



## Effect of Saponin Encapsulated by Ferritin Nanoparticles on Fetal Lung Development in Female Mice with *Streptococcus pneumoniae*

Saba Safdarpour<sup>1✉</sup>, Zohre Eftekhari<sup>2✉</sup>, Akram Eidi<sup>3✉</sup>, Delaram Doroud<sup>4✉</sup><sup>1</sup> Graduated from the Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran<sup>3</sup> Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran<sup>4</sup> Research & Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Alborz, Iran

Received: 10 May 2023, Accepted: 16 July 2023

[10.22059/jvr.2023.358664.3343](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.358664.3343)[20.1001.1.20082525.1402.78.3.5.1](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.3.5.1)

### Abstract

**BACKGROUND:** The effect of nanoherbal substances in the treatment of infectious diseases before mating or during pregnancy must be evaluated. Saponin has adverse effects on a pregnant mother and her fetal through complex mechanisms.

**OBJECTIVES:** This study aims to investigate the toxic effects of saponin encapsulated by ferritin nanoparticles (Nanosaponin) on fetal lung development in female mice with *Streptococcus pneumoniae*.

**METHODS:** Extraction of crude saponin from licorice roots was done by the powder heating and using 20 % ethanol and diethyl ether. Then, n-butanol and 5 % sodium chloride solution were added to the aqueous layer. The mice were divided into five groups of 10 including control, pneumonia, pneumonia treated with ferritin, pneumonia treated with saponin, and pneumonia treated with nanosaponin. Then, two groups of untreated pregnant pneumonia and pregnant pneumonia treated with nanosaponin were separated. In this study, tumor necrosis factor alpha (IFN- $\gamma$ ), heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), Methyl-CpG binding domain 2 (MBD-2), and kruppel like factor 2 (KLF-2) genes were evaluated in the maternal lungs, and TNF- $\alpha$  level was evaluated using ELISA method in the fetal lungs. Maternal tissue, uterus tissue, and fetal lung were examined by hematoxylin and eosin staining, and maternal body tissue was examined by trichomason staining and Oxidative stress parameters were investigated.

**RESULTS:** Nano saponin decreased the expression of IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ) ( $P < 0.01$ ), MBD-2 ( $P < 0.05$ ) and HB-EGF genes, KLF-2 protein level and TNF- $\alpha$  levels in fetal lung. The thickness of uterine myometrium and blood flow of endometrium increased the number of live embryos and the rate of successful pregnancy. In addition, Nano saponin effectively improved the oxidative stress response in the fetus without any harmful effect on the mother's liver tissue.

**CONCLUSIONS:** The nanosaponin has no toxic effects on the study organs of the mother and fetus. It has therapeutic effects on the fetal lung development process after the infection of mother with *Streptococcus pneumoniae*.

**Keywords:** Fetus, Ferritin nanoparticles, Lung, Saponin, *Streptococcus pneumoniae*

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

**Corresponding author:** Zohre Eftekhari, Tel/Fax: +9821-66953311

### How to cite this article:

Safdarpour S, Eftekhari Z, Eidi A, Doroud D. Effect of Saponin Encapsulated by Ferritin Nanoparticles on Fetal Lung Development in Female Mice with *Streptococcus pneumoniae*. J Vet Res, 2023; 78(3): 197-212.  
doi: 10.22059/jvr.2023.358664.3343

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** The primer sequence used in Real-time PCR.

**Figure 1.** Morphology of nanosaponin using the scanning electron microscope.

**Figure 2.** Fertilization by a fertile sperm using Giemsa staining technique. A) Control group; B) Pneumonia group treated with nanosaponin.

**Figure 3.** Protein levels of KLF-2 and GAPDH using Western blot assay.

**Figure 4.** Histopathology images of liver tissue in (A) control group and (B) pneumonia group treated with nanosaponin.

**Figure 5.** Light microscope images of uterine tissue (H&E staining) in fetuses born from (A) control group and (B) pneumonia group treated with nanosaponin.

**Figure 6.** Microscopic images of fetal lung tissue (H&E staining) in fetuses born from (A) Control group and (B) pneumonia group treated with nanosaponin.

## ارزیابی بی خطری اثرات ساپونین کپسوله شده توسط نانوذرات فریتین بر موش‌های ماده آلوده به استرپتوکوک پنومونیه و تکامل ریه جنین‌ها

سبا صفدرپور<sup>۱</sup>، زهره افتخاری<sup>۲</sup>، اکرم عیدی<sup>۳</sup>، دلارام درود<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست فناوری، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> مجتمع تحقیقاتی و تولیدی، انستیتو پاستور ایران، البرز، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰ اردیبهشت ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۲۵ تیر ماه ۱۴۰۲

doi: [10.22059/jvr.2023.358664.3343](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.358664.3343)

 [20.1001.1.20082525.1402.78.3.5.1](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.3.5.1)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** استفاده از ترکیبات نانو شده مؤثر گیاهان در درمان بیماری‌های عفونی قبل از جفت‌گیری یا در دوران بارداری ممکن است از طریق مکانیسم‌های پیچیده‌ای بر روی بافت‌های مادر و جنین اثرات سمی داشته باشد.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سمی ساپونین کپسوله شده توسط نانوذرات فریتین (نانو ساپونین) بر فرایند تکامل ریه جنین متولد شده از مادر مبتلا به استرپتوکوک پنومونیه در مدل موشی می‌باشد.

**روش کار:** استخراج ساپونین خام از ریشه گیاه شیرین بیان با حرارت دادن نمونه پودر شده با اتانول ۲۰ درصد و دی اتیل اتر صورت گرفت. سپس به لایه آبی، آن بوتانول و محلول کلرید سدیم ۵ درصد اضافه شد. در ابتدا موش‌های کوچک آزمایشگاهی به پنج گروه (۱۰ سر/گروه) شامل: گروه کنترل، پنومونی، پنومونی تیمار شده با فریتین، پنومونی تیمار شده با ساپونین، پنومونی تیمار شده با ساپونین کپسوله شده توسط نانوذرات فریتین (نانو ساپونین). سپس به دو گروه پنومونی باردار بدون درمان و پنومونی باردار تیمار شده با نانو ساپونین تقسیم شدند. در مطالعه حاضر بیان ژن‌های  $IFN-\gamma$ ،  $HB-EGF$ ،  $MBD-2$ ،  $KLF-2$  در ریه موش مادر و سطح  $TNF-\alpha$  با کمک الایزا در ریه جنین مورد ارزیابی قرار گرفت. بافت رحم مادر و ریه جنین، با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین و بافت کبد مادر با رنگ‌آمیزی تری کروماسون و پارامترهای استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نانو ساپونین بیان ژن‌های  $IFN-\gamma$  ( $P < 0.05$ )،  $MBD-2$  ( $P < 0.01$ ) و  $HB-EGF$  ( $P < 0.05$ ) سطح پروتئین  $KLF-2$  و میزان  $TNF-\alpha$  را در ریه جنین کاهش داد. ضخامت میومتر رحم و جریان خون آندومتر، تعداد جنین‌های زنده و میزان بارداری موفق را افزایش داد. علاوه بر این، نانو ساپونین به طور مؤثر پاسخ استرس اکسیداتیو در جنین را بدون هیچ‌گونه اثر مخربی بر بافت کبد مادر، بهبود بخشید.

**نتیجه‌گیری نهایی:** بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، نانو ساپونین تهیه شده نه تنها اثر سمی بر اندام‌های مورد ارزیابی مادر و جنین نداشت، بلکه اثرات درمانی مؤثری بر روند تکامل ریه جنین پس از بیماری عفونی مادر نشان داد.

**کلمات کلیدی:** استرپتوکوک پنومونیه، جنین، ریه، ساپونین، نانوذرات فریتین

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی؛ دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: زهره افتخاری، گروه زیست فناوری، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### مقدمه

در سطح جهانی، پنومونی یک نگرانی جدی برای سلامت عمومی و عامل اصلی مرگ و میر است (۱). علیرغم پیشرفت‌های وسیع در تولید داروهای ضد میکروبی، آزمایش‌های تشخیصی میکروبیولوژیکی و پروتکل‌های پیشگیرانه، پنومونی همچنان مهم‌ترین علت مرگ در سراسر جهان می‌باشد (۱). زنانی که قبل یا در حین بارداری به پنومونی مبتلا می‌شوند، در معرض خطر کم‌باروری، زایمان زودرس، نقص اندام‌های داخل

رحمی و نوزادی یا مرگ می‌باشند. علاوه بر این، پیامدهای نقص جنین عمدتاً در مادران مبتلا به بیماری‌های تنفسی زمینه‌ای رخ می‌دهد (۲). موارد شدید، پنومونی درمان نشده و تجویز داروهایی که توسط FDA تأیید نشده‌اند، مانند نانو داروهای گیاهی، می‌توانند عوارض مختلفی را ایجاد کنند. همچنین ممکن است باعث هیپوکسی، آمییم و ادم ریه و متعاقباً زایمان زودرس، وزن کم هنگام تولد، سقط جنین و نارسایی تنفسی در جنین شوند (۳).

شایع‌ترین پاتوژن‌هایی که بر پنومونی باکتریایی در بارداری تأثیر می‌گذارند، استریپتوکوک پنومونیه، هموفیلوس آنفولانزا و مایکوپلاسما پنومونیه می‌باشند (۴). استریپتوکوک پنومونیه شایع‌ترین علت پنومونی اکتسابی در جامعه است. مننژیت، باکتری، اوتیت میانی، سینوزیت، آرتریت، پریتونیت و اندوکاردیت از پیامدهای شایع آن می‌باشند (۵).

از آنجایی که داروهای گیاهی به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند و عوارض جانبی گیاهان دارویی در دوز مناسب و برنامه‌ریزی شده در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است، نقش درمانی آن‌ها در بیماری‌هایی با هدف شناسایی ترکیبات ضد التهابی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۶، ۷). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قوی می‌باشند و اغلب در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند (۸). شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* گیاهی از جنس *Glycyrrhiza* است که بومی جنوب اروپا، شمال آفریقا و آسیای معتدل می‌باشد (۹). همچنین حاوی فلاونوئیدها و ایزوفلاون‌ها، ترپنوئیدها، اسانس‌ها و نشاسته‌ها، قندهایی از جمله گلوکز و ساکارز، لیگنین، اسیدهای آمینه و موم است. یکی از اجزای مهم شیرین بیان ساپونین‌ها (گلیسیریزین و ۲۴-هیدروکسی گلیسیریزین) می‌باشند که ۵۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از نیشکر قدرت شیرین کنندگی دارند (۱۰). ساپونین‌ها گلیکوزیدهایی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که یک گروه قند به تری‌تری یا آگلیکون استروئیدی متصل دارند (۱۱). به دلیل مولکول‌های قطبی و چربی دوست آن‌ها که از کربوهیدرات‌ها یا تری‌ترپنوئیدها یا بخش‌های استروئیدی آگلیکون تشکیل شده‌اند، اثرات ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی را نشان می‌دهند (۱۲).

به دلیل اثرات مختلف ساپونین از جمله تعدیل سیستم ایمنی، مهار رادیکال‌های آزاد به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پتانسیل لیز سلول باکتری، از علم نانو تکنولوژی برای بهبود فرآیند درمان پنومونی استفاده شده است. اخیراً یکی از نانو ذرات مورد توجه فریتین است. براساس مطالعات، فریتین دارای خاصیت ضد باکتریایی است و در محافظت از DNA سلول و آسیب‌های اکسیداتیو و افزایش سرعت جذب سلولی نقش دارد. زیر واحدهای فریتین، زنجیره‌های پلی پپتیدی سنگین و سبکی می‌باشند که متناسب با زیر واحدهای مختلف متفاوت (۱۳) و به عنوان یک ناقل طبیعی برای فلزات عمل می‌کنند، اما می‌توانند حاوی ترکیبات مختلفی باشند (۱۳).

برخی از ویژگی‌هایی که فریتین را به عنوان یک فراورده مؤثر برای دارو رسانی تبدیل می‌کند شامل پایداری حرارتی قابل توجه و پایداری pH در بازه ۳-۱۰، پراکندگی داخلی، اندازه کوچک، زیست‌سازگاری، خواص ضد التهابی، ضد باکتریایی و تجزیه زیستی می‌باشد. بسیاری از دانشمندان از فریتین به عنوان یک حامل دارو با بارگذاری آن با مولکول‌های کوچک استفاده کرده‌اند (۱۴).

IFN- $\gamma$  یک سیتوکین التهابی است که توسط لنفوسیت‌های T و نوتروفیل‌ها بیان می‌شود و در تولید کموکاین‌ها و سیتوکین‌های التهابی مانند IL-8، IL-1، IL-6 و IFN- $\alpha$ ،  $\beta$  در طول عفونت‌های ویروسی و باکتریایی نقش دارد. TNF- $\alpha$  یک سیتوکین پیش التهابی و آغازگر مهم فرایندهای التهابی است که منجر به افزایش سطح IL-1، IL-6، II-6، متالوپروتئینازها و مولکول‌های چسبندگی و القای آنتی‌بادی‌های مرتبط با التهاب می‌شود. همچنین در تولید پروستاگلاندین‌ها، لکوترین‌ها و رادیکال‌های بدون اکسیژن و تولید کلاژنازها و پروتئاز که نقش مهمی در پاتوژنز آلوئول‌های بافت ریه دارند مؤثر است (۱۵).

KLF-2 در داخل دیواره عروق خونی و در سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود و افزایش سطح بیان KLF-2 باعث انتشار واسطه‌های پیش التهابی و ایجاد اختلال در هموستاز عروقی و ایجاد التهاب بیش از حد در بافت ریه و افزایش آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال می‌گردد (۱۶).

HB-EGF یک فاکتور رشد اپیدرمی است که توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها ساخته می‌شود و در تولید و تنظیم سطح مولکول‌های چسبندگی نقش دارد و افزایش سطح آن تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست ریه را افزایش می‌دهد. بیان بیش از حد MBD-2 در پنومونی، ماکروفاژ M2 را در ریه و سطح TGF- $\beta$ 1 را کاهش می‌دهد و می‌تواند باعث افزایش متیلاسیون DNA که یکی از مکانیسم‌های اصلی اپی‌ژنتیکی، بیماری‌های خود ایمنی و تومورزایی است، شود (۱۷).

بر اساس مطالعات انجام شده و با توجه به افزایش شیوع بیماری‌های تنفسی در سال‌های اخیر از یک سو و ایجاد مقاومت‌های میکروبی از سوی دیگر، مطالعه بر روی این اندام و ارزیابی فرآورده‌های نوین دارویی اهمیت بسزایی دارد. داروهای شیمیایی موجود برای درمان بیماری‌های عفونی سیستم تنفسی، عوارض نامطلوب قابل توجهی دارند. از این رو روش‌های متعددی به عنوان مکمل و جایگزین داروهای سنتتیک برای درمان این بیماری‌ها به کار می‌روند. واکنش نانو ذرات با بافت‌ها و اندام‌های بدن مادر مکانیسم پیچیده‌ای است که باید قبل از لقاح و همچنین در دوران بارداری مورد مطالعه قرار گیرد. در برخی موارد، درمان مادر با نانو ذرات، می‌تواند منجر به بروز التهاب و استرس اکسیداتیو در دوران آبیستی و جنین شود. در برخی شرایط، نانو ذرات ممکن است مستقیماً وارد جفت شوند و بر فرایندهای پیام‌رسانی سلولی و عملکرد اندام‌ها تأثیر بگذارند و در دوران بارداری باعث اختلال در رشد جنین شوند.

هدف از مطالعه حاضر ایجاد مدل حیوانی پنومونی در موش کوچک آزمایشگاهی سوئه (NMRI (Naval Medical Research Institute) و ارزیابی اثرات توکسیک نانو ساپونین بر تکوین ریه جنین‌ها بود. در این مطالعه علاوه بر ارزیابی هیستوپاتولوژی کبد و ریه مادر و جنین، بررسی TNF- $\alpha$  با کمک الایزا، بررسی بیان ژن‌های سیتوکین‌های پیش التهابی در ریه مادر (IFN- $\gamma$ ) Interferon gamma که نقش مهمی در ایمنی ذاتی و اکتسابی ایفا می‌کنند مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی بیان ژن‌های methyl-CpG binding domain protein (MBD-2) و heparin binding EGF like growth factor (HB-EGF) به‌عنوان ژن‌های مؤثر در پاتوژنز آئول‌های بافت ریه به ویژه ماکروفاژها و القای سیتوکین‌های التهابی دارند، مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

## مواد و روش کار

**مواد:** فریتین تجاری از شرکت سیگما (CAS f7879)، کلروفرم، DMSO، غشاء دیالیز (MWCO 12000 Da) و PBS از شرکت Merck، آلمان، کیت‌های استخراج RNA و سنتز cDNA از (شرکت Fermentas، ایالات متحده آمریکا)، موش‌های کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI از بخش علوم حیوانات انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران)، کتامین از شرکت Kepro B.V، هلند، زایلازین (شرکت: آلفاسان)، هماتوکسیلین (Sigma-H9627)، اتوزین (Sigma-HT110116)، اسید پرودیک (Sigma-3758)، معرف شیف (Sigma-3952016)، بافر رپا (Sigma-632424) Radio immunoprecipitation assay (RIPA)، سدیم دودسیل سولفات-پلی‌آکریل آمید از Bio-Rad، USA، CA، Hercules و کیت سنجش آنتی‌اکسیدان از ZellBio GmbH، کیت Masson Trichrome Stain (HT15) از Sigma، آلمان تهیه شد.

**تهیه عصاره ساپونین خام:** ریشه گیاه شیرین‌بیان از انستیتوی گیاهان پزشکی ایران تهیه شد. ریشه‌های گیاه شیرین‌بیان جهت افزایش سطح تماس با حلال، خرد و آسیاب شدند. استخراج ساپونین خام از ریشه گیاه شیرین‌بیان با حرارت دادن ۵۰ گرم نمونه پودر شده به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول (۲۰ درصد) انجام شد؛ عصاره فیلتر و باقیمانده مجدد با ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول (۲۰ درصد) ترکیب شد، سپس عصاره بر روی حمام آب قرار گرفت تا حجم نمونه به ۴۰ میلی‌لیتر کاهش یابد، سپس در یک قیف جدا کننده با ۲۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر مخلوط شد. مخلوط به‌شدت تکان داده سپس قیف در یک پایه جهت گسترش لایه آبی و دی اتیل ثابت شد سپس قسمت آبی جمع‌آوری و بخش دی اتیل اتر دور ریخته شد، سپس به لایه آبی، آن بوتانول (۶۰ میلی‌لیتر) افزوده و با تکان دادن شدید مخلوط گردید. به عصاره آن بوتانول ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۵ درصد اضافه و محلول حاصل بر روی دستگاه همزن چرخشی جهت حذف الکل و مایعات قرار گرفته و سپس ساپونین خام جمع‌آوری شده با کمک آون خشک شد (۱۹).

**کپسوله‌سازی ساپونین توسط نانوذرات فریتین:** کپسوله‌سازی ساپونین با کمک فریتین به روش جداسازی و مونتاژ مجدد (Disassembly-Reassembly Process) بر اساس مطالعات قبلی انجام شد؛ به طور خلاصه، پروسه جداسازی و مونتاژ مجدد فریتین طبیعی با تغییر pH صورت گرفت به طوری که ۱ میلی‌گرم فریتین در ۱ میلی‌لیتر محلول تهیه شده با کلرید سدیم و اسید هیدروکلریک مخلوط گردید. سپس فریتین اسیدی (pH=۲) به مقدار ۵ میکرولیتر به محلول ساپونین ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (pH=۹) افزوده و مخلوط به مدت ۲ ساعت روی یخ انکوبه شد. جهت تأیید نانوذره، از روش پراکندگی نور دینامیکی که یک روش فیزیکی برای تعیین اندازه و توزیع نانوذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها است، استفاده شد (۲۰).

**حیوانات مورد مطالعه:** در مطالعه حاضر از ۵۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده نژاد NMRI با وزن ۲۸-۲۲ گرم و ۶ سر موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI با وزن ۳۰-۲۵ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد، استفاده گردید. همه موش‌ها پس از معاینه اولیه و اطمینان از وضعیت سلامتی به آزمایشگاه حیوانات منتقل شدند. حیوانات در دمای ثابت ( $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد)، دوره نوری نرمال ۱۲ ساعت شب و ۱۲ ساعت روز و رطوبت  $50 \pm 15$  درصد در قفس‌های پلی‌کربنات نوع III با درب فولادی ضد زنگ در ۵ گروه ۱۰ تایی قرار گرفتند. موش‌ها با غذای تجاری و آب تغذیه شدند. کلیه مراحل مطالعه حاضر مطابق آیین‌نامه کمیته ملی اخلاق تحقیقات ایران انجام شد (IR.IAU.SRB.REC.1400.199).

**القای پنومونی:** پس از تهیه پلیت‌های خون آگار،/ستریپتوکوک پنومونیه، سروتیپ ۴، سویه TIGR4، یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با  $CO_2$  ۵ درصد قرار گرفت. سپس کلنی‌ها در محیط کشت تاد هویت براث (Todd Hewitt Broth) حاوی ۱ درصد عصاره مخمر تلقیح شدند، به صورت تصاعدی رشد کردند و براساس مشخصات کلنی کشت شده باکتری مورد نظر تأیید شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده با غلظت مناسب ( $10^6$  واحد تشکیل کلنی در هر میلی‌لیتر / به ازای هر موش) برای القای عفونت از طریق داخل نایی با کمک کاتتر داخل نایی تلقیح شد (۲۱). از کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی برای بیهوشی موش استفاده شد. همه موش‌ها تا زمانی که از بیهوشی بهبود یابند، زیر یک لامپ حرارتی مادون قرمز قرار گرفتند (۲۲).

**طراحی مطالعه حیوانات:** پس از سه روز از تلقیح باکتری بر اساس علائم بالینی جهت تأیید پنومونی، ۵ سر موش از گروه مدل پنومونی بدون درمان کشته شدند و نمونه‌های خون و بافت ریه از نظر ژن‌ها و فاکتورهای مربوطه بررسی شدند. تیمار حیوانات باقی مانده بر اساس پروتکل‌های طراحی شده انجام شد، فریتین، ساپونین و ساپونین کپسوله شده توسط نانوذرات فریتین (نانو ساپونین) به مدت ۷ روز گاوژ شد. پس از ۷ روز تیمار، ۵ سر از حیوانات گروه مدل پنومونی بدون درمان (گروه ۲) و ۵ سر از گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین (گروه ۵) با ۳ سر موش نر در یک قفس جهت جفت‌گیری قرار گرفتند، موش‌های ماده تا ۳ روز متوالی هر روز از نظر تشکیل پلاک واژینال بررسی شدند. با مشاهده و لمس پلاک واژینی، بارداری تأیید شد و روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. در روز ۲۰ بارداری، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به روش بی‌درد معدوم شدند. تعداد جنین‌ها در دو گروه شمارش شد و پس از آن، ریه، رحم، کبد و سرم مادر و ریه و سرم جنین برای مطالعات بیشتر جمع‌آوری شد.

گروه ۱: موش‌های سالم به‌عنوان گروه کنترل PBS دریافت کردند (تعداد=۱۰).

گروه ۲: پنومونی به‌عنوان گروه کنترل بیمار بدون درمان (تعداد=۱۰).

گروه ۳: پنومونی تیمار شده با فریتین (۱۰۰ میکرولیتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (تعداد=۱۰) (۲۳).

گروه ۴: پنومونی تیمار شده با ساپونین (۱۰۰ میکرولیتر ۲۰ میکرومول) (تعداد=۱۰) (۲۴).

گروه ۵: پنومونی تیمار شده با ساپونین کپسوله شده توسط نانوذرات فریتین (نانو ساپونین) (۱۰۰ میکرولیتر از ۲۰ میکرومول ساپونین+ ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فریتین) (تعداد=۱۰).

**تأیید بارداری با رنگ آمیزی گیمسا:** برای تأیید بارداری موفق موش‌ها، نمونه‌های سیتولوژی واژینال ۳ روز پس از جفت‌گیری جمع‌آوری شد. برای شستشوی واژن از سالیین بافر فسفات استفاده شد. به طور خلاصه، لام‌ها در محلول ۵ میلی‌لیتری گیمسا قرار داده شدند، سپس ۹۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH ۸/۶ اضافه شد و لام‌ها پس از شستشو خشک شدند (۲۵).

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR):** برای بررسی سطح بیان ژن‌های  $IFN-\gamma$ ، MBD-2 و HB-EGF، در بافت ریه مادر در گروه‌های موش باردار و غیرباردار، از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد. تحت شرایط بدون RNase، RNA کل از بافت ریه استخراج شد و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج سلول‌ها از نمونه‌های بافت، تریزول به لوله‌های حاوی سلول‌های تیمار شده اضافه و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس کلروفورم به لوله‌ها افزوده و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون سلول‌ها روی یخ، نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محتویات به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری بدون RNase که حاوی حجم مساوی ایزوپروپانول بودند منتقل و سانتریفیوژ



گردید. RNA استخراج شده مجدداً در اتانول ۷۵ درصد ترکیب و سانتریفیوژ شد و در  $H_2O$  تیمار شده با دی اتیل DEPC ترکیب شد. سپس با افزودن ۱۰ میکرولیتر بافر واکنش (2X)، ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر آنزیم مخلوط به مقدار کافی آب تیمار شده با DEPC در لوله‌های بدون RNase برای تشکیل ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و واکنش با حرارت دادن در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه متوقف و مخلوط روی یخ نگهداری گردید (۲۶).

برای اطمینان از خلوص RNA از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پرایمر Forward و توالی نوکلئوتیدی Revers ژن‌های  $IFN-\gamma$ ، MBD-2 و HB-EGF در موش‌ها پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA طراحی شدند و از طریق نرم‌افزار الیگو ۷ و سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند تا از اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود (جدول ۱). هر واکنش PCR با استفاده از Applied Biosystems PCR master mix سایبر گرین در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems, Foster City) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. GAPDH به عنوان یک ژن استاندارد (housekeeping) مورد استفاده قرار گرفت (۲۷).

**تجزیه و تحلیل وسترن بلات پروتئین KLF-2:** نمونه بافت ریه موش توسط بافر رپا Radio immunoprecipitation assay (RIPA) حاوی بازدارنده پروتئاز همگن و سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه). سپس، فاز رویی برای تعیین محتوای پروتئین کل با روش لوری جمع‌آوری شد. نمونه‌های هموزن شده (۵۰ میکروگرم) بر روی ۱۲/۵ درصد سدیم دودسیل سولفات - پلی‌آکریل آمید (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) به روش الکتروفورز شناسایی شدند و متعاقباً پروتئین‌ها به غشاء پلی‌وینیلیدین فلوراید (PVDF) انتقال یافتند، غشاءها در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه با محلول مسدود کننده (۵ درصد شیر بدون چربی) انکوبه شدند. از آنتی‌بادی‌های اولیه مخصوص KLF-2 به مدت ۱۲۰ دقیقه روی دستگاه همزن چرخشی استفاده شد. غشاءها سه بار با تریس بافر سالین Tween 20 شسته و سپس یک آنتی‌بادی ثانویه به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق به دستگاه همزن چرخشی اضافه شد. شدت باند به دست آمده از هر عصاره پروتئین در برابر مقادیر متناظر باندهای پروتئین GAPDH استاندارد شده و چگالی باند پروتئین با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد (۲۸).

**رنگ آمیزی تری کروم بافت کبد موش مادر:** جهت رنگ‌آمیزی با تری کروماتون لام‌ها را با استفاده از درجات نزولی الکل آب‌دهی، سپس در محلول بوئن به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو ۵۶ درجه قرار داده شد. سپس با آب مقطر شسته و هماتوکسیلین Weigert بر روی بافت‌ها ریخته شد. اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شسته و سپس آب خشک و مجدداً به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در محلول اسید فوشین قرار گرفت. پس از شستشو با آب مقطر، حدود ۱۵-۱۰ دقیقه محلول اسید فسفوسرین و اسید فسفومولیبدیک روی لام‌ها ریخته و به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در محلول آبی آنیلین غوطه‌ور ماند. نمونه‌ها با آب مقطر شسته و به مدت ۲ تا ۵ دقیقه در اسید استیک ۱ درصد به صورت غوطه‌ور قرار گرفتند. در پایان اسلایدها با آب مقطر شسته و با الکل آبگیری شدند (۲۹).

**هیستوپاتولوژی رحم موش مادر:** نمونه‌های بافت رحم در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای فرایندهای بافتی تثبیت شدند. نمونه‌های ثابت در پارافین جاسازی و مقاطع بافتی (ضخامت ۴ تا ۶ میکرومتر) برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین تهیه شد. از میکروسکوپ نوری برای ارزیابی هیستوپاتولوژی بافت رحم استفاده گردید (۳۰).

**ارزیابی سیتوکین التهابی در بافت ریه جنین با روش الایزا:** برای ارزیابی سیتوکین التهابی  $TNF-\alpha$ ، بافت ریه با یک قیچی استریل جدا شد تا از تخریب توسط پروتئازها جلوگیری شود. ۱۰۰ میلی‌گرم بافت به ۱ میلی‌لیتر بافر رپا Radio immunoprecipitation assay (RIPA) اضافه شد و نمونه‌ها در محل خنک به مدت حدود ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه همگن شدند. بر اساس اطلاعات شرکت سازنده کیت، مراحل انجام شد و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط ELISA reader قرائت گردید.

**ارزیابی پارامترهای استرس اکسیداتیو در بافت ریه جنین:** برای ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و وضعیت کل اکسیدانی (TOS) نمونه‌های بافت ریه جنین جدا و لیز شده با استفاده از کیت معرف طبق دستورالعمل شرکت سازنده ارزیابی شد. به طور خلاصه، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده RIPA ریخته شد. نمونه‌ها به مدت حدود ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ همگن شدند و مایع رویی برای مطالعات بیشتر بر اساس پروتکل‌های شرکت سازنده جدا شد.

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده در Real-time PCR.

Reverse primer (3'-5')	Forward primer (5'-3')	ژن
ATCTCTCCCATCAGCAGCAC	ACTCTGATTGCGGGGTTGTATCT	IFN- $\gamma$
AGGCATTTGGAAGAGGGAGT	AGAAAGGAAAGGGGTTAGGGA	HB-EGF
GTTACGCCTCATCTCCACTGTCC	ACACGAAGAGCGAGTCCAACAAG	MBD-2
ACACATTGGGGGTAGGAACA	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GAPDH

**هیستوپاتولوژی ریه جنین:** نمونه‌های بافت ریه جنین در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای فرایندهای بافتی تثبیت شدند. نمونه‌های ثابت در پارافین جاسازی شدند و مقاطع سریالی با ضخامت ۵ میکرومتر برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین تهیه شد (۳۰). در نهایت با میکروسکوپ نوری (LABOMED) عکس برداری شد.

**روش تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به نتایج مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Prism (Graph Pad Prism 5.04) و تست One way-ANOVA و Tukey مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (mean  $\pm$  S.D) بیان شدند.

## نتایج

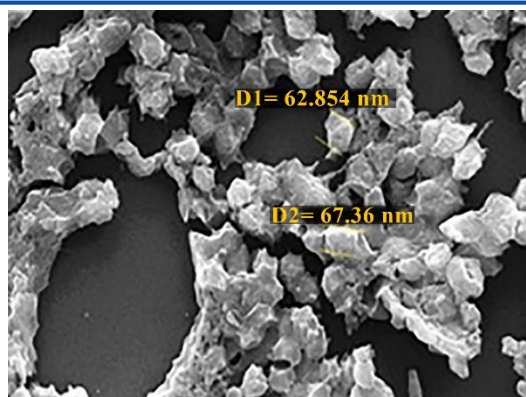
**توزیع اندازه و مورفولوژی نانوذرات:** بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، مورفولوژی نانوذرات سنتز شده به صورت اشکال کروی و با چگالی بالا بود. همچنین اندازه نانوذرات سنتز شده در تست پراکندگی نور دینامیکی قابل تأیید بود. نتایج به دست آمده از آزمایش پراکندگی نور دینامیکی نشان داد که اندازه نانوذرات سنتز شده در محدوده قطر ذرات ۶۲/۸۵-۶۷/۳۶ نانومتر و سطح باردار مثبت با مقدار زتا  $mV$  ۲۲/۵- بود (تصویر ۱).

**تأیید بارداری و ارزیابی تعداد جنین‌ها:** اسپرم سالم با باروری کافی به دنبال جفت‌گیری با موش‌های ماده مبتلا به پنومونی و پنومونی تیمار با نانو ساپونین دیده شد. تجزیه و تحلیل و مقایسه تعداد جنین‌های موش‌های مبتلا به پنومونی تیمار شده با PBS (۲/۶۶  $\pm$  ۲/۵۱) و موش‌های مبتلا به پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین (۸/۶۶  $\pm$  ۲/۰۸)، افزایش معنی‌دار آماری را در گروه نانو ساپونین نشان داد ( $P < 0/05$ ) (تصویر ۲).

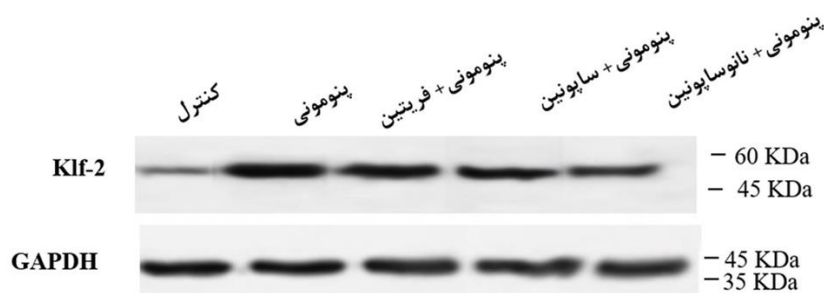
**بیان ژن‌های IFN- $\gamma$ ، MBD-2 و HB-EGF (بیان ژن IFN- $\gamma$ ):** بر اساس نتایج به دست آمده میزان بیان ژن IFN- $\gamma$  در گروه کنترل بیمار (۱/۰۵۰  $\pm$  ۰/۰۰۸) در مقایسه با گروه کنترل سالم (۱/۰۲۴  $\pm$  ۰/۰۰۶) افزایش معنی‌داری داشت و تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۲/۲۰  $\pm$  ۰/۰۰۵) باعث کاهش آماری معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل بیمار (۱/۰۵۰  $\pm$  ۰/۰۰۸) شد ( $P < 0/05$ ).

**بیان ژن MBD-2:** میزان بیان ژن MBD-2 در گروه کنترل بیمار (۲/۴۰  $\pm$  ۰/۰۰۵) در مقایسه با گروه کنترل سالم (۱/۰۵۴  $\pm$  ۰/۰۰۹) افزایش معنی‌داری داشت، همچنین نتایج نشان داد تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۲/۵۷۳  $\pm$  ۰/۰۰۱) منجر به کاهش آماری معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل بیمار (۲/۴۰  $\pm$  ۰/۰۰۵) شد و تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۲/۵۷۳  $\pm$  ۰/۰۰۱) تغییر آماری معنی‌داری در این پارامتر در مقایسه با حیوانات پنومونی تیمار شده با ساپونین (۴/۶۸۵  $\pm$  ۰/۰۰۱) ایجاد نکرد ( $P < 0/05$ ) ( $P < 0/01$ ).

**بیان ژن HB-EGF:** نتایج نشان داد میزان بیان ژن HB-EGF در گروه کنترل بیمار (۱/۱۰۴  $\pm$  ۰/۰۰۷) در مقایسه با گروه کنترل سالم (۱/۰۵۸  $\pm$  ۰/۰۰۴) تغییر معنی‌داری نداشت، همچنین تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۱/۹۹  $\pm$  ۰/۰۰۴) باعث کاهش آماری معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل بیمار (۱/۱۰۴  $\pm$  ۰/۰۰۷) شد و تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۱/۹۹  $\pm$  ۰/۰۰۴) باعث کاهش آماری معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با حیوانات پنومونی تیمار شده با ساپونین (۲/۹۶  $\pm$  ۰/۰۰۵) شد ( $P < 0/05$ ). همچنین بر اساس نتایج تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۰/۵۲  $\pm$  ۰/۰۰۴) قبل از جفت‌گیری باعث کاهش آماری معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل بیمار (۲/۰۳  $\pm$  ۰/۰۰۷) شد ( $P < 0/05$ ).



تصویر ۱. مورفولوژی نانو ساپونین با میکروسکوپ الکترونی نگاره.



تصویر ۲. سنجش وسترن بلات برای ارزیابی سطوح پروتئین در KLF-2 و GAPDH.

### بیان پروتئین KLF-2: تصویر ۳ سطح بیان پروتئین‌های KLF-2 و GAPDH را در بافت ریه از طریق نوارهای وسترن بلات

نشان می‌دهد، بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری بیان پروتئین KLF-2 میزان بیان پروتئین KLF-2 در گروه کنترل بیمار (۱/۱۵۵±۰/۰۰۸) در مقایسه با گروه کنترل سالم (۰/۳۲±۰/۰۰۵) افزایش معنی‌داری داشته است، تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۰/۶۷±۰/۰۰۵) و ساپونین (۰/۷۱±۰/۰۰۵) باعث کاهش آماری معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گروه کنترل بیمار (۱/۵۵±۰/۰۰۸) شد و همچنین نتایج نشان داد تیمار حیوانات پنومونی با نانو ساپونین (۰/۶۷±۰/۰۰۵) تغییر آماری معنی‌داری در این پارامتر در مقایسه با حیوانات پنومونی تیمار شده با ساپونین (۰/۷۱±۰/۰۰۵) ایجاد نکرد ( $P < 0.001$ ).

### رنگ‌آمیزی تری کروماتون کبد موش‌های مادر: تصویر ۴A و ۴B نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد موش NMRI را در هر دو

گروه موش باردار تیمار شده با PBS و نانو ساپونین نشان می‌دهد. بر اساس نتایج آماری درصد رسوب کلاژن در بافت‌های کبد جدا شده از مادران مبتلا به پنومونی که قبل از جفت‌گیری نانو ساپونین دریافت کرده بودند (۲±۲ میکرومتر) در مقایسه با مادران مبتلا به پنومونی بدون درمان (۳±۵۵ میکرومتر) از نظر آماری کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.001$ ).

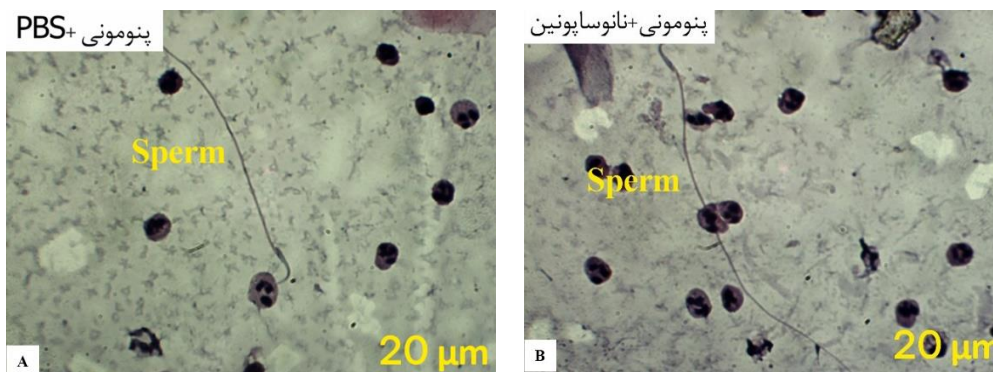
### هیستوپاتولوژی رحم: تصویر ۵A و ۵B هیستوپاتولوژی بافت رحم موش NMRI را در گروه‌های پنومونی تیمار شده با PBS و

نانو ساپونین موش باردار نشان داد. ضخامت لایه آندومتر بافت رحم در پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین (۵۳±۵۴ میکرومتر) نسبت به پنومونی تیمار شده با PBS (۶۶±۱۰۵ میکرومتر) افزایش معنی‌داری نشان داد، به طوری که اپیتلیوم مکعبی طبقه‌بندی شده منظم شامل لایه‌های سلولی متعدد در گروه نانو ساپونین مشاهده شد. علاوه بر این، در گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین، افزایش عمق غدد در لایه اپیتلیوم غددی و ضخامت لایه آندومتر با عروق مناسب نسبت به گروه پنومونی تیمار شده با PBS مشاهده شد ( $P < 0.001$ ).

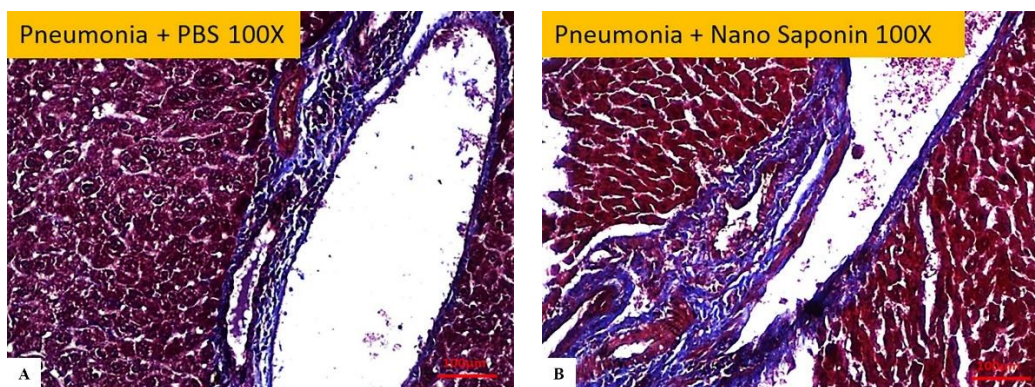
### ارزیابی سیتوکین‌های التهابی TNF-α در موش‌های ماده باردار: سطح بیان سیتوکین التهابی TNF-α کاهش معنی‌داری را

در گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین (۵/۰۱±۷۶/۸۱ نانوگرم بر لیتر) در مقایسه با جنین‌های متولد شده از مادران پنومونی بدون درمان (۴۴/۱۱۲±۱۵ نانوگرم بر لیتر) نشان داد ( $P < 0.005$ ).





تصویر ۳. ارزیابی لقاح موفق از طریق اسپرم بارور از طریق رنگ‌آمیزی گیمسا. (A) گروه پنومونی تیمار شده با PBS و (B) پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین.



تصویر ۴. (A) تصاویر هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش‌های باردار پنومونی تیمار شده با PBS و (B) موش‌های باردار پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین قبل از جفت‌گیری را نشان می‌دهد.

**پارامترهای استرس اکسیداتیو در بافت ریه جنین:** نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که سطح TAC در بافت ریه جنین متولد شده از مادران تیمار شده با نانو ساپونین ( $0.81 \pm 0.07$  میلی‌مولار) قبل از جفت‌گیری نسبت به مادران مبتلا به پنومونی بدون درمان ( $0.20 \pm 0.11$  میلی‌مولار) از نظر آماری افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.01$ )، سوی دیگر سطح TOS در بافت ریه جدا شده از موش‌های جنینی که از مادران پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین ( $0.72 \pm 0.17$  میکرومولار) متولد شده‌اند، نسبت به مادران مبتلا به پنومونی ( $1.32 \pm 0.23$  میکرومولار) از نظر آماری کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

**ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت ریه جنین:** تصویر ۶A و ۶B هیستوپاتولوژی بافت ریه جنین موش با کمک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین را در گروه‌های پنومونی تیمار شده با PBS و پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین نشان می‌دهد. در ریه جدا شده از جنین‌های متولد شده از موش‌های مبتلا به پنومونی سپتوم آلوئولی ضخیم با نفوذ لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها، افزایش میزان مخاط و خونریزی مشاهده شد. در حالی که در گروه تیمار شده با نانو ساپونین، برونش‌های طبیعی داشتند و میزان خونریزی، نفوذ سلول‌های التهابی و ضخامت دیواره آلوئول‌ها در مقایسه با گروه پنومونی کاهش یافت ( $66.2 \pm 0.57$  میکرومتر).

بر اساس نتایج آماری میانگین التهاب، ترشح مخاط و نمرات کل در ریه جنین‌های متولد شده از گروه پنومونی که PBS تجویز شده بود به ترتیب  $2.33 \pm 0.57$ ،  $3.3 \pm 0.5$  و  $5.6 \pm 0.33$  به دست آمد در حالی که در گروهی که نانو ساپونین دریافت کردند به ترتیب  $0.57 \pm 0.5$ ،  $1.33 \pm 0.3$  و  $1.66 \pm 0.5$  گزارش شد که تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$ ).

## بحث

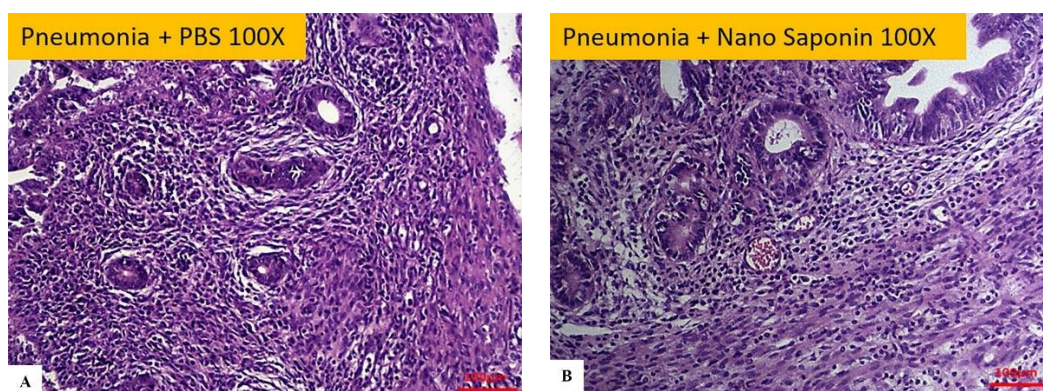
ساپونین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدباکتریایی می‌باشند که می‌توانند اثرات نامطلوب میکروارگانیسم‌های مرتبط با عفونت‌های ریوی را بهبود بخشند (۳۱). با توجه به این‌که این ترکیبات طبیعی به تنهایی یا در ترکیب با نانوذرات به دنبال تجویز در

دوران بارداری یا قبل از آن، ممکن است تأثیر نامطلوبی بر دوران بارداری مادر و ارگان‌های جنین بگذارند، مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثرات احتمالی توکسیک نانو ساپونین بر روی مادر و جنین طراحی شد.

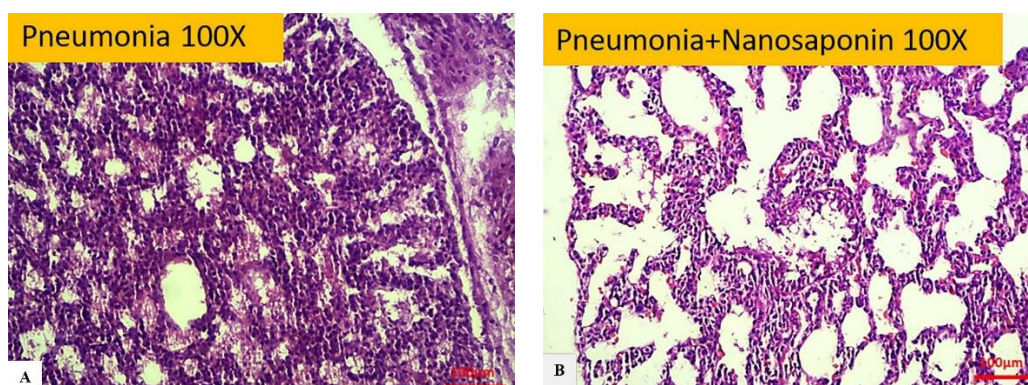
بر اساس نتایج به دست آمده، میزان سطح  $TNF-\alpha$  در ریه جنین به دنبال تیمار مادر با نانو ساپونین کاهش یافت. همچنین خواص ضدالتهابی نانو ساپونین‌ها احتمالاً با کاهش بیان ژن‌های  $IFN-\gamma$  و  $MBD-2$  و  $KLF-2$  مرتبط بود. نتایج هیستوپاتولوژیک ریه و رحم، بیانگر کاهش التهاب آئول‌ها و برونش‌ها، افزایش خون‌رسانی به آندومتر و افزایش تعداد جنین‌های زنده و میزان بارداری موفق به دنبال تجویز نانو ساپونین بود. از سوی دیگر، احتمالاً نانو ساپونین با مهار تولید  $HB-EGF$  و با تعدیل فعالیت فیبروبلاست از تخریب آئول و کیسه هوایی جلوگیری نمود.

در مطالعه حاضر بیان ژن  $IFN-\gamma$  در گروه پنومونی بدون درمان به طور قابل توجهی به دلیل افزایش نوتروفیل‌ها بیشتر بود. جالب توجه است که در موش‌های تیمار شده با نانو ساپونین احتمالاً به دلیل خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها با مهار و کاهش هجوم نوتروفیل‌ها، بیان ژن  $IFN-\gamma$  به طور مداوم کاهش یافت. در نتیجه، سطح بیان ژن  $IFN-\gamma$  در گروه تیمار شده با نانو ساپونین هیچ تغییری در مقایسه با گروه کنترل سالم نشان نداد در حالی که کاهش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل بیمار نشان داد. کاهش  $IFN-\gamma$  درون‌زا با کاهش  $IL-6$  و  $IL-12$ ، نقش محافظتی در دفاع در برابر پاتوژن‌ها داشت. اما این داده‌ها در توافق با مطالعات قبلی، نقش پیچیده  $IFN-\gamma$  را در ایمنی ذاتی در طول عفونت ریوی و پس از درمان با داروهای مبتنی بر طبیعی و داروهای نانو گیاهی نشان دادند (۳۲).

$IFN-\gamma$  که عمدتاً توسط لنفوسیت‌های T و نوتروفیل‌ها تولید می‌شود، نقش اساسی در دفاع بدن در برابر بیماری‌های عفونی آئولولی ایفا می‌کند و به عنوان یک واسطه مهم در ایمنی ضد ویروسی و پاسخ‌های التهابی شناخته می‌شود. بنابراین  $IFN-\gamma$  به عنوان یک سیتوکین التهابی، اثرات خود را با اتصال به یک گیرنده منفرد، که در اکثر انواع سلول‌ها و متعاقباً در پنومونی ویروسی و باکتریایی بیان می‌شود، اعمال می‌کند و به طور مداوم در سطوح سرمی افزایش می‌یابد (۳۲، ۳۳).



تصویر ۵. (A) تصاویر میکروسکوپ نوری از بافت رحم با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین در موش‌های باردار پنومونی تیمار شده با PBS. (B) موش‌های باردار پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین قبل از جفت‌گیری را نشان می‌دهد.



تصویر ۶. تصاویر میکروسکوپی از بافت ریه جنین، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). (A) جنین‌های متولد شده از موش‌های پنومونی تیمار شده با PBS. (B) جنین متولد شده از موش‌های باردار پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین.



Jagdman و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند افزایش ترشح  $\text{IFN-}\gamma$  منجر به اختلال در پاسخ‌های ایمنی، خونریزی بافت ریه و افزایش التهاب و پاتوژن آلوئول‌ها و افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۴). Burman و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند  $\text{IFN-}\gamma$  با اثر مستقیم بر پارانشیم ریه، در مهاجرت و گسترش میکروارگانیزم‌های پاتوژن در داخل ریه نقش دارد (۳۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار با نانوساپونین به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان ژن  $\text{MBD-2}$  می‌شود. با توجه به این‌که  $\text{MBD-2}$  یک محصول القایی از اپیتلیوم مسیر هوایی می‌باشد و ممکن است در دفاع ذاتی مخاط ریه نقش داشته باشد، این ژن می‌تواند سیتوکین‌های التهابی را از طریق مکانیسم وابسته به مسیر سیگنال  $\text{ERK1/2}$  افزایش دهد. بنابراین  $\text{MBD-2}$  ممکن است در پاتوژن پنومونی و بیماری‌های ریوی مانند COPD نقش داشته باشد (۳۶). Wang و همکاران در سال ۲۰۲۱ طی مطالعه‌ای بر روی موش مدل فیبروز ریوی گزارش کردند که افزایش قابل توجهی در سطح سرمی  $\text{MBD-2}$  در بیماران مبتلا به پنومونی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد، که  $\text{MBD-2}$  با مهار مسیر فعال شدن ماکروفاژ  $\text{M2}$  به عنوان یک هدف مناسب در برابر فیبروز ریوی عمل می‌کند (۳۷).

$\text{MBD-2}$  سرکوب یا فعال‌سازی رونویسی را با اتصال مستقیم به DNA متیله CpG و جذب پروتئین‌ها برای تشکیل یک کمپلکس سرکوب‌کننده واسطه‌گری می‌کند. مطابق با نتایج محققین در مطالعه حاضر، گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین، کاهش بیان ژن  $\text{MBD-2}$  را در مقایسه با موش‌های پنومونی بدون درمان نشان دادند. این کاهش منجر به کاهش التهاب در اپیتلیوم برونش‌ها شد. با این حال، تغییرات  $\text{MBD-2}$  به دلیل پنومونی و درمان به دنبال آن هنوز ناشناخته است و از آنجایی که  $\text{MBD-2}$  نقش‌های متعدد و پیچیده‌ای در تنظیم ترشح سیتوکین ایفا می‌کند، تجویز نانو ساپونین در موش‌های پنومونی می‌تواند بیان این ژن را کاهش دهد و متعاقباً باعث تخفیف اثرات نامطلوب پنومونی در موش‌های مبتلا به پنومونی شود. مطابق با نتایج مطالعه حاضر و مقایسه آن با مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که  $\text{MBD-2}$  می‌تواند در تنوع سلول‌های  $\text{Th17}$  شرکت کند و بنابراین در پاتوژن مدل پنومونی شرکت می‌کند (۳۷).

Zeng و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند افزایش بیان  $\text{MBD-2}$  با افزایش سطوح  $\text{IL-6}$  و  $\text{IL-8}$  باعث افزایش التهاب مزمن راه هوایی می‌شوند و تیمار با ساپونین با کاهش سطح  $\text{IL-8}$  و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در کاهش بیان  $\text{MBD-2}$  التهاب راه هوایی مؤثر می‌باشد. Wang و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند افزایش  $\text{MBD-2}$  تولید فاکتور رشد ( $\text{TGF-}\beta 1$ ) را کاهش می‌دهد و به دنبال آن تجمع ماکروفاژ  $\text{M2}$  در ریه کاهش می‌یابد. افزایش سطح  $\text{MBD-2}$  می‌تواند منجر به اختلال در متیلاسیون DNA و سرکوب فعال‌سازی رونویسی شود و از این طریق در پاتوژن آسیب‌های ایسکمیک نقش خود را ایفا کند (۳۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار با ساپونین و نانو ساپونین به صورت معنی‌داری با کاهش بیان سطح ژن  $\text{HB-EGF}$  مانع پیشرفت پنومونی می‌شود و از تغییرات هیستوپاتولوژیک در رحم و ریه مادر و ریه جنین جلوگیری می‌کند، یافته‌های قبلی نشان داد که  $\text{HB-EGF}$  ممکن است با تحریک  $\text{IL-8}$  از اپیتلیوم راه هوایی که می‌تواند باعث تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌های ریه شود، در آسیب‌شناسی فیبروز راه هوایی نقش داشته باشد. نقش  $\text{HB-EGF}$  در آزادسازی سیتوکین/کمکین ممکن است مختص سلول‌های اپیتلیال باشد. مطالعات نشان داده‌اند که بیان  $\text{IL-8}$  و به دنبال آن افزایش  $\text{HB-EGF}$  باعث افزایش انفیلتراسیون نوتروفیل در مجاری هوایی بیماران مبتلا به COPD و آسم می‌شود؛ بنابراین، استفاده از عوامل درمانی با مهار اثرات تولید  $\text{IL-8}$  و  $\text{HB-EGF}$  می‌تواند با تعدیل فعال شدن فیبروبلاست از ایجاد فیبروز مسیرهای هوایی جلوگیری کند (۳۹، ۴۰). Wang و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند  $\text{HB-EGF}$  با تحریک  $\text{IL-8}$  از اپیتلیوم کیسه‌های هوایی باعث تکثیر و مهاجرت فیبروبلاست‌های ریه می‌شود و ممکن است در پاتوژن آلوئول‌ها و برونش‌ها دخیل باشد (۳۹).

Park و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای نشان دادند ساپونین جدا شده از جین سینگ با تعدیل بیان  $\text{MIR-21-5p}$  اثر مثبت بر سلول‌های استرومایی آندومتر در بیماران مبتلا به اندومتریوز دارد و در بهبود وضعیت باروری می‌تواند مؤثر باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار با نانو ساپونین به صورت معنی‌داری باعث کاهش بیان پروتئین‌های  $\text{KLF-2}$  می‌شود (۴۱).

Weinreich MA و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند افزایش بیان پروتئین  $\text{KLF-2}$  باعث افزایش انتشار واسطه‌های التهابی ( $\text{IL-1}$ ،  $\text{IL-6}$ ،  $\text{TNF-a}$ ) در اپیتلیوم ریوی و اندوتلیوم می‌شود. ساپونین به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کاهش بیان این پروتئین به واسطه کاهش انتشار واسطه‌های التهابی مؤثر می‌باشد (۴۲).

Prerana و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند افزایش بیان KLF-2 باعث اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های T و مونوسیت‌ها می‌شود همچنین در پیشرفت پنومونی و پاتوژن آن نقش دارد و بیان سایتوکین‌های پیش التهابی، کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبنده را افزایش می‌دهد. KLF-2 ممکن است به عنوان یک تعدیل‌کننده اندوتلیال عمل کند که به تنظیم گیرنده‌های تشخیص الگوی مرتبط با پاسخ ایمنی ذاتی کمک می‌کند. قرار گرفتن سلول‌های اپیتلیال ریه در معرض پنوموکوک‌های گرم مثبت منجر به بیان پروتئین KLF-2 می‌شود و به نظر می‌رسد شدت عفونت بر بیان آن تأثیر داشته باشد (۴۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار با ساپونین و نانو ساپونین به صورت معنی‌داری با کاهش سطح TNF- $\alpha$  مانع پیشرفت پنومونی می‌شود. بر اساس ارزیابی هیستوپاتولوژیک ریه جنین، جنین‌هایی که از موش‌های مبتلا به پنومونی قبل از جفت‌گیری و بدون درمان متولد شدند، دیواره سپتوم آلوئولی بانفوذ لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها افزایش یافت، ترشح مخاط افزایش یافت و خونریزی مشاهده شد. مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با نانو ساپونین میزان TNF- $\alpha$  در بافت ریه جنین را در مقایسه با گروه پنومونی کاهش می‌دهد؛ بنابراین، یک مادر مبتلا به استرپتوکوک پنومونیه قبل از بارداری می‌تواند مبتلا به نارسایی تنفسی و اختلال رشد ریه شود.

Lucas و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند افزایش سطح TNF- $\alpha$  در پنومونی به واسطه افزایش سیگنال‌دهی TNFR1 و افزایش سطح IL-8 می‌تواند باعث التهاب شدید و ادم عروقی و اختلال در تبادل گازهای شریانی شود (۴۴).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند ساپونین با تحریک مسیر سیگنال‌دهی DT-13 به صورت معنی‌داری فسفوریلاسیون NF-kB p65 را سرکوب کرده و از التهاب عروقی و بیان مولکول‌های چسبندگی ناشی از TNF- $\alpha$  در موش جلوگیری می‌کند، همچنین به نظر می‌رسد با مدولاسیون مسیر Src/NF-kB/MAPK التهاب عروقی ناشی از TNF- $\alpha$  را کاهش دهد (۴۵).

با توجه به شرایط پاتوفیزیولوژیک، تولید TNF- $\alpha$  در سطوح بالا باعث پاسخ‌های التهابی می‌شود که نشانگرهای طلایی بسیاری از بیماری‌های عفونی می‌باشند. TNF- $\alpha$  نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های ریوی مانند COPD، ALI و ARDS دارد. این سایتوکین علاوه بر نقش اساسی خود در فرایندهای التهابی، در سمیت سلولی نیز نقش دارد (۴۶). بنابراین، عوامل دارویی که می‌توانند تولید TNF- $\alpha$  را کاهش دهند یا اقدامات بیولوژیکی آن را مسدود کنند، ممکن است دارای ارزش درمانی بالقوه در برابر طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با نانو ساپونین می‌تواند سطح TNF- $\alpha$  در بافت ریه جنین را در مقایسه با گروه پنومونی بدون درمان کاهش دهد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد ضخامت لایه آندومتر و میومتر در گروه پنومونی تحت درمان با نانو ساپونین دو برابر گروه کنترل بیمار بود. مطابق با نتایج مولکولی، ضخامت لایه آندومتر بافت رحم در گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین نسبت به گروه پنومونی تیمار شده با PBS افزایش معنی‌داری نشان داد، به طوری که اپیتلیوم مکعبی طبقه‌بندی شده منظم متشکل از لایه‌های سلولی متعدد مشاهده شد. علاوه بر این، تعداد جنین‌های زنده در گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین بیشتر از گروه پنومونی تیمار شده با PBS بود. همچنین در گروه تیمار شده با نانو ساپونین، برونشیول‌های جنین ظاهر طبیعی داشتند و میزان خونریزی، ترشح سلول‌های التهابی و ضخامت دیواره آلوئول‌ها نسبت به گروه پنومونی تیمار شده با PBS کاهش یافت. Yang و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند ساپونین گل ماهور نرخ لانه‌گزینی را کاهش نمی‌دهد، باعث مرده‌زایی نمی‌شود. تغییرات هیستوپاتولوژیک نشان می‌دهد که ساپونین بر تخمدان و رحم تأثیر منفی نمی‌گذارد؛ بلکه محیط رحم را با افزایش ضخامت آندومتر جهت لانه‌گزینی آماده می‌کند (۴۷).

نتایج هیستوپاتولوژی مطالعه حاضر نشان داد پنومونی می‌تواند باعث رسوب کلاژن در بافت کبد شود و تیمار با ساپونین و نانو ساپونین در کاهش رسوب کلاژن مؤثر است. Dai و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند ساپونین جین سینگ به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی با اثرات تعدیل‌کننده در آبخار GSK3 $\beta$ /Nrf2 و کاهش استرس اکسیداتیو و غیرفعال کردن مسیر TGF- $\beta$ /Smad در سرکوب فیروز کبدی، کاهش رسوب کلاژن نقش دارد (۴۸).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۹ در مطالعه خود نشان دادند ساپونین سیر با کاهش بیان عوامل التهابی از جمله IL-10، IL-6، IL-8 و استرس اکسیداتیو و کاهش رسوب کلاژن، تغییرات پاتولوژیک را در پیوند کبد کاهش می‌دهد و زمان بقای موش‌ها را به طور معنی‌داری طولانی می‌کند (۴۹).

ساپونین و نانو ساپونین نه تنها اثرات ریوی و سمی بر رشد ریه جنین نداشت، بلکه اثرات درمانی نیز داشت. به طوری که شاخص التهاب، ترشح مخاط و رسوب کلاژن به دنبال تجویز نانو ساپونین در ریه جنین به دنبال بهبودی از پنومونی کاهش یافت که حداقل عارضه نانو ساپونین را تأیید کرد. ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک کبد کاهش معنی‌داری را در درصد رسوب کلاژن در بافت‌های کبدی جدا شده از مادران مبتلا به پنومونی و تیمار شده با نانو ساپونین قبل از جفت‌گیری در مقایسه با مادران مبتلا به پنومونی بدون درمان نشان داد. در ارتباط با عوامل مولکولی، تأثیر سمی نانو ساپونین مشاهده نشد، اما همچنین، خواص درمانی آن در رشد ریه جنین تأیید شد.

ساپونین‌های استخراج شده از ریشه *Glycyrrhiza glabra* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است که نشانگرهای استرس اکسیداتیو ناشی از بیماری را در مقایسه با گروه پنومونی بدون درمان کاهش می‌دهد. استرس اکسیداتیو و التهاب نقش مهمی در پاتوژنز پنومونی ایفا می‌کنند. به دلیل افزایش ظرفیت کلی آنتی‌اکسیدانی، گروه پنومونی تیمار شده با نانو ساپونین به طور قابل توجهی پاسخ استرس اکسیداتیو را بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی نامطلوب در مطالعه حاضر بهبود بخشید. TAC، یک نشانگر بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو، می‌تواند آسیب بافت ریه ناشی از پنومونی جنین را با کاهش سطح رادیکال‌های آزاد کاهش دهد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** پنومونی تجربی ناشی از پنوموکوک در موش NMRI می‌تواند یک مدل مناسب برای بررسی پنومونی و اثرات ترکیبات مختلف بر آن معرفی شود. بر اساس نتایج به دست آمده نانو ساپونین می‌تواند میزان TNF- $\alpha$  را کاهش دهد، که بیانگر کاربرد این فرآورده در درمان کمکی عفونت‌های تنفسی می‌باشد. خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نانو ساپونین در موش‌های آلوده که با کاهش سطح بیان IFN- $\gamma$ ، MBD-2، KLF-2 مرتبط است، نشان می‌دهد که استفاده از نانو ساپونین بدون عوارض جانبی، اثر مناسبی بر روند رشد و تکوین ریه دارد. نتایج هیستوپاتولوژیک این مطالعه نشان داد نانو ساپونین در کاهش شاخص شدت پنومونی، التهاب آلوئول‌ها، برونش‌ها و ادم عروقی نقش دارد. همچنین نانو ساپونین با مهار اثرات تولید HB-EGF و با تعدیل فعال شدن فیبروبلاست، بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی از تخریب آلوئول‌ها و کیسه‌های هوایی و تغییر تکوین مسیرهای هوایی جلوگیری می‌کند. استفاده از نانو ساپونین در مادران مبتلا به پنومونی می‌تواند نقش مؤثری در افزایش خون‌رسانی به آندومتر، تعداد جنین‌های زنده و میزان بارداری موفق داشته باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان از کمک‌های تیم تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه زکریای رازی (دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران) قدردانی می‌کنند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011;377(9773):1264-75. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61459-6 PMID: 21435708
2. Goodnight WH, Soper DE. Pneumonia in pregnancy. *Crit Care Med*. 2005;33(10):S390-S7. doi: 10.1097/01.ccm.0000182483.24836.66 PMID: 16215363
3. Rodrigues J, Niederman MS. Pneumonia complicating pregnancy. *Clin Chest Med*. 1992;13(4):679-91. doi: 10.1016/S0272-5231(21)01135-7 PMID: 1478027
4. Paton JC, Trappetti C. Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2):7.2. 33. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0019-201 PMID: 30977464
5. Eperon I, Liberek C, Irion O, Martinez De Tejada B. Neonatal pneumococcal sepsis associated with maternal tubo-ovarian abscess. *J Gynecol Obstet*. 2013;33(4):416-7. doi: 10.3109/01443615.2013.766680 PMID: 23654332



6. Agarwal T, Tan S-A, Onesto V, Law JX, Agrawal G, Pal S, et al. Engineered herbal scaffolds for tissue repair and regeneration: Recent trends and technologies. *Biomed Eng Adv.* 2021;2:100015. doi: [10.1016/j.bea.2021.100015](https://doi.org/10.1016/j.bea.2021.100015)
7. Liang Y-Z, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B.* 2004;812(1-2):53-70. doi: [10.1016/j.jchromb.2004.08.041](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.041) PMID: 15556488
8. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.* 2016;8:33-42. doi: [10.1016/j.cofs.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002)
9. Dietz BM, Hajirahimkhan A, Dunlap TL, Bolton JL. Botanicals and their bioactive phytochemicals for women's health. *Pharmacol Rev.* 2016;68(4):1026-73. doi: [10.1124/pr.115.010843](https://doi.org/10.1124/pr.115.010843) PMID: 27677719
10. Colak F, GENİŞEL M, Uras IS. Evaluation of Glycyrrhiza Species as Medicinal Plant. *Oxid Med Cell Longev.*2(1):1-11. doi: [10.1155/2021/7571132](https://doi.org/10.1155/2021/7571132) PMID: 34349875
11. Juang Y-P, Liang P-H. Biological and pharmacological effects of synthetic saponins. *Molecules.* 2020;25(21):4974. doi: [10.3390/molecules25214974](https://doi.org/10.3390/molecules25214974) PMID: P33121124
12. Duan L, Harris A, Su C, Zhang Z-R, Arslan E, Ertuğrul K, et al. Chloroplast phylogenomics reveals the intercontinental biogeographic history of the liquorice genus (*Leguminosae: Glycyrrhiza*). *Front Plant Sci.* 2020;11:793. doi: [10.3389/fpls.2020.00793](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00793) PMID: 32636856
13. Khoshnejad M, Parhiz H, Shuvaev VV, Dmochowski IJ, Muzykantov VR. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting. *J Control Release.* 2018;282:13-24. doi: [10.1016/j.jconrel.2018.02.042](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.042) PMID: 29522833
14. Strbak O, Balejckikova L, Baciak L, Kovac J, Masarova-Kozelova M, Krafcik A, et al. Low-field and high-field magnetic resonance contrast imaging of magnetoferritin as a pathological model system of iron accumulation. *J Phys D Appl Phys.* 2017;50(36):365401. doi: [10.3390/ijms21176332](https://doi.org/10.3390/ijms21176332) PMID: 32878313
15. Wang Y, Zhang Y, Lu W, Wang L. Serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  levels in pediatric *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Can Respir J.* 2018;2018. doi: [10.1155/2018/8354892](https://doi.org/10.1155/2018/8354892) PMID: 33277324
16. Morris G, Puri BK, Olive L, Carvalho A, Berk M, Walder K, et al. Endothelial dysfunction in neuroprogressive disorders—causes and suggested treatments. *BMC Med.* 2020;18(1):1-31. doi: [10.1186/s12916-020-01749-w](https://doi.org/10.1186/s12916-020-01749-w) PMID: 33070778
17. Li Y, Su G, Zhong Y, Xiong Z, Huang T, Quan J, et al. HB-EGF-induced IL-8 secretion from airway epithelium leads to lung fibroblast proliferation and migration. *BMC Pulm Med.* 2021;21(1):1-12. doi: [10.1186/s12890-021-01726-w](https://doi.org/10.1186/s12890-021-01726-w) PMID: 34742261
18. Buerki-Thurnherr T, Schaepper K, Aengenheister L, Wick P. Developmental toxicity of nanomaterials: Need for a better understanding of indirect effects. *Chem Res Toxicol.* 2018. p. 641-2.
19. Zeb A, Sadiq A, Ullah F, Ahmad S, Ayaz M. Phytochemical and toxicological investigations of crude methanolic extracts, subsequent fractions and crude saponins of *Isodon rugosus*. *J Res Biol.* 2014;47(1):1-6. doi: [10.1186/0717-6287-47-57](https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-57) PMID: 25418691
20. Zhang L, Li L, Di Penta A, Carmona U, Yang F, Schöps R, et al. H-chain ferritin: a natural nuclei targeting and bioactive delivery nanovector. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(9):1305-10. doi: [10.1002/adhm.201500226](https://doi.org/10.1002/adhm.201500226) PMID: 25973730
21. Kim J-Y, Seo S-M, Lee H-K, Kim H-W, Choi Y-K. Comparison of the virulence of *Streptococcus pneumoniae* in ICR mouse stocks of three different origins. *Lab Anim Res.* 2019;35(1):1-7. doi: [10.1186/s42826-019-0002-4](https://doi.org/10.1186/s42826-019-0002-4) PMID: 31463224
22. Baral P, Umans BD, Li L, Wallrapp A, Bist M, Kirschbaum T, et al. Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and  $\gamma\delta$  T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. *Nat Med.* 2018;24(4):417-26. doi: [10.1038/nm.4501](https://doi.org/10.1038/nm.4501) PMID: 29505031
23. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood Rev.* 2009;23(3):95-104. doi: [10.1016/j.blre.2008.08.001](https://doi.org/10.1016/j.blre.2008.08.001) PMID: 18835072
24. Safdarpour S, Eftekhari Z, Eidi A, Doroud DJMP. Encapsulated saponin by ferritin nanoparticles attenuates the murine pneumococcal pneumonia. *Microb Pathog.* 2022;172:105731. doi: [10.1016/j.micpath.2022.105731](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105731) PMID: 36041710
25. Serafini R, Longobardi V, Spadetta M, Neri D, Ariota B, Gasparini B, et al. Trypan blue/gram stain to assess sperm membrane integrity in salernitano stallions and its relationship to pregnancy rates. *Reprod Domest Anim. Reprod Domest Anim.* 2014;49(1):41-7. doi: [10.1111/rda.12221](https://doi.org/10.1111/rda.12221) PMID: 23889365
26. Moghaddam FD, Mortazavi P, Hamedi S, Nabiuni M, Roodbari NH. Apoptotic effects of melittin on 4T1 breast cancer cell line is associated with up regulation of Mfn1 and Drp1 mRNA expression. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents).* Anticancer Agents Med Chem. 2020;20(7):790-9. doi: [10.2174/1871520620666200211091451](https://doi.org/10.2174/1871520620666200211091451) PMID: 32072917

27. Moghaddam FD, Hamed S, Dezfulian M. Anti-tumor effect of C-phycoerythrin from *Anabaena* sp. ISC55 in inbred BALB/c mice injected with 4T1 breast cancer cell. *Comp Clin Path*. 2016;25(5):947-52. [doi: 10.2174/1871520620666200211091451](https://doi.org/10.2174/1871520620666200211091451)
28. Dai M, Hu S, Liu C-F, Jiang L, Yu W, Li Z-L, et al. BPTF cooperates with p50 NF- $\kappa$ B to promote COX-2 expression and tumor cell growth in lung cancer. *Am J Transl Res*. 2019;11(12):7398. [PMID: 31934287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31934287/)
29. Van De Vlekkert D, Machado E, d'Azzo A. Analysis of generalized fibrosis in mouse tissue sections with Masson's trichrome staining. *Biol Protocol*. 2020;10(10):e3629-e. [doi: 10.21769/BioProtoc.3629](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3629) [PMID: 33659302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33659302/)
30. Dixon D, Reed CE, Moore AB, Gibbs-Flourmoy EA, Hines EP, Wallace EA, et al. Histopathologic changes in the uterus, cervix and vagina of immature CD-1 mice exposed to low doses of perfluorooctanoic acid (PFOA) in a uterotrophic assay. *Reprod Toxicol*. 2012;33(4):506-12. [doi: 10.1016/j.reprotox.2011.10.011](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.10.011) [PMID: 22146484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22146484/)
31. Zhao S, Zheng M-x, Chen H-e, Wu C-y, Wang W-t. Effect of panax notoginseng saponins injection on the p38MAPK pathway in lung tissue in a rat model of hypoxic pulmonary hypertension. *Chin J Integr Med*. 2015;21:147-51. [doi: 10.1007/s11655-014-1790-2](https://doi.org/10.1007/s11655-014-1790-2) [PMID: 25523598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25523598/)
32. Yamada M, Gomez JC, Chugh PE, Lowell CA, Dinanuer MC, Dittmer DP, et al. Interferon- $\gamma$  production by neutrophils during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(10):1391-401. [doi: 10.1164/rccm.201004-0592OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201004-0592OC) [PMID: 21169470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21169470/)
33. Shi J, Zhou L-r, Wang X-s, Du J-f, Jiang M-m, Song Z, et al. KLF2 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inflammation with regulation of AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):20-6. [doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.114](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.114) [PMID: 29079188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29079188/)
34. Jagdmann S, Berchtold D, Gutbier B, Witzernath M, Meisel A, Meisel C, et al. Efficacy and safety of intratracheal IFN- $\gamma$  treatment to reverse stroke-induced susceptibility to pulmonary bacterial infections. *J Neuroimmunol*. 2021;355:577568. [doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577568](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577568) [PMID: 33862420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33862420/)
35. Burman AC, Banovic T, Kuns RD, Clouston AD, Stanley AC, Morris ES, et al. IFN $\gamma$  differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood Adv*. 2007;110(3):1064-72. [doi: 10.1182/blood-2006-12-063982](https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063982) [PMID: 17449800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17449800/)
36. Zeng Z, Li M, Chen J, Li Q, Ning Q, Zhao J, et al. Reduced MBD2 expression enhances airway inflammation in bronchial epithelium in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;703-15. [doi: 10.2147/COPD.S148595](https://doi.org/10.2147/COPD.S148595) [PMID: 29535511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29535511/)
37. Wang Y, Zhang L, Wu G-R, Zhou Q, Yue H, Rao L-Z, et al. MBD2 serves as a viable target against pulmonary fibrosis by inhibiting macrophage M2 program. *Sci Adv*. 2021;7(1):eabb6075. [doi: 10.1113/jphysiol.2008.163899](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163899) [PMID: 33277324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33277324/)
38. Shen W, Weng Z, Fan M, Wang SH, Wang R, Zhang Y, et al. Exploration on the regulatory mechanisms of MBD2/miR-301a-5p/CXCL12/CXCR4 on acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2020;15:2561-2572. [doi: 10.21203/rs.3.rs-25344/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-25344/v1) [PMID: 33116473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33116473/)
39. Wang Y, Maciejewski BS, Soto-Reyes D, Lee HS, Warburton D, Sanchez-Esteban J. Mechanical stretch promotes fetal type II epithelial cell differentiation via shedding of HB-EGF and TGF- $\alpha$ . *J Physiol*. 2009;587(8):1739-53. [doi: 10.1113/jphysiol.2008.163899](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163899) [PMID: 19237431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19237431/)
40. Li Y, Su G, Zhong Y, Xiong Z, Huang T, Quan J, et al. HB-EGF-induced IL-8 secretion from airway epithelium leads to lung fibroblast proliferation and migration. *BMC Pulm Med*. 2021; 21(1):1-12. [doi: 10.1186/s12890-021-01726-w](https://doi.org/10.1186/s12890-021-01726-w) [PMID: 34742261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34742261/)
41. Park JH, Lee SK, Kim MK, Lee JH, Yun BH, Park JH, et al. Saponin extracts induced apoptosis of endometrial cells from women with endometriosis through modulation of miR-21-5p. *J Reprod Sci*. 2018;25(2):292-301. [doi: 10.1177/1933719117711263](https://doi.org/10.1177/1933719117711263) [PMID: 28558522](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28558522/)
42. Weinreich MA, Takada K, Skon C, Reiner SL, Jameson SC, Hogquist KA. KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors. *Immun*. 2009;31(1):122-30. [doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.011](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.011) [PMID: 19592277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19592277/)
43. Jha P, Das H. KLF2 in regulation of NF- $\kappa$ B-mediated immune cell function and inflammation. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):2383. [doi: 10.3390/ijms18112383](https://doi.org/10.3390/ijms18112383) [PMID: 29125549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29125549/)
44. Lucas R, Hadizamani Y, Enkhbaatar P, Csanyi G, Caldwell RW, Hundesberger H, et al. Dichotomous role of tumor necrosis factor in pulmonary barrier function and alveolar fluid clearance. *Front Physiol*. 2022;12:793251. [doi: 10.3389/fphys.2021.793251](https://doi.org/10.3389/fphys.2021.793251) [PMID: 35264975](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35264975/)
45. Zhang Y, Sun M, Han Y, Zhai K, Tang Y, Qin X, et al. The saponin DT-13 attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced vascular inflammation associated with src/NF- $\kappa$ B/MAPK pathway modulation. *Int J Biol Sci*. 2015;11(8):970. [doi: 10.7150/ijbs.11635](https://doi.org/10.7150/ijbs.11635) [PMID: 4495414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4495414/)

46. Atanasova K, Van Gucht S, Van Reeth K. Anti-TNF- $\alpha$  therapy does not ameliorate disease in a model of acute virus-endotoxin mediated respiratory disease in pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;137(1-2):12-9. [doi: 10.1016/j.vetimm.2010.04.003](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.04.003) PMID: 20466438
47. Yang M, Zou J, Zhu H, Liu S, Wang H, Bai P, et al. Paris saponin II inhibits human ovarian cancer cell-induced angiogenesis by modulating NF- $\kappa$ B signaling. *Oncol Rep.* 2015;33(5):2190-8. [doi: 10.3892/or.2015.3836](https://doi.org/10.3892/or.2015.3836) PMID: 25760800
48. Dai C, Yusuf A, Sun H, Shu G, Deng X. A characterized saponin extract of *Panax japonicus* suppresses hepatocyte EMT and HSC activation in vitro and CCl4-provoked liver fibrosis in mice: Roles of its modulatory effects on the Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 cascade. *Phytomed.* 2021;93:153746. [doi: 10.1016/j.phymed.2021.153746](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153746) PMID: 34634746
49. Zhang X, Li X, Xiong P, Yi C, Chen X. Effects of *Panax notoginseng* saponins on liver graft rejection in rats and the mechanisms. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2019;39(4):394-400. [doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2019.04.03](https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2019.04.03) PMID: 31068281