثرومبين بتحويل الفيبرينوجين المنتشر إلى الفيبرين غير القابل للذوبان مما يؤدي إلى إنشاء شبكة الفيبرين التي تعمل على تثبيت الجلطة وتشكل سدادة تخثر الدم الثانوية النهائية [2]،[3].

يتم تقييم المسار الخارجي والمشترك لعملية التخثر من خلال قياس زمن البروثرومبين (PT)، وتتراوح قيم PT الطبيعية بين 11 و15 ثانية. يشير التطاول في PT إلى خطر النزيف [4]. في حين يستخدم زمن الثرومبوبلاستين الجزئي المنشط APTT لتقييم المسار الداخلي والمشترك [1].

في حين أن وجود آلية فعالة وسريعة لوقف النزيف أمر ضروري للبقاء على قيد الحياة، فمن المهم بنفس القدر أن يتم التحكم في هذه الآلية بإحكام، بحيث يتم منع تجلط الدم المرضي. يتم ذلك من خلال البروتينات المضادة للتخثر كالبروتين C والبروتين S ونظام انحلال الفيبرين [5].

يعرف التجلط بأنه حالة تتشكل فيها جلطة دموية في وعاء دموي سليم. يمكن أن يحدث في الشرايين كالسكتات الدماغية واحتشاء العضلة القلبية أو في الأوردة مسبباً الانسداد الرئوي أو تجلط الأوردة العميقة DVT، وتعتبر الحالتان من أهم أسباب الوفاة في العصر المعاصر، إذ تُصنَّف السكتة الدماغية باعتبارها ثاني أكبر سبب للوفاة في جميع أنحاء العالم بمعدل وفيات سنوي يبلغ حوالي 5.5 مليون [6] [7].

تستخدم العديد من مضادات التخثر في علاج أمراض التخثر. تشمل هذه الأدوية مثبطات تنشيط وتجمع الصفيحات الدموية، مثل الأسبرين والكلوبيدوغريل والبراسوغريل ومضادات عوامل التخثر كالوارفارين، والأدوية التي تمنع عمل عوامل التخثر الثاني II والعاشر X مثل الهيبارين والهيبارين منخفض الوزن الجزيئي. بالإضافة إلى الأدوية السابقة، يتم استخدام مضادات التخثر الجديدة الفموية مثل مثبطات الثرومبين المباشرة مثل دابيغاتران، وكذلك مثبطات العامل

العاشر المباشرة مثل ريفاروكسابان وأبيكسابان. إضافة إلى الأدوية الحالة للخثرة مثل الستربتوكيناز وألتيبلاز، مع الإشارة إلى أن كل دواء له مجموعة من الآثار الجانبية بالإضافة إلى خطر النزيف [8] .

تستمر الجهود في تطوير مضادات تخثر جديدة وتشكل النباتات الطبية مصدراً هاماً للعديد من المركبات ذات التأثيرات العلاجية وتأتي المركبات الفنولية المتواجدة كمركبات استقلاب ثانوية في العديد من النباتات في المقدمة لما لها من تأثيرات فارماكولوجية هامة كالتأثير المضاد للأكسدة [9] [10] [11] [12] والمضاد للجراثيم [13] [14] والخافض لسكر الدم [15] والمضاد للالتهاب [16] وقد تكون هذه المركبات مفيدة في إنشاء عوامل علاجية جديدة مضادة للتخثر أو أن تستخدم كمكملات غذائية تقي من خطر التجلط [17]. أثبتت العديد من الدراسات الفعالية المضادة للتخثر للمركبات الفنيولية كتلك المستخلصة من بتلات الوردة الدمشقية أو نبات الحبق أو المتة المشروب الشهير شعبياً في مجتمعنا [18] [19] [20].

يعد نبات اللويزية Aloysia citrodora المعروف أيضاً باسم نبات رعي الحمام الليموني Lemon verbena وشعبياً باسم المليسة الكاذبة الشكل (1) أحد أهم النباتات الحاوية على المركبات الفينولية حيث تم عزل العديد من الفلافونوئيات من مستخلصات النبات المائية والايتانولية والميتانولية يستخدم شعبياً لعلاج العديد من الأعراض كالاسهال والانتفاخ ولعلاج الأرق [21] [22]. وقد أثبتت الدراسات الخلوية وعلى حيوانات التجربة العديد من الخصائص الفارماكولوجية كالخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات والمهدئة والمخدرة والمزيلة للقلق [22].

وكذلك نبات عشبة الليمون Lemongrass المسمى علمياً Andropogon citrates الشكل (2) من النباتات الغنية بالفينولات فقد تم الابلاغ عن العديد من المكونات مثل مركبات الفلافونوئيد والمركبات الفينولية، والتي تتكون من اللوتولين، والإيزوورينتين 2–O–’رامنوسيد، والكيرسيتين، والكايمبفيرول، والأبيجينين. تشير الدراسات إلى أن النبات يمتلك أنشطة دوائية مختلفة كالخصائص المضادة للبكتيريا، والمضادة للإسهال، والمضادة للفطريات والمضادة للالتهابات والمضادة للسرطان والتأثير الايجابي على ميكروبيوم الأمعاء [23] [24] [25].

أما بالنسبة للتأثير المضاد للتخثر فلم يدرس لكلا النباتين على الرغم من احتوائهما نسبة عالية من المركبات الفينولية.

الشكل (1): (a) نبات اللويزية [26] و(b) الأوراق المجففة المستخدمة في البحث.

الشكل (2): (a) نبات حشيشة الليمون [27] و(b) الأوراق المجففة المستخدمة في البحث.

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

لا وجود لدراسات تستقصي الفعالية المضادة للتخثر للمستخلصات المائية لنبات اللويزية أو نبات عشبة الليمون، على الرغم من غناها بالمركبات الفينولية، وإذا تم إثبات هذه الفعالية، فقد يكون لهذين النباتين خصائص واقية من اضطرابات الخثار، خصوصاً مع شيوع استخدامها في بلادنا لوحدها أو مع منقوع المتة.

أهداف البحث:

تقصي فعالية المستخلصات المائية لنباتي اللويزية وعشبة الليمون المضادة للتخثر في الزجاج من خلال قياس زمن البروترومبين باستخدام عينات دم من أفراد أصحاء.

طرائق البحث ومواده:

1. المواد الكيميائية والمعدات والأجهزة المستخدمة:

حمض الغاليك Biotech LTD، كربونات الصوديوم BDH انكلترا، ماء مقطر حديثاً، كاشف Sigma Folin–Denis Aldrich سويسرا، كاشف PT من شركة BIOREX البريطانية (يتكون من خليط من أملاح الكالسيوم والعامل المنشط للأنسجة المستخلص من الأرانب)، يحاكي عامل تنشيط الأنسجة البشرية بنسبة مؤشر الحساسية الدولي ISI تبلغ 1.30.

أنابيب زجاجية، دورق حجمي، أوراق ترشيح وقمع الترشيح، حاويات معقمة لحفظ المستخلصات، محاقن لأخذ عينات الدم، أنابيب السيترات لجمع الدم، ماصات صغيرة بسعات مختلفة 100–10 / 1000–100 ميكرولتر.

ميزان حساسRADWAG AS 220/C/2، سخان كهربائي، مقياس الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية/البصريةDIAB SP UV 1100، جهاز الطرد المركزي الصغير المبرد عالي السرعة Scilogex d3024r c/w 24، خلاط كهربائي جهاز قياس زمن البروترومبين نصف الآلي (URIT).

2. المحاليل المستخدمة:

محلول كاشف Folin Denis الممدد

محلول كربونات الصوديوم 2%

المحلول الأم لحمض الغاليك 5 غ/ل: حضر بوزن 0.250 غ من حمض الغاليك وحلّها في القليل من الماء المقطّر ثم الإكمال بالماء المقطّر حتى خط العيار في بالون معايرة سعة 50 مل.

تحضير سلسلة عيارية من حمض الغاليك: حضرت 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.

3. جمع العينات النباتية والاستخلاص وتحضير محاليل الخلاصات:

تم جمع أوراق اللويزية وعشبة الليمون المزروعة محلياً وتجفيفها في غرفةٍ مهوّاة بعيداً عن الضوء وأشعة الشمس وبعدها طُحنت الأوراق الجافة في خلاطٍ منزلي للحصول على مساحيق ناعمة ووُضعت في عبوات عاتمة لحمايتها من الضوء. تم الاستخلاص باستخدام الماء المقطر بطريقة النقع. تم تسخين 1000 مل من الماء المقطر إلى درجة الغليان باستخدام سخان كهربائي، ثم تم نقع 10 غرام من مسحوق النباتين كل على حدى في 200 من الماء المقطر الساخن لمدة 5 دقائق. تم ترشيح المستخلصات وتخزينها في عبوات معقمة وأعطيت الرمز C4.

حضرت ثلاثة محاليل ابتداءً من الخلاصة الأم C4 لكلا النباتين وهي C1 بالتركيز g_{GAE}/l **1.5** وC2 بالتركيز g_{GAE}/l **3** وC3 بالتركيز g_{GAE}/l **5** .

4. تحديد المحتوى الفينولي الكلي في المستخلصات المحضرة:

لتحديد تركيز المركبات الفينولية في المستخلصات المحضرة، تم اتباع طريقة Folin–Ciocalteu التي وصفت من قبل [16] و [15]. باختصار، تمت إضافة 4 مل من محلول كربونات الصوديوم اللامائية 2% (وزن/حجم) إلى 0.2 مل من العينة، وتم خلطها جيداً وبعد 5 دقائق، تمت إضافة 0.2 مل من المحلول الممدد 1:1 لكاشف Folin–Ciocalteu. حضن المزيج في مكان مظلم لمدة 30 دقيقة. تم قياس امتصاصية المركب الأزرق المتكون باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 750 نانومتر. تم تحضير بلانك كما هو مذكور أعلاه باستخدام 0.2 مل من الماء المقطر بدلاً من العينات النباتية. تم تحضير سلسلة عيارية من حمض الغاليك بالتراكيز (0.1، 0.15، 0.2، 0.25، 0.3، 0.35) غ/ل وتم التعامل معها كما هو مذكور أعلاه.

تم حساب المحتوى الفينولي الكلي بناءً على السلسلة العيارية لحمض الغاليك. تم التعبير عن النتائج بعدد غرامات حمض الغاليك المكافئة للمركبات الفينولية الموجودة في ليتر من المستخلص (g_{GAE}/l).

5. جمع عينات الدم وتحضير البلازما الفقيرة بالصفيحات الدموية:

تم جمع عينات الدم من 7 متطوعين أصحاء، بمتوسط عمر 27 سنة، مع التأكد من معايير الاستبعاد التي تؤثر على قيم PT (كالتدخين، وتناول مضادات الالتهاب اللاستيروئيدية، وتناول مضادات التخثر، نقص فيتامين K، وأمراض الكبد).

سُحبت عينات الدم الوريدي على أنابيب سيترات الصوديوم من كل متطوع على حدى، ثفلت العينات لمدة 10 د 4000دروة/د، وحصلنا على البلازما الفقيرة بالصفيحات PPP، ثم تم جمع العينات في أنبوب واحد بعد المزج الجيد لمجانسة العينة والحصول على (جميعة مصل).

6. اختبار زمن البروترومبين (PT) في الزجاج

تم قياس زمن البروترومبين لجميعة المصل أولاً دون اضافات، ثم قيس بعد الحضن مع الماء المقطر لمعرفة تأثير التمديد (50 ميكرولتر بلازما +50 ميكرولتر ماء مقطر). بعد ذلك تم حضن 50 ميكرولتر من بلازما الجميعة مع الخلاصات المحضرة كل على حدة وذلك بإضافة 50 ميكرولتر من كل تركيز وقيس زمن البروترومبين، كانت مدة الحضن هي 70 ثانية عند الدرجة 37 مئوية. تمّ تطبيق الخطوات السابقة 3 مرات وأخذ متوسط القراءات.

7. الدراسة الإحصائية:

تم حساب كل من المتوسِّط الحسابي Mean والخطأ القياسي للمتوسط Standard error of the mean (SEM) لقيم PT المحسوبة لمجموعات الدراسة المختلفة إذ تم التعبير عن البيانات على الشكل (متوسط حسابي± الخطأ القياسي للمتوسط).

تم استخدام اختبار Kolmogorov–Smirnov للتأكد من التوزع الطبيعي للبيانات قبل استخدام الاختبارات المعلمية حيث تم البحث عن وجود فرق إحصائي هام بين مجموعات الدراسة بالنسبة للعامل المدروس عبر استخدام كل من الاختبارات التالية:

- اختبار Paired–T test: لدراسة الفرق في متوسط PT لدى المجموعة ذاتها قبل وبعد تطبيق المعالجة أو عند تطبيق المعالجة ذاتها من أجل تراكيز مختلفة
- اختبار Independent T Student لدراسة الفرق بين متوسطيّ مجموعتين مستقلتين من حيث العامل المدروس PT (نبات حشيشة الليمون مع نبات اللويزية)

تم استخدام برنامج اكسل لرسم المخططات البيانية بينما تم إجراء الاختبارات السابقة باستخدام برنامج IBMM SPSS Statistic 20 لمعالجة البيانات وتحليلها واعتبرت النتائج هامة احصائياً من أجل P–value <5%

النتائج والمناقشة:

1. تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية TPC:

تم حساب المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في المستخلصين بالاعتماد على المعادلة الخطية لسلسلة حمض الغاليك العيارية المذكورة سابقاً وفقاً لطريقة Folin–Ciocalteu.

كان TPC لمستخلص نبات اللويزية Aloysia citrodora معادلاً لـ 10.825 g_{GAE}/l أو ما يساوي 216 mg_{GAE}/g من الوزن الجاف) ويفوق TPC لمستخلص نبات حشيشة الليمون Andropogon Citratus الذي بلغ 8.235 g_{GAE}/l ما يساوي 164.7 mg_{GAE}/g من الوزن الجاف.

تشير العديد من الدراسات إلى احتواء الخلاصة المائية لنبات اللويزية على المركبات الفنولية وقد تقاربت قيم المحتوى الكلي من الفينولات للمستخلص في هذه الدراسة مع دراسة Polumackanycz و زملائه حيث بلغ TPC لديهم

193.49 (mg GE/g DW) [22]. تم الابلاغ من قبل ناصر الدين 2015 بأن المحتوى الفنولي لمستخلص النبات يتغير وفقاً لمرحلة نمو النبات [28].

أما بالنسبة لحشيشة الليمون فقد بلغ محتوى الفنولات في دراسة عام 2012 ما يعادل 67 mg GE/g [29] وهو ما اختلف عن دراستنا ربما بسبب اختلاف طريقة الاستخلاص أو لاختلاف مصدر النبات.

2- دراسة الفعالية المضادة للتخثر في الزجاج In Vitro:

- **دراسة فعالية مستخلص اللويزية**

تمت دراسة الفعالية المضادة للتخثر للمستخلصات المائية لأوراق اللويزية ذات التراكيز المختلفة وذلك من خلال اختبار زمن البروترومبين PT على بلاسما الأصحاء علماً أن أعلى قيمة يعطيها الجهاز لزمن البروترومبين هي 70 ثانية.

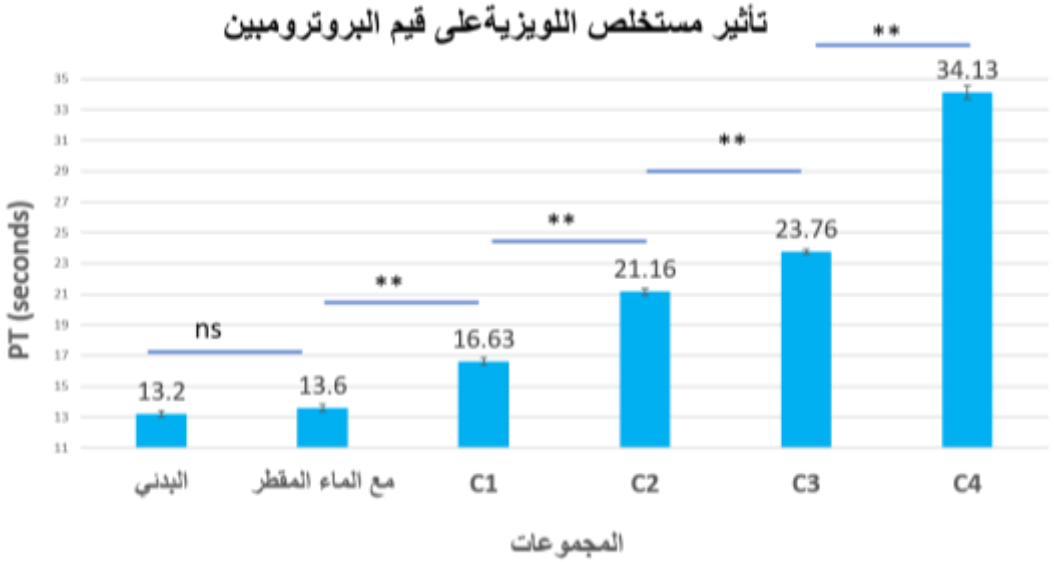
يوضح الجدول رقم (1) والشكل رقم (2) نتائج اختبار زمن البروترومبين مع الخلاصات ذات التراكيز المختلفة.

الجدول 1: تأثير تراكيز مختلفة من خلاصة اللويزية على زمن البروترومبين لعينات دم من أفراد أصحاء

	المتوسط (ثا)	SEM
PT الطبيعي	13.2	0.200
PT بعد إضافة الماء المقطر	13.6	0.230
PT مع C1	16.63	0.233
PT مع C2	21.16	0.218
PT مع C3	23.76	0.145
PT مع C4 (الخلاصة الأم)	43.13	0.437

سببت إضافة الماء المقطر إلى البلاسما المدروسة زيادة في زمن PT مقارنة مع الزمن المقاس للبلاسما الطبيعية (13.2 ثانية) ولكن بفارق غير مهم إحصائياً P= 0.074. على الرغم من أن هذه الزيادة في PT لم تكن معنوية إلا أن مقارنة تأثير التراكيز المختلفة على زمن البروترومبين تمت بالمقارنة مع القيم بعد إضافة الماء المقطر.

حققت الخلاصة C1 ذات التركيز 1.5 غ/ل متوسط قيم PT يعادل 16.63 ثانية وهو أكبر من PT المقاس بعد إضافة الماء المقطر (13.6 ثا) بتطاول قدره 3.03 ثا وبفارق مهم احصائياً P=0.004. أما التراكيز C2 وC3 وC4 فقد حققت متوسط قيم PT بمقدار (21.16 و23.76 و43.13 ثا) على الترتيب وبتطاولات قدرها (7.56 و10.16 و29.53 ثا) عن الماء المقطر. كانت هذه الزيادة في زمن البروترومبين متناسبة طردياً وبشكل معنوي مع ازدياد التركيز كما هو موضح في الشكل 3.



الشكل (3): متوسط قيم PT بعد إضافة مستخلصات نبات اللويزية بين مجموعات الدراسة

- **دراسة فعالية مستخلص حشيشة الليمون:**

تمت دراسة الفعالية المضادة للتخثر للمستخلصات المائية لأوراق حشيشة الليمون ذات التراكيز المختلفة وذلك من خلال اختبار زمن البروترومبين PT على بلاسما الأصحاء بشكل مماثل للإجراء المتبع مع نبات اللويزية.

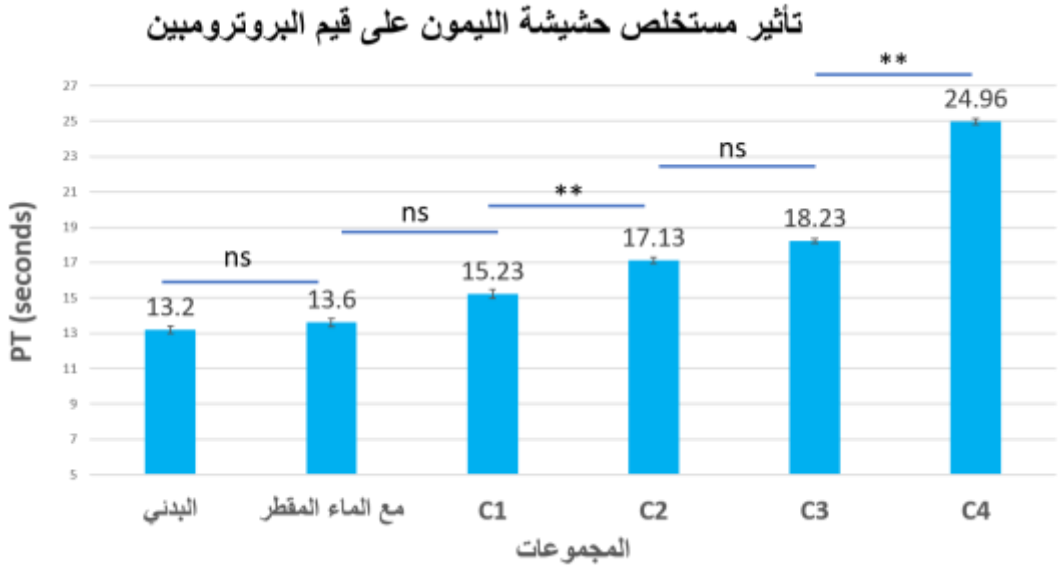
يوضح الجدول رقم (2) والشكل رقم (4) نتائج اختبار زمن البروترومبين مع خلاصات حشيشة الليمون ذات التراكيز المختلفة.

الجدول 2: تأثير تراكيز مختلفة من خلاصة حشيشة الليمون على زمن البروترومبين لعينات دم من أفراد أصحاء

	المتوسط (ثا)	SEM
PT الطبيعي	13.2	0.2000
PT بعد إضافة الماء المقطر	13.6	0.230
PT مع C1	15.23	0.260
PT مع C2	17.13	0.185
PT مع C3	18.23	0.120
PT مع C4 (الخلاصة الأم)	24.96	0.176

حققت الخلاصة C1 ذات التركيز 1.5 غ/ل متوسط قيم PT يعادل 15.23 ثانية وهو أكبر من PT المقاس بعد إضافة الماء المقطر (13.6 ثا) بتطاول قدره 1.63 ثا ولكن بفارق غير مهم احصائياً P>0.05. أما التراكيز C2 فقد سبب زيادة في قيم PT لتبلغ 17.13 ثا وبتطاول قدره 3.53 ثا عن الماء المقطر وبفارق مهم احصائياً P<0.05 عن قيم PT المقاسة مع C1. لم يختلف تأثير التركيز C3 احصائياً عن تأثير C2 (P>0.05) مع العلم أنه حقق تطاولاً قدره 4.63 ثا عن الماء المقطر. أما C4 أو الخلاصة الأم فقد حققت متوسط قيم PT بمقدار 24.96 ثا أعلى من التأثير المحقق مع C3 وبفارق مهم احصائياً (P<0.05) وبتطاول قدره 11.36 ثا عن الماء المقطر.

على الرغم من ذلك حققت التراكيز المختلفة من المستخلص زيادة في زمن البروترومبين عن الحد الأعلى الطبيعي المسموح به وذلك للتراكيز C2 و C3 و C4.



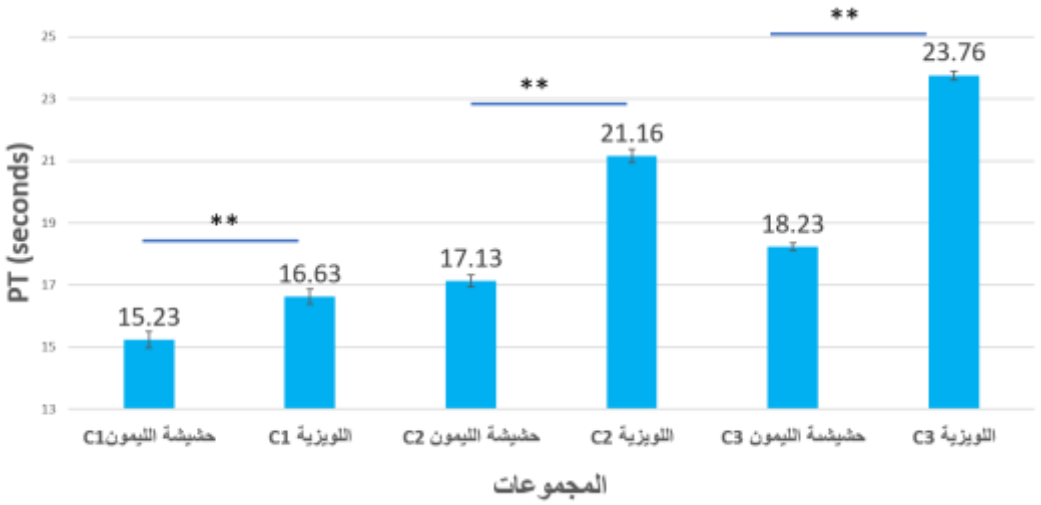
الشكل (4): متوسط قيم PT بعد إضافة مستخلصات نبات حشيشة الليمون بين مجموعات الدراسة

- **مقارنة الفعالية المضادة للتخثر لمستخلصات اللويزية وحشيشة الليمون:**

تم مقارنة المتوسط لحسابي لقيم PT المسجلة مع نبات اللويزية ونبات حشيشة الليمون من أجل التراكيز ذاتها C1 و C2 و C3 وحصلنا على النتائج الموضحة في الجدول 3 والشكل 5.

الجدول (3): مقارنة الفعالية المضادة للتخثر بين نبات حشيشة الليمون واللويزية

	المعالجة المطبقة	PT (seconds)		p-value
		المتوسط الحسابي	SEM	
C1	حشيشة الليمون	15.233	0.260	0.016
	نبات اللويزية	16.633	0.233	
C2	حشيشة الليمون	17.133	0.185	0.000
	نبات اللويزية	21.166	0.218	
C3	حشيشة الليمون	18.233	0.120	0.000
	نبات اللويزية	23.766	0.145	



الشكل (5): مقارنة الفعالية المضادة للتخثر لمستخلصات اللويزية وحشيشة الليمون بالتراكيز المدروسة.

كانت فعالية نبات اللويزية أعلى مقارنة مع فعالية نبات حشيشة الليمون من أجل كل من C1 وC2 وC3 وكان الفرق الاحصائي هاماً بين المجموعتين ($p<0.05$).

تشير النتائج التي حصلنا عليها إلى وجود فعالية مضادة للتخثر لنباتي اللويزية وحشيشة الليمون المستخدمين بكثرة كمغلي لوحدها أو مع مشروب المتة. قد تعود هذه الفعالية إلى محتوى هذه النباتات من المواد الفينولية بدليل ازدياد الفعالية بتزايد التركيز. ربما يعزى ذلك إلى قدرة المركبات الفنولية الموجودة في المستخلصات على تثبيط واحد أو أكثر من عوامل التخثر المشمولة في السبيل الخارجي أو المشترك كالعامل الثالث أو السابع أو العاشر بالإضافة إلى التورمبين.

تتوافق دراستنا مع العديد من الدراسات التي أجريت على نباتات غنية بالمواد الفنولية كدراسة الباحث علاء أحمد التي أجريت على المستخلص المائي لبتلات الوردة الدمشقية. أكدت هذه الدراسة امتلاك المركبات الفنولية الموجودة في الخلاصة فعالية مضادة للتخثر بدليل تطاول زمن البروترومبين وبشكل معتمد على التركيز [18]. وبشكل مماثل قامت الباحثة مسعودي بدراسة تأثير خلاصة أوراق الحبق الغنية بالفينولات على زمن البروترومبين على بلازما لأفراد أصحاء ومرضى يتناولون الوارفارين وخلصت الدراسة إلى امتلاك الخلاصة الغنية بالمواد الفنولية فعالية مضادة للتخثر وأشارت الباحثة إلى إمكانية تآزر هذا الفعل مع فعل الوارفارين المضاد للتخثر مما قد يجعل المرضى الذين يتناولون الوارفارين أمام خطر حدوث نزوفات لدى استهلاكهم مغلي الحبق. كما وأوضح البحث ذاته أن استهلاك منقوع الحبق مرتين يومياً ولمدة أسبوعين من قبل أشخاص أصحاء قد سبب تطاولاً في زمن البروترومبين بشكل مهم احصائياً [19].

يعرف المشروب الشعبي المتة باحتوائه على المركبات الفنولية [30] وقد أشارت الباحثة سعيد في دراستها إلى أن منقوع المتة يمتلك فعالية مضادة للتخثر ويسبب تطاولاً اضافياً في زمن البروترومبين لدى دراسته على بلاسما مرضى يتناولون الوارفارين ومن الممكن أن يسبب استهلاك المتة لدى هؤلاء إلى حدوث تداخل غذائي دوائي [20]. وبالنظر إلى الاستهلاك المتزامن لمنقوعي اللويزية وحشيشة الليمون مع المتة فمن الممكن حدوث تآزر وفعل إضافي مضاد للتخثر عند استهلاكهما معاً (وإن كان ذلك بكميات أقل ولكن بشكل متكرر) من قبل أصحاء أو مرضى يتناولون مضادات التخثر، مما يجعل هذه الدراسة نواة لدراسة لاحقة لتقصي التأثير التآزري للنباتين مع المتة.

ربما يعود التأثير المضاد للتخثر المتفوق للويزية على حشيشة الليمون إلى احتواء الخلاصة النباتية للويزية على عدد أكبر من المركبات ذات التأثيرات المضادة للتخثر أو أن المركبات الموجودة في المستخلص ذات فعالية أعلى في تثبيط عوامل التخثر من تلك الموجودة في مستخلص حشيشة الليمون.

الاستنتاجات والتوصيات:

- **الاستنتاجات**

- بلغ محتوى المواد الفينولية في مستخلص اللويزية 10.825 g_{GAE}/l أما مع مستخلص حشيشة الليمون فبلغ 8.235 g_{GAE}/l.
- سببت التراكيز المختلفة المحضرة من اللويزية زيادة معنوية في زمن البروترومبين مقارنةً بالماء المقطر ومعتمدة على التركيز أما التراكيز المختلفة المحضرة من حشيشة الليمون فقد سببت أيضاً زيادة في زمن البروترومبين مقارنةً بالماء المقطر غير أنها لم تكن هامة احصائياً في جميع النقاط المدروسة. من المحتمل أن يعزى هذا التأثير لوجود المركبات الفينولية وتأثيرها على عوامل التخثر.
- كانت فعالية تراكيز اللويزية في زيادة زمن البروترومبين أعلى بشكل هام احصائياً بالمقارنة مع التراكيز المقابلة لها من حشيشة الليمون مما يدعو إلى الاعتقاد بوجود مركبات إضافية في المستخلص المائي للويزية أو لاختلاف طبيعة المواد الفينولية الموجودة في المستخلصين وتأثيرها على زمن البروترومبين.

- **التوصيات:**

- دراسة تأثيرات مستخلصي اللويزية وحشيشة الليمون على زمن البروترومبين على بلاسما مرضى يتناولون الوارفارين لمعرفة إمكانية تآزر فعلها مع الوارفارين.
- دراسة تأثيرات مستخلصي النباتين على زمن البروترومبين على بلاسما مدخنين.
- دراسة تأثيرات مستخلصي النباتين على السبيل الداخلي للتخثر من خلال دراسة التأثير على زمن الترومبوبلاستين الجزئي المفعّل.
- اجراء دراسة حيوية على متطوعين أصحاء لتقييم الفعالية المضادة للتخثر في الجسم الحي.
- دراسة تأثيرات مستخلصي النباتين على زمن البروترومبين بالمشاركة مع المتة في الزجاج وفي الجسم الحي.
- تحديد المواد الفعالة ذات التأثير المضاد للتخثر في كل من مستخلص اللويزية ومستخلص حشيشة الليمون.

Reference:

.1 Abbas Zaidi, L.G., Physiology of haemostasis. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2019. **20**(3): p. 152-158.
.2 Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth, 2014. **58**(5): p. 515-23.
.3 Burns., W.B.T.B.B., Biochemistry, Clotting Factors. Jan 2024: StatPearls.
.4 Yang, R., M. Zubair, and L. Moosavi, Prothrombin Time, in StatPearls. 2024, StatPearls Publishing
Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies .

.5 Brunton ،L.L., R. Hilal-Dandan, and B.C. Knollmann, Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Thirteenth Edition ed. 2018.
.6 Wolberg, A.S., et al., Venous thrombosis. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15006.
.7 Donkor, E.S., Stroke in the 21(st) Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. Stroke Res Treat, 2018. **2018**: p. 3238165.
.8 Katzung's Basic & Clinical Pharmacology. Twelfth Edition ed. 2012: The McGraw-Hill Companies.
.9 N Al Asaad, D.A.D., 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. **37**.
.10 Diab, A.S.D.A.، تأثير خلاصات إكليل الجبل وخلاصات المردكوش على الثباتية التأكسدية خلال المعالجة الحرارية لزيت دوار الشمس. مجلة جامعة تشرين للعلوم الصحية، 2023. 45(1): 305-293 .p.
.11 ديمة الدياب، س.ن.، دراسة بعض العوامل المؤثرة على سويات المركبات الفينولية وفعاليتها المضادة للأكسدة في بعض العصائر الوظيفية. 2018. 40(5).
.12 Nour al Asaad, D.A.D., etermination of total antioxidant activity of fruit juices widely consumed in Syria. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2017. **10**.(4)
.13 Dima Al-Diab, N.D.، التأثير المضاد للجراثيم لخلاصة أوراق إكليل الجبل لزيادة فترة صلاحية لحوم الفروج. 2023. 45(3): 488-477 .p.
.14 Rafah Kaddar, N.H., Dima Al-diab, Antibacterial activity of Rosa damascene petals mill extracts. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2023. **16**.(11)
.15 Alsalti, A.A., N. Hasan, and D. Aldia, IN-VITRO AND IN-VIVO HYPOGLYCEMIC EFFICACY OF ROSA DAMASCENA PETALS EXTRACTS. Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University, 2022. **45**(2): p. 593-604.
.16 Akram Nizam, D.A., Nouma Hasan, In-Vitro Anti-inflammatory activity of Total Phenolic content of some fruit juices in Syria. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2021. **14**(7): p. 3685-3688.
.17 Michal Bijak Joanna Saluk, R.S.N., Popular naturally occurring antioxidants as potential anticoagulant drugs. Chemico-Biological Interactions, 2016: p. 3.45-5
.18 Alaa Ahmad, N.H., Dima Aldiab, Study of the anticoagulant activity of Rosa Damascena extract in vitro Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series, 2023. **45**
.19 Roset Masoudi, D.A., Nouma Hasan. , Study of the Anticoagulant effect of Ocimum basilicum extract. . Research Journal of Pharmacy and Technology, 2024. **17**(7): p. 3339-5.
.20 Karol Saeed, D.A.a.N.H., In vitro evaluation of the effect of Yerba Mate on Warfarin efficacy. WORLD JOURNAL OF ADVANCE HEALTHCARE RESEARCH, 2023. **7**(11): p. 50-55.
.21 Roodabeh Bahramsoltani, P.R., Zahra Shahpiri, André M. Marques, Roja Rahimi, Mohammad Hosein Farzae, Aloysia citrodora Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology, 2018. **222**: p. 34-51.
.22 Polumackanycz, M., et al., Chemical Composition and Antioxidant Properties of Common and Lemon Verbena. Antioxidants, 2022. **11**(11): p. 2247.
.23 Shah, G., et al., Scientific basis for the therapeutic use of Cymbopogon citratus, stapf (Lemon grass). J Adv Pharm Technol Res, 2011. **2**(1): p. 3-8.
.24 Mukarram, M., et al., Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities. Antioxidants (Basel), 2021. **11**.(1)

.25 Kiani, H.S., et al., Phytochemical Composition and Pharmacological Potential of Lemongrass (Cymbopogon) and Impact on Gut Microbiota. AppliedChem, 2022. **2**(4): p. 229-246.
.26 Rojas-Sandoval, J., Aloysia citrodora (lemon verbena). CABI Compendium, 2019.(112152)
.27 Vincenzo Fiore, D.B., Carmelo Sanfilippo, Roberto Pirrone, Suchart Siengchin, Sanjay Mavinkere Rangappa & Luigi Botta Lemongrass Plant as Potential Sources of Reinforcement for Biocomposites: A Preliminary Experimental Comparison Between Leaf and Culm Fibers. Journal of Polymers and the Environment, 2022. **30**: p. 4726–4737
.28 Mohammad Ghiath Naser Aldeen, R.M., Malak Alj, Fluctuations of phenols and flavonoids in infusion of lemon verbena (Lippia citriodora) dried leaves during growth stages. Nutrition & Food Science, 2015. **45**.
.29 Sin Yen Sah, C.M.S., Sui Kiat Chang, Yee Kwang Ang, Hip Seng Yim, ANTIOXIDANT CAPACITY AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF LEMONGRASS (CYMBOPOGON CITRATUS) LEAVE. Annals. Food Science and Technology, 2012. **13**.(2)
.30 Cheminet, G., et al., Antioxidant properties and phenolic composition of "Composed Yerba Mate". J Food Sci Technol, 2021. **58**(12): p. 4711-4721.