

Investigating the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Rosa damascena* Mill. on Coagulation Parameters in Male Mice

Mitra Ebrahimi¹, Jafar Vatandoost², Masoud Fereidoni^{3*}

1. Master's degree in cellular and molecular biology, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
3. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 2024/09/23

Accepted: 2024/12/03

Abstract

Introduction: Homeostasis is the body's natural response to injury aimed at preserving blood volume; dysfunction in this process can lead to low blood coagulation, such as in hemophilia. Medicinal plants are gaining attention for their cost-effectiveness and low risk. In traditional Iranian medicine, *Rosa damascena* has been utilized to manage menstrual bleeding. This study aims to investigate the in vivo effects of hydroalcoholic extract of *Rosa damascena* on coagulation parameters.

Materials and Methods: 56 male Syrian mice (25 ± 5 g) were divided into eight groups ($n=7$), including control, sham, positive control, and five experimental groups. The mice were intraperitoneally treated with doses of 500, 250, 100, 50, and 25 mg/kg of hydroalcoholic extract of *Rosa damascena* for 14 consecutive days. Hemostasis screening tests, including bleeding time (BT), clotting time (CT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), and platelet count, were employed to evaluate the results.

Results: The BT, CT, PT, and aPTT tests indicated a decrease in bleeding time with increasing extract dosage, with a significant difference observed in the 500 mg/kg group compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: The findings suggest that polyphenolic compounds, such as tannins and glycosides, present in *Rosa damascena*, including saponins, effectively enhance platelet aggregation and reduce bleeding and clotting times. The impact of *Rosa damascena* on both external and internal coagulation pathways may be attributed to the presence of gallic acid, caffeic acid, quercetin, and kaempferol.

***Corresponding Author:** Masoud Fereidoni

Address: Department of Biology, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Tel: +989155242015

E-mail: fereidoni@um.ac.ir

Keywords: Blood Coagulation, Hemostasis, Partial Thromboplastin Time, Prothrombin Time, Rosa

How to cite this article: Ebrahimi.M, Vatandoost.J, Fereidoni.M., Investigating the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Rosa damascena* Mill. on Coagulation Parameters in Male Mice, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2025; 32(1):76-86, DOI: 10.30468/jsums.2025.7906.3136.

Introduction

Homeostasis is the body's natural response to injury, preserving blood volume; failure in this process can lead to low blood coagulation, as seen in hemophilia. According to the World Federation of Hemophilia, developed countries with prophylaxis programs administer an average of 80,000 international units of coagulation factor annually per patient, costing approximately \$48,000 per year. These countries usually utilize recombinant drugs, which reduce the risk of infections associated with plasma-derived products. However, such treatments are primarily accessible in nations with a per capita GDP exceeding \$10,000.

In recent years, medicinal plants have garnered increased attention due to their cost-effectiveness and low risk. In traditional Iranian medicine, *Rosa damascena* has been employed to manage menstrual bleeding. This study aims to investigate the *in vivo* effects of hydroalcoholic extract of *Rosa damascena* on coagulation parameters.

Methodology

All the experiments were conducted under the research ethics regulations of Hakim Sabzevari University (Permission No. IR.HSU.AEC.1401.013).

Fifty-six male Syrian mice (25 ± 5 g) were divided into eight groups ($n=7$), including control, sham, positive control (desmopressin 0.25 ± 0.05 ml daily per mouse based on weight), and five experimental groups. The mice were treated with 500, 250, 100, 50, and 25 mg/kg of hydroalcoholic extract *Rosa damascena* for 14 consecutive days.

Hemostasis screening tests, including bleeding time (BT), clotting time (CT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), and platelet count, were utilized for evaluation.

Results

An increase in the dosage of the hydroalcoholic extract resulted in significant decreases in BT, CT, PT, and aPTT compared to the control group ($p < 0.05$), particularly at the 500 mg/kg dose ($p < 0.05$). However, platelet count tests did not show significant alterations across all groups compared to the control.

Discussion

The results indicate that the administration of the extract leads to an increase in coagulation function and a decrease in coagulation time in a dose-dependent manner, except for platelet count. This dose-dependent effect may be attributed to the increased concentration of active compounds in the extract.

The BT test assesses the integrity of vascular clot formation involving platelets and fibrin. The results demonstrate a significant decrease in bleeding time with increasing extract dosage, particularly at 500 mg/kg ($p < 0.001$). The CT test, which measures the coagulation pathway's ability to initiate clot formation and platelet aggregation, also confirmed these findings.

Biochemical compounds such as tannins and flavonoids possess anti-hemorrhagic properties that enhance blood coagulation and clot formation. Tannins can precipitate blood proteins, including thrombin, which converts fibrinogen into fibrin fibers, halting bleeding. They also promote protein release from cells, reducing capillary permeability and inducing local contraction of capillaries.

Tannins are classified into three major groups: hydrolyzable tannins, condensed tannins, and pseudotannins. Gallic acid, a hydrolyzable tannin, and flavonoids, found in condensed tannins, have been linked to significant reductions in clotting time. *Rosa damascena* is rich in these polyphenolic and flavonoid compounds. These compounds may contribute to hemostatic effects.

Plant glycosides led to a role in reducing BT and CT. Iridoid glycoside compounds significantly shorten BT, CT, and thrombin time (TT) and increase fibrinogen (FIB). Rosemary also contains many glycosides such as saponins. Saponin may be potentially useful as an external hemostatic agent.

The external pathway of coagulation is clinically assessed through the prothrombin time (PT) test, which involves coagulation factors I, II, VII, and X. The results of the PT test indicate a significant reduction in coagulation time in the 500 mg/kg intraperitoneal (i.p.) dose group compared to all other treatment groups ($p < 0.01^{**}$) and it can be concluded that probably marigold has a role in the external pathway of coagulation by affecting coagulation factors I, II, VII and X, which is necessary to be subjected to more detailed mechanistic research.

Conversely, the internal pathway is evaluated using the partial thromboplastin time (PTT) test, encompassing coagulation factors I, II, IX, X, XI, and XII. Data from the activated partial thromboplastin time for the 100, 250, and 500 mg/kg i.p. dose groups reveal a significant decrease ($p < 0.001$). This finding supports the hypothesis that chrysanthemum affects the internal pathway by influencing coagulation factors I, II, IX, X, XI, and XII.

Furthermore, it can be inferred that rosemary may impact internal and external coagulation pathways, thereby playing a role in the common coagulation pathway through its effects on factors X, V, II, and I.

Additionally, compounds such as gallic acid, valineic acid, and luteolin have been shown to reduce PT, activated PTT (aPTT), and thrombin time (TT). Caffeic acid also decreases PT and aPTT in moderate and low doses. Quercetin significantly shortens PT and TT, indicating its beneficial effects on the extrinsic coagulation pathway. Similarly, kaempferol markedly reduces PT, aPTT, and TT, suggesting its role in promoting coagulation through intrinsic and extrinsic pathways.

Unexpectedly, the platelet count results in this study were not statistically significant. This may be attributed to potential disruptions in platelet aggregation, which arise from the presence of

platelet-reducing agents among the plant metabolites, particularly gallic acid. By inhibiting the protein kinase C pathway, this compound may lead to reduced ATP production and, ultimately decrease in platelet numbers. Consequently, the hydroalcoholic extract of rose flowers appears to have a negligible effect on primary hemostasis.

Conclusion

These findings suggest that the extract of *Rosa damascena* contains a combination of phytochemicals that may promote coagulation or exhibit anticoagulant properties, depending on the specific compounds isolated from the extract. This emphasizes the importance of identifying the responsible components and conducting more detailed mechanistic investigations, such as what has been seen in other such research on plants.

Acknowledgment

This project was supported by Grant No. 831 from Hakim Sabzevari University. The researchers would like to thank Ferdowsi University of Mashhad for their scientific support.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گل محمدی (*Rosa damascene Mill.*) بر پارامترهای انعقادی در موش کوچک آزمایشگاهی نر

میترا ابراهیمی^۱، جعفر وطن دوست^۲، مسعود فریدونی^{۳*}

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۳. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۲

چکیده

زمینه و هدف: هموستاز واکنش طبیعی بدن به آسیب به دلیل حفظ خون و عملکرد صحیح نداشتن این فرایند می‌تواند باعث ایجاد انعقاد خون خیلی کم (هموفیلی) شود. امروزه گیاهان دارویی به دلیل مقرون به صرفه و کم خطر بودن بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. در طب سنتی ایران، از گل محمدی برای قطع خونریزی قاعدگی استفاده می‌شده است از این رو هدف این پژوهش بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گل محمدی بر پارامترهای انعقادی در شرایط *In Vivo* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: 56 موش نر سوری (25 ± 5 گرمی) در 8 گروه ($n=7$) شامل سه گروه شاهد، شم، کنترل مثبت و پنج گروه آزمایشی شامل دوزهای 500، 250، 100، 50، 25 عصاره هیدروالکلی گل محمدی به مدت 14 روز به صورت تزریق درون صفاقی (i.p.) تیمار شدند. برای ارزیابی نتایج، از آزمون‌های BT، CT، PT، aPTT و شمارش پلاکت که آزمون‌های غربالگری هموستازند استفاده شد.

یافته‌ها: آزمون‌های BT، CT، PT و aPTT کاهش زمان خونریزی با افزایش غلظت عصاره را نشان داد به طوری که در دوز 500 mg/kg اختلاف معناداری با گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$)

نتیجه‌گیری: نظر به نتایج ترکیبات پلی فنولی مانند تانن‌ها و گلیکوزیدهای موجود در گل محمدی نظیر ساپونین‌ها در افزایش تجمع پلاکتی و کاهش زمان خونریزی و لخته شدن مؤثر بوده‌اند. شاید تأثیر گذاری گل محمدی بر هر دو مسیر بیرونی و داخلی انعقاد باشد که می‌تواند ناشی از حضور گالیک اسید، کافئیک اسید، کوئرستین و کامپفرول باشد.

* نویسنده مسئول: مسعود فریدونی

نشانی: استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
تلفن: +۹۸۹۱۵۵۲۴۲۰۱۵
رایانامه: fereidoni@um.ac.ir

شناسه ORCID: 0-000-000-152-508-98X
شناسه ORCID نویسنده اول: 0009-0001-2078-7846
DOI: 10.30468/jsums.2025.7906.3136

کلیدواژه‌ها:

هموستاز، گل محمدی، انعقاد خون، Partial Thromboplastin Time، Prothrombin time

مقدمه

عملکرد مسیر انعقادی، حفظ هموستاز است که خونریزی را تنظیم می‌کند. در حالی که هموستاز اولیه تجمع پلاکت‌هایی است که پلاک‌هایی را در محل آسیب دیده تشکیل می‌دهند، هموستاز ثانویه شامل دو مسیر انعقادی، درونی و بیرونی است که در نقطه‌ای به هم می‌رسند و مسیر مشترک را تشکیل می‌دهند (۱).

مسیر درونی شامل فاکتورهای I، II، IX، X، XI و XII است که از نظر بالینی با آزمون زمان ترومبوپلاستین جزئی (PTT) اندازه‌گیری می‌شود. در حالی که مسیر بیرونی از فاکتورهای I، II، VII و X تشکیل شده است و از نظر بالینی با آزمون زمان پروترومبین (PT) اندازه‌گیری می‌شود. مسیر مشترک شامل فاکتورهای I، II، V، VIII، X است. این فاکتورها در جریان خون به صورت زیموژن در گردش‌اند و به واسطه سرین پروتئازها

۲. مواد و روش

به منظور مطالعه گل محمدی، غنچه خشک شده آن را از عطاری معتبر خریداری شد و اصالت آن توسط پژوهشکده گیاهشناسی دانشگاه فردوسی مشهد به شماره هرباریوم E-1263-FUMH به تأیید رسید. به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی گل محمدی، ۲۰۰ گرم غنچه خشک گل محمدی آسیاب شده در ۵۰۰ میلی لیتر به نسبت حجمی هفت واحد اتانول و سه واحد آب مقطر اضافه شد. ارلن محتوی پودر گیاه و محلول عصاره گیری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در داخل دستگاه شیکر انکوباتور قرار گرفتند. با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و قیف بوختر، محتویات درون ارلن صاف شد و بعد از آن، عصاره به دست آمده داخل پلیت و زیر هود تغلیظ و به صورت عسلی درآمد و پس از جمع آوری، تا زمان انجام آزمایش به دور از رطوبت و نور در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

در این پژوهش، برای ارزیابی عصاره گیاهی بر روی جانوران، مجوز با شماره IR.HSU.AEC.1401.013 از کمیته اخلاق دانشگاه حکیم سبزواری دریافت گردید و کلیه آزمایشها تحت مقررات اخلاق پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری انجام گرفت. ۵۶ موش نر کوچک آزمایشگاهی ۶ تا ۸ هفته ای (وزن 5 ± 25 گرمی) از دانشکده داروسازی علوم پزشکی مشهد خریداری شدند. موشها به ۸ گروه (هر گروه شامل ۷ عدد موش سوری) شامل سه گروه کنترلی و پنج گروه آزمایشی از دوزهای عصاره تقسیم شدند. ابتدا برای آماده سازی گروههای تیمار، حجم تزریق روزانه، ۱۰ میلی لیتر به ازای ۱ کیلوگرم وزن هر موش مشخص شد. در مرحله بعد میانگین وزنی موشهای هر گروه محاسبه (25 ± 5 گرم) و بر اساس آن روزانه 0.5 ± 0.25 میلی لیتر از ماده تزریقی (حلال، دسموپرسین یا دوزهای عصاره) به هر موش بسته به وزن، به مدت ۱۴ روز به صورت تزریق درون صفاقی (i.p) تزریق گردید.

۱. گروه شاهد (Control): این موشها سالم بودند و در این مدت، فقط مانند سایر گروهها به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند.

۲. گروه شم (Sham): با توجه به اینکه عصاره در سرم فیزیولوژی، محلول شفاف و حل شده ای را تشکیل نداد، از حلال توئین (۸۰) - اتانول (۷۰ درصد) برای حل کردن عصاره استفاده شد. برای بررسی احتمال تأثیر حلال، تجویز صورت گرفت.

فعال می شوند. این سرین پروتئازهای فعال به عنوان یک کاتالیزور عمل می کنند تا زیموئن بعدی را به سرین پروتئازهای فعال بیشتری تبدیل کردند و در نهایت فیبرینوژن را فعال سازند (۲،۳).

پروپیلاکسی^۱ یا پیشگیری دارویی روشی است که می تواند از عوارض هموفیلی جلوگیری کند بدین منظور باید سطح ثابتی از فاکتور انعقادی (بیش از ۱۲ درصد) همواره حفظ شود. از آنجا که این روش با مصرف زیاد فاکتورهای انعقادی همراه است و این فراورده ها از قیمت بالایی برخوردار هستند، تنها در کشورهای توسعه یافته و ثروتمند می تواند در اختیار بیماران قرار گیرد. مطابق آمارهای فدراسیون جهانی هموفیلی^۲ کشورهای توسعه یافته با برنامه های پروپیلاکسی، سالانه برای هر بیمار به طور متوسط ۸۰۰۰ واحد بین المللی فاکتور انعقادی مصرف می کنند که با احتساب متوسط قیمت هر واحد معادل ۰.۶ دلار آمریکا، هزینه هر بیمار سالانه ۴۸۰۰۰ دلار برآورد می شود (۴). بشر از زمان های قدیم به دنبال درمان بیماری ها در طبیعت بوده است. بسیاری از داروهای مرسوم از منابع گیاهی سرچشمه می گیرند، برای مثال می توان به آسپرین (از پوست درخت بید)، کینین (از پوست درخت سینچونا) و مورفین (از خشخاش) اشاره کرد. حتی اخیراً استفاده از داروهای گیاهی در مکمل های غذایی، نوشیدنی های انرژیزا، مولتی ویتامین ها و ... محبوبیت پیدا کرده است (۵).

گل محمدی با نام علمی *Rosa damascena* Mill از خانواده Rosaceae هیبرید بین *R. gallica* و *R. Phenicia* است.

دانشمند معروف ایرانی ابوعلی سینا اسانس *R. damascena* را در قرن دهم میلادی برای درمان بیماری های مختلف استخراج کرد. جوشانده گل محمدی و گل خشک آن در طب سنتی ایران برای درمان دردهای شکم و سینه، بیماری های گوارشی، خونریزی قاعدگی و ... استفاده می شد (۶،۷).

چندین جزء از گل ها، گلبرگ ها و مادگی *R. damascene* شامل ترپن ها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها است. همچنین این گیاه حاوی کوارستین و کامفرول، ویتامین C، میرسن و کربوکسیلیک اسید است (۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳).

با توجه به وجود ترکیبات ارزشمند مذکور در گل محمدی که برخی از آنها که همچنین در سایر گیاهان یافت می شوند تأثیراتی بر مسیرهای انعقادی و هموستاز نشان داده اند (۱۴)، این تحقیق بر آن است که تأثیرات عصاره هیدروالکلی گل محمدی را بر فرایند انعقاد مورد بررسی قرار دهد

در روز ۱۴، یک قطره خون از دم بریده شده موش روی لام قرار داده شد و با استفاده از یک لام دیگر با زاویه ۳۰-۴۵ درجه روی قطره خون، گسترش خونی تهیه شد. لام‌ها در معرض هوا قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند.

بعد از آن، روی گسترش خونی متانول قرار داده شد طوری- که کاملاً سطح لام را فرا گیرد. از متانول به منظور تثبیت گسترش خونی استفاده می‌شود. بعد از سه دقیقه متانول از روی لام شستشو داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه، رنگ گیمسا روی لام قرار داده شد. بعد از این مدت، رنگ روی لام با جریان آب ملایم شستشو داده شد تا رنگ‌های اضافی کاملاً از روی سطح لام شسته شوند. لام‌ها در معرض هوا خشک شدند و در نهایت با میکروسکوپ نوری و عدسی ۱۰۰× و روغن ایمرسیون مشاهده شدند. شمارش در ۱۰ میدان دید صورت گرفت.

۴.۲. آزمون PT (زمان پروترومبین)

PT نشان‌دهنده زمان لخته‌شدن پلاسمای بیمار پس از افزودن کلسیم و یک فعال کننده مسیر بیرونی (ترومبوپلاستین) برحسب ثانیه است (۲۲).

برای انجام این آزمون طبق دستورالعمل کیت Fisher, (Ger), ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه پلاسمای موش و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف PT درون لوله آزمایش ریخته شد و بلافاصله با قراردادن لوله در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد زمان کرنومتر آغاز شد. بعد از ۱۰-۷ ثانیه تکان دادن لوله درون بن‌ماری، لوله خارج شد و زیر نور تشکیل اولین لخته، مشاهده و زمان آن ثبت گردید.

۵.۲. آزمون aPTT (زمان پروترومبین جزئی فعال شده)

زمان ترومبوپلاستین جزئی فعال شده، سنجشی بر اندازه‌گیری یکپارچگی مسیرهای درونی و مشترک آبشار انعقادی است (۲۳).

برای انجام این آزمون طبق دستورالعمل کیت (Fisher), ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه پلاسمای موش و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف aPTT درون لوله آزمایش ریخته شد و بلافاصله با قراردادن لوله در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد زمان کرنومتر آغاز شد. بعد از ۵-۳ دقیقه لوله از بن‌ماری خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم به لوله اضافه شد و در بازه‌های ۸ ثانیه‌ای لوله درون بن‌ماری تکان داده شد و زیر نور بازبینی شد تا تشکیل اولین رشته-های فیبرینی مشاهده و زمان آن ثبت گردد.

۳. گروه کنترل مثبت (+Control): داروی دسموپرسین در دسترس (اسپری بینی دسموپرسین سینادارو که دارای ۱۰ میکروگرم دسموپرسین در حجم ۵ میلی‌لیتر است) بود و دوز مورد تأیید ۰/۳ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش (۱۵) مقرر شد.

۴. بعد از رطوبت‌سنجی و دانستن درصد ماده خشک موجود در عصاره، دوزهای مختلف از عصاره عسلی تهیه شد. دسته گروه تیمار دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱/۰۰، ۲/۵۰ mg/kg i.p. از عصاره هیدروالکلی غنچه گل محمدی تهیه شد.

۲.۱. آزمون BT (زمان خونریزی)

زمان خونریزی (BT) تخمینی از یکپارچگی تشکیل لخته عروقی، پلاکتی و فیبرین را ارائه می‌دهد (۱۶).

برای انجام این آزمایش در روز ۱۴، ابتدا برای اینکه موش تکان نخورد و خطا در ارزیابی به وجود نیاید، داروی بیهوشی کتامین و زایلازین به نسبت ۸:۲ تزریق شد. دم موش با الکل استریل شد و بعد از برش با قیچی جراحی به اندازه ۲ میلی‌متر، بلافاصله زمان‌سنجی با کرنومتر آغاز شد. هر ۱۵ ثانیه از نوک دم خونریزی‌شده، بر روی کاغذ صافی، لکه‌ای ایجاد گردید تا جایی که دیگر خونی روی کاغذ صافی دیده نشود. از پیدایش اولین قطره خون تا زمان مشاهده‌نشدن بروز لکه، خون بر روی کاغذ به عنوان زمان خونریزی ثبت شد (۱۷، ۱۸).

۲.۲. آزمون CT (زمان لخته‌شدن)

آزمون زمان انعقاد خون، مدت زمان تشکیل لخته را اندازه‌گیری می‌کند. CT همانند aPTT توانایی مسیر داخلی انعقاد در شروع تشکیل لخته را با فعال کردن فاکتور XIII بررسی می‌کند (۱۹).

به‌منظور انجام این آزمون طبق روش lee & White (۲۰) در روز ۱۴، یک قطره خون از دم بریده موش را روی یک لام تمیز قرار داده و بلافاصله زمان کرنومتر شروع شد. با استفاده از لانس در فواصل منظم تا جایی که یک رشته فیبرینی بین لانس و قطره خون ظاهر شود زمان نگه داشته شد و فاصله زمانی بین ظهور قطره خون و ایجاد رشته فیبرینی، به‌عنوان زمان لخته‌شدن خون موش در نظر گرفته شد.

۳.۲. آزمون شمارش پلاکت

آزمون شمارش پلاکت، جزئی از آزمایش شمارش کامل خون انجام می‌شود و در مرحله نخست تشخیص بیماری‌های انعقادی قرار دارد (۲۱).

۶.۲. خون‌گیری از موش

در روز ۱۵ ابتدا از تزریق وریدی ترکیب ۲ داروی کتامین (100 mg/kg i.p.) و زایلازین (5 mg/kg i.p.) برای بیهوش‌سازی موش‌ها استفاده شد. پس از بیهوشی خون‌گیری از تنه طی مراحل مربوطه صورت گرفت. برای جلوگیری از لخته‌شدن خون تا هنگام جداسازی پلاسما از آن، به نسبت ۱/۹ حجم خون خروجی، محلول سدیم سیترات ۳/۲ درصد اضافه شد. سپس لوله آزمایش درون سانتیفریوژ با دور ۲۵۰۰ و ۱۵ دقیقه زمان، قرار داده و سپس پلاسمای رویی برای انجام بقیه مراحل آزمون-های PT و aPTT جدا گردید.

۷.۲. تحلیل آماری داده‌ها

تمامی داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار آماری Prism 9 تجزیه و تحلیل شدند و نتایج به‌صورت میانگین و با خطای استاندارد (SEM) ارائه شدند. از تجزیه و تحلیل آنوا یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای بررسی اثربخشی تیمارها

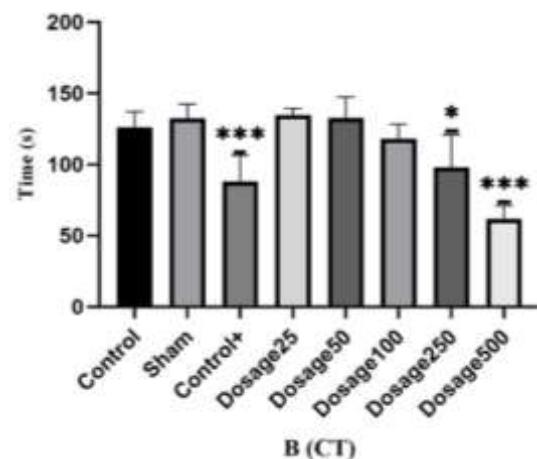
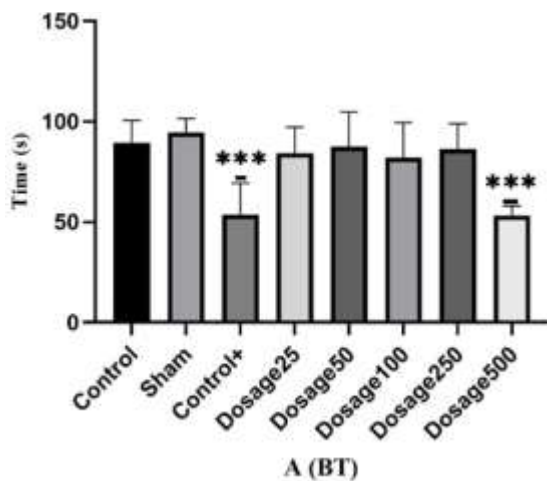
استفاده شد، سپس از آزمون T student Tukey برای مقایسه معنی‌داری اختلاف میانگین‌ها بهره گرفته شد و $P < 0.05$ به‌عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

۳.۱. نتایج آزمون‌های زمان خونریزی (BT) و زمان لخته‌شدن (CT)

نتایج آزمون BT یک روند کاهشی را در زمان خونریزی نشان می‌دهد اگرچه تنها زمان BT در دوز ۵۰۰ mg/kg نسبت به کنترل معنادار بود ($P < 0.05$) ولی نسبت به کنترل مثبت اختلاف معناداری نشان نداد (نمودار 1A).

نتایج آزمون زمان CT حاکی از کاهش زمان تشکیل لخته به دنبال افزایش غلظت عصاره است. بیشترین (۶/۱۳۴) و کمترین (۶۷/۶۱) زمان لخته‌شدن به ترتیب در دوزهای ۲۵ و ۵۰۰ مشاهده گردید (نمودار 1B).

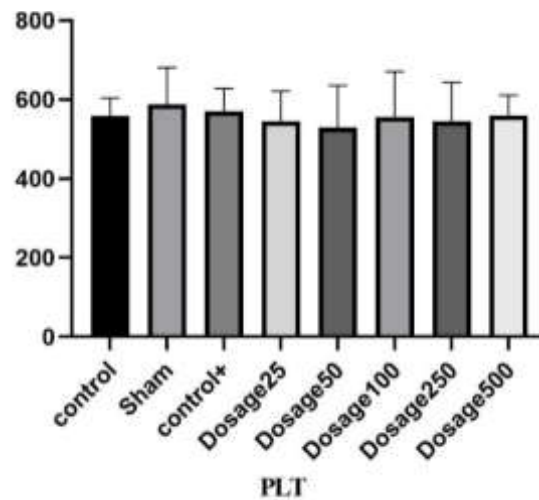


نمودار ۱. تأثیر دوزهای عصاره هیدروالکلی گل محمدی در آزمون‌های BT و CT. (A) در آزمون BT تنها دوز 500 mg/kg اثر کاهشی بر زمان خونریزی داشت. (B) نتایج آزمون CT حاکی از کاهش زمان تشکیل لخته با افزایش غلظت عصاره است به‌طوری که بیشترین تأثیر را دوز 500 mg/kg عصاره داشته است ($p < 0.05$), ($p < 0.001$), ($n=7$).

آزمون پلاکت، هیچ اختلاف معناداری بین گروه‌ها مشاهده نشد (نمودار ۲).

۳.۲. نتایج آزمون شمارش پلاکت

بعد از شمارش ۱۰ میدان تصادفی و ثبت آن‌ها، با بررسی نتایج

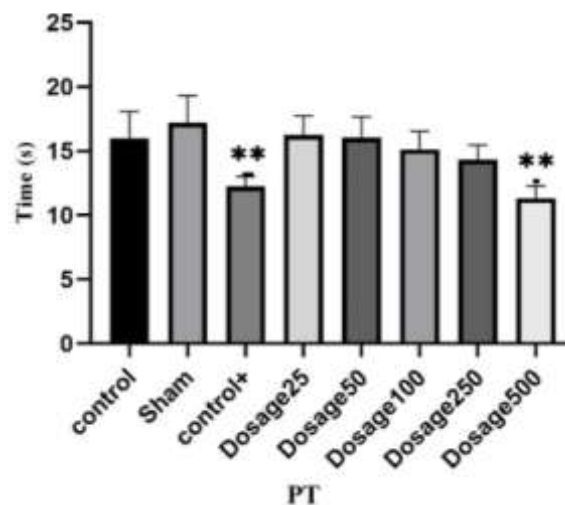


نمودار ۲. تأثیر دوزهای عصاره هیدروالکلی گل محمدی بر تعداد پلاکت‌ها در هر میلی‌متر مکعب خون (PLT). اختلاف معناداری بین گروه‌ها مشاهده نشد (n=7).

۳.۳. نتایج آزمون زمان پروترومبین (PT)

از اثرگذاری غلظت ۵۰۰ بر آزمون PT است به‌طوری‌که باعث کاهش معنادار زمان انعقاد گردید ($p < 0.01$) (نمودار ۳).

میانگین زمان پروترومبین بین گروه‌ها مقایسه شد. نتایج حاکی

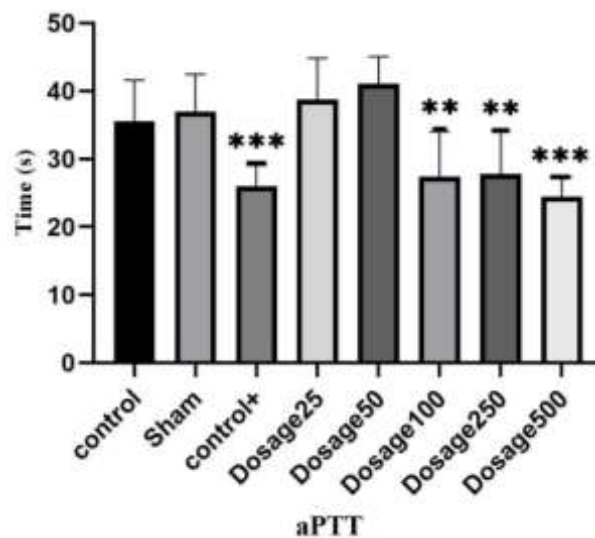


نمودار ۳. تأثیر دوزهای عصاره هیدروالکلی گل محمدی بر آزمون (PT). تنها دوز ۵۰۰ mg/kg عصاره اختلاف معناداری با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل)، (n=7).

۳.۴. نتایج آزمون زمان ترومبوپلاستین جزئی فعال‌شده (aPTT)

در دوزهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ به‌دست آمد ($p < 0.01$) (نمودار ۴)

میانگین زمان aPTT بین گروه‌ها مقایسه شد. کاهش معناداری



نمودار ۴. تأثیر دوزهای عصاره هیدروالکلی گل محمدی بر آزمون (aPTT). نتایج آزمون aPTT حاکی از کاهش زمان تشکیل لخته با افزایش غلظت عصاره است به طوری که بیشترین تأثیر را دوز 500 mg/kg عصاره داشته است ($p < 0.01$ ، $***p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل)، (n=7).

۴. بحث و نتیجه گیری

جمع شدن لایه‌ای سطحی از سلول‌ها می‌شود و در نهایت منجر به انقباض موضعی عروق مویرگ‌ها می‌شود. تانن‌ها همچنین می‌توانند پروتئین‌های خون مانند آلبومین را رسوب دهند. این فرایند رسوب پروتئین و سنتز ترومبوسان A2 را برای افزایش تجمع پلاکتی القا می‌کند و در نتیجه تشکیل پلاک در رگ‌های خونی آسیب‌دیده را تسریع می‌کند (۲۴).

برخی از گالوتانن‌ها، استرهای اسید گالیک هستند که در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که غلظت‌های زیاد و متوسط اسید گالیک، غلظت متوسط اسید والینیک و همچنین غلظت‌های متوسط و پایین لوتئولین می‌توانند زمان انعقاد (CT) را به طور معنی‌داری کاهش دهند (۲۵، ۲۶).

گل محمدی سرشار از ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدها است، همچنین ترکیباتی نظیر تانن‌ها و گالیک اسید در عصاره آن مشاهده شده است (۸-۱۳) که می‌توانند به عنوان برخی مواد مؤثره این گیاه در روند انقباض مورد توجه قرار بگیرند.

گلیکوزیدهای گیاهی در کاهش BT و CT نقش دارند. ترکیبات گلیکوزیدهای ایریدوئید به طور قابل توجهی BT، CT و زمان ترومبین (TT) را کوتاه می‌کنند و فیبرینوژن (FIB) را افزایش می‌دهند. گل محمدی نیز حاوی گلیکوزیدهای فراوانی نظیر ساپونین‌ها است. ساپونین ممکن است به طور بالقوه به عنوان یک عامل هموستاتیک خارجی مفید باشد (۲۷، ۲۸).

نتایج آزمون PT نشان‌دهنده کاهش زمان انعقاد در گروه دوز

برای سنجش تأثیر گل محمدی بر سازوکار انعقاد از آزمون-های BT، CT، PT، aPTT و شمارش پلاکت که آزمون‌های غربالگری هموستازاند استفاده شد. به طور کلی تمامی آزمون‌ها مجموعاً افزایش عملکرد انعقادی و کاهش زمان انعقاد به صورت وابسته به دوز را طی تجویز عصاره نشان دادند (نمودارهای ۴، ۳، ۱) به جز سنجش تعداد پلاکت‌ها که نتایج آن معنی‌دار نبود (نمودار ۲). احتمالاً تأثیرات وابسته به دوز به دلیل افزایش غلظت مواد مؤثره در عصاره با افزایش دوز بوده است.

نتایج حاصل از بررسی زمان خون‌ریزی (BT) و زمان انعقاد (CT) نشان‌دهنده کاهش زمان خون‌ریزی با افزایش دوز عصاره گل محمدی می‌باشد به طوری که دوز ۵۰۰ mg/kg i.p. عصاره اختلاف معناداری را نسبت به تمامی گروه‌های تیمار نشان می‌دهد (نمودار A-۱، B-۱).

ترکیبات بیوشیمیایی مانند تانن‌ها و فلاونوئیدها دارای تأثیرات ضدخون‌ریزی هستند که روند انعقاد خون و تشکیل لخته را تسریع می‌کنند. تانن یک قابض است که می‌تواند پروتئین‌های خون مانند ترومبین را رسوب دهد. ترومبین فیبرینوژن را به مجموعه‌ای از الیاف فیبرین تبدیل می‌کند تا خون‌ریزی را متوقف کند. تانن‌ها آزاد شدن پروتئین‌ها از سلول‌ها را تسریع می‌کنند و این پروتئین‌ها را روی سطح سلول رسوب می‌دهند. آن‌ها همچنین ترشح و نفوذپذیری مویرگی و انقباض فضای بین سلولی را کاهش می‌دهند، اندوتلیوم مویرگی را سخت می‌کنند و یک لایه را تشکیل می‌دهند که باعث سفت شدن و

به مواد مؤثره‌ای که در عصاره از گیاه جدا شده‌اند، ضدانعقاد باشد که بر اهمیت جداسازی اجزای مسئول و بررسی‌های مکانیستیک دقیق‌تر از جنبه کاربردی نیز تأکید دارد.

تشکر و قدردانی

این پروژه تحت حمایت گرنت شماره ۸۳۱ دانشگاه حکیم سبزواری انجام گرفته است. پژوهشگران بر خود الزام می‌دانند از دانشگاه فردوسی مشهد برای حمایت‌های علمی تقدیر و تشکر به‌عمل آورند.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، مجوز با شماره IR.HSU.AEC.1401.013 از کمیته اخلاق دانشگاه حکیم سبزواری دریافت گردید و کلیه آزمایش‌ها تحت مقررات اخلاقی پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری انجام گرفت.

سهم نویسندگان

نویسنده مسئول پروژه از سایر نویسندگان نامبرده در این مقاله که در روند طراحی و انجام پژوهش و تجزیه و تحلیل داده‌ها مساعی خود را به‌کار برده‌اند تشکر به‌عمل می‌آورد.

حمایت مالی

این پروژه تحت حمایت گرنت شماره ۸۳۱ دانشگاه حکیم سبزواری انجام گرفته است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

۵۰۰ mg/kg i.p. نسبت به تمامی گروه‌های تیمار است ($p < 0.01$) (نمودار ۳) و می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً گل محمدی بر مسیر بیرونی انعقاد با تأثیر بر عوامل انعقادی I، II، VII و X نقش داشته باشد که لازم است مورد تحقیقات مکانیستیک جزئی‌تر قرار بگیرند.

نتایج حاصل از زمان ترومبوپلاستین جزئی فعال‌شده، گروه-های دوز ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰ mg/kg i.p. کاهش معناداری را نشان می‌دهند ($p < 0.001$) (نمودار ۴) که این احتمال را تقویت می‌کند که گل محمدی بر مسیر داخلی از طریق تأثیر بر عوامل انعقادی I، II، IX، X، XI و XII نقش داشته باشد.

همچنین می‌توان نتیجه گرفت با توجه به تأثیر گل محمدی بر مسیر داخلی و بیرونی انعقاد، احتمالاً این گیاه در مسیر مشترک انعقاد و تأثیر بر عوامل انعقادی V، X، II و I نیز نقش دارد.

گالیک اسید، والینیک اسید و لوتئولین می‌توانند PT، aPTT و زمان ترومبین (TT) را کاهش دهند. علاوه بر این، کافئیک اسید PT و aPTT را در دوزهای متوسط و پایین کاهش می‌دهد (۲۴)، همچنین کوئرستین می‌تواند به‌طور قابل توجهی PT و TT را کوتاه کند که نشان‌دهنده اثر مفید آن بر مسیر انعقاد بیرونی و کامپفرول به‌طور قابل توجهی PT، aPTT و TT را کوتاه می‌کند که نشان‌دهنده اثر پیش‌برندگی آن بر انعقاد از طریق مسیرهای انعقادی درونی و بیرونی است (۲۹).

بر خلاف انتظار نتایج آزمون شمارش پلاکت‌ها در این پژوهش معنی‌دار نبود (نمودار ۲) علی‌رغم آنکه احتمال داده می‌شد که به دلیل وجود عامل کاهنده پلاکتی در بین متابولیت‌های گیاه اختلالی در ایجاد تجمع پلاکتی به‌وجود آید زیرا حضور گالیک اسید در گیاه با تأثیر بر مسیر مهار پروتئین کیناز C باعث تولیدنشدن ATP می‌شود و در نهایت می‌باید موجب کاهش تعداد پلاکت بشود (۳۰، ۳۱). این یافته‌ها حاکی از آن است که عصاره گیاه گل محمدی می‌تواند حاوی ترکیبی از مواد شیمیایی گیاهی احتمالاً پیش‌برنده انعقاد یا حتی بسته

References

- [1]. Panova-Noeva M, Eggebrecht L, Prochaska JH, Wild PS. Potential of Multidimensional, Large-scale Biodatabases to Elucidate Coagulation and Platelet Pathways as an Approach towards Precision Medicine in Thrombotic Disease. *Hamostaseologie*. 2019 Jun;39(2):152-163. Doi: 10.1055/s-0038-1677520
- [2]. Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, coagulation pathways. *StatPearls Publishing*; 2024 Jan. PMID: 29489185. Bookshelf ID: NBK482253
- [3]. Nogami K, Shima M. New therapies using nonfactor products for patients with hemophilia and inhibitors. *Blood*. 2019 Jan 31;133(5):399-40. doi: 10.1182/blood-2018-07-820712
- [4]. Gharehbaghian A, Arman L. The impact of economic factors on haemophilia care. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ*. 2006 Jan 10;2(7):391-3. URL: <http://bloodjournal.ir/article-1-61-en.html> (Persian article)

- [5]. Mabblerley D, editor. A Cultural History of Plants in the Nineteenth Century. Bloomsbury Publishing; 2023 Dec 14. ISBN:9781474273510, 1474273513 (Book)
- [6]. Mileva M, Ilieva Y, Jovtchev G, Gateva S, Zaharieva MM, Georgieva A, Dimitrova L, Dobrova A, Angelova T, Vilhelmova-Ilieva N, Valcheva V, Najdenski H. Rose Flowers-A Delicate Perfume or a Natural Healer? *Biomolecules*. 2021 Jan 19;11(1):127. doi: 10.3390/biom11010127.
- [7]. Akram M, Riaz M, Munir N, Akhter N, Zafar S, Jabeen F, Ali Shariati M, Akhtar N, Riaz Z, Altaf SH, Daniyal M, Zahid R, Said Khan F. Chemical constituents, experimental and clinical pharmacology of Rosa damascena: a literature review. *J Pharm Pharmacol*. 2020 Feb;72(2):161-174. doi: 10.1111/jphp.13185.
- [8]. Prosche S, Stappen I. Flower Power: An Overview on Chemistry and Biological Impact of Selected Essential Oils from Blossoms. *Planta Med*. 2024 Jun;90(7-08):595-626. Doi: 10.1055/a-2215-2791.
- [9]. Trendafilova A, Staleva P, Petkova Z, Ivanova V, Evstatieva Y, Nikolova D, Rasheva I, Atanasov N, Topouzova-Hristova T, Veleva R, Moskova-Doumanova V, Dimitrov V, Simova S. Phytochemical Profile, Antioxidant Potential, Antimicrobial Activity, and Cytotoxicity of Dry Extract from Rosa damascena Mill. *Molecules*. 2023 Nov 19;28(22):7666. Doi: 10.3390/molecules28227666..
- [10]. Prosche S, Stappen I. Flower Power: An Overview on Chemistry and Biological Impact of Selected Essential Oils from Blossoms. *Planta Med*. 2024 Jun;90(7-08):595-626. Doi: 10.1055/a-2215-2791.
- [11]. Trendafilova A, Staleva P, Petkova Z, Ivanova V, Evstatieva Y, Nikolova D, Rasheva I, Atanasov N, Topouzova-Hristova T, Veleva R, Moskova-Doumanova V, Dimitrov V, Simova S. Phytochemical Profile, Antioxidant Potential, Antimicrobial Activity, and Cytotoxicity of Dry Extract from Rosa damascena Mill. *Molecules*. 2023 Nov 19;28(22):7666. Doi: 10.3390/molecules28227666. PMID: 38005389; PMCID: PMC10674922.
- [12]. Verma SR, Padalia CR, Chauhan A. Chemical investigation of the volatile components of shade-dried petals of damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Archives of Biological Sciences*. 2011;63(4):1111-5. Doi:10.2298/ABS1104111V
- [13]. Sklirou AD, Angelopoulou MT, Argyropoulou A, Chaita E, Boka VI, Cheimonidi C, Niforou K, Mavrogonatou E, Pratsinis H, Kalpoutzakis E, Aligiannis N. Phytochemical study and in vitro screening focusing on the anti-aging features of various plants of the Greek flora. *Antioxidants*. 2021 Jul 28;10(8):1206. Doi:10.3390/antiox10081206
- [14]. Ebrahimi F, Torbati M, Mahmoudi J, Valizadeh H. Medicinal plants as potential hemostatic agents. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2020 Feb 6;23:10-23. Doi: /10.18433/jpps30446
- [15]. Garona J, Pifano M, Orlando UD, PAsTRIAN MB, Iannucci NB, Ortega HH, PODEsTA EJ, Gomez DE, Ripoll GV, ALONsO DF. The novel desmopressin analogue [V4Q5] dDAVP inhibits angiogenesis, tumour growth and metastases in vasopressin type 2 receptor-expressing breast cancer models. *International journal of oncology*. 2015 Jun 1;46(6):2335-45. Doi: 10.3892/ijo.2015.2952
- [16]. Russeau AP, Vall H, Manna B. Bleeding Time. 2023 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 30725918 Bookshelf ID: NBK606118. (Book)
- [17]. Rodgers RPC, Levin J. A Critical Reappraisal of the Bleeding Time. *Semin Thromb Hemost*. 2024 Apr; 50(3):499-516. doi: 10.1055/s-0043-1777307
- [18]. Li R, Qu J, Wu C, Fang Z, Hong X, Xu H. Demonstration of an action pathway in mouse platelets leading to prolongation of bleeding time by fluoxetine. *Eur J Pharmacol*. 2020 Sep 15;883:173385. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173385
- [19]. McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-book. Elsevier Health Sciences; 2021 Jun 9. ISBN: 9780323755085, 0323755089 (Book)
- [20]. Lee RI, White PD. A clinical study of the coagulation time of blood. *The American Journal of the Medical Sciences* (1827-1924). 1913 Apr 1;145(4):495 (Book)
- [21]. Baccini V, Geneviève F, Jacqmin H, Chatalein B, Girard S, Willeme S, Vedrenne A, Guiheneuf E, Toussaint-Hacquard M, Everaere F, Soulard M. Platelet counting: ugly traps and good advice. Proposals from the French-Speaking Cellular Hematology Group (GFHC). *Journal of clinical medicine*. 2020 Mar 16;9(3):808. Doi: 10.3390/jcm9030808
- [22]. Yang R, Moosavi L. Prothrombin time. In: StatPearls [Internet] 2022 Oct 19. StatPearls Publishing. Bookshelf ID: NBK544269. PMID: 31334989 (Book)
- [23]. Adcock DM, Moore GW, Montalvão SL, Kershaw G, Gosselin RC. Activated Partial Thromboplastin Time and Prothrombin Time Mixing Studies: Current State of the Art. *Semin Thromb Hemost*. 2023 Sep;49(6):571-579. doi: 10.1055/s-0042-1756196.
- [24]. Fauzi A, Lamma S, Ruslin M. Total tannin levels analysis of brown algae (*Sargassum* sp. and *Padina* sp.) to prevent blood loss in surgery. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. 2018 Apr 1;3(1):37-40. Doi: 10.15562/jdmfs.v3i1.621
- [25]. Cheng XX, Zhou ZY, Hu QL, Wu HD, Qi SY, Li XX, Song JY, Zhao HY, Wang YW, Tong HJ, Cao H, Mao CQ, Lu TL, Gu W. [Charcoal-frying process and quality markers of *Sanguisorbae Radix* based on hemostatic effect]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2024 May;49(10):2710-2721. Chinese. doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20240110.301.
- [26]. Minocha S, Kumari S, Tiwari A, Gupta AK, Gandhi S, Sharma A. An overview on tannins. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archive*. ISSN: 2349-2678 2015;3(2):09-11.
- [27]. Mal S, Pal D. Tannins and polyphenols extracted from natural plants and their versatile application. *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*. 2021:715-57. Doi: 10.1007/978-3-030-54027-2_21
- [28]. White CM, Fan C, Chow M. An evaluation of the hemostatic effect of externally applied notoginseng and notoginseng total saponins. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2000 Oct;40(10):1150-3. Doi:10.1177/009127000004001009
- [29]. Zhang J, Yin Z, Chen L, Yang B, Zhang W, Kang W. Chemical constituents and coagulation activity of *Amygdalus persica* L. flowers. *Journal of Food Quality*. 2021 May 20;2021:1-7. Doi: 10.1177/1934578X211004389
- [30]. Gao J, Hu J, Hu D, Yang X. A role of gallic acid in oxidative damage diseases: A comprehensive review. *Natural Product Communications*. 2019 Aug;14(8):1934578X19874174. Doi: 10.1177/1934578X19874174
- [31]. Zhang Y, Wang X, Lu B, Gao Y, Zhang Y, Li Y, Niu H, Fan L, Pang Z, Qiao Y. Functional and binding studies of gallic acid showing platelet aggregation inhibitory effect as a thrombin inhibitor. *Chinese Herbal Medicines*. 2022 Apr 1;14(2):303. Doi: 10.1016/j.chmed.2021.09.001.