

Immunomodulatory Effects of Betaine on Experimental Model of Asthma in Balb/c Mice

Zeinab Shakarami Gandabeh¹,
Norouz Delirajh²,
Rahim Hobbenaghi²,
Ali Sheikhan³

¹ PhD Student in Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³ Associate Professor, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received October 8, 2019 ; Accepted March 15, 2020)

Abstract

Background and purpose: Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways that is associated with excessive irritation and airway obstruction. The aim of the present study was to investigate the immunomodulatory effects of betaine on experimental model of asthma in Balb/c mice.

Materials and methods: The statistical population consisted of 32 Balb/c mice that were randomly divided into four groups (n=8 per group). One group (control) was not sensitized with ovalbumin to induce experimental asthma. Experimental asthma was induced in other three groups by injecting ovalbumin. These groups were treated with saline phosphate buffer, betaine (1% w/w), and prednisolone (3 mg/kg) in drinking water, for 81 days after induction of the disease, respectively. Then, blood and spleen samples were collected for biochemical studies.

Results: Betaine treatment of ovalbumin-sensitized mice significantly reduced IgE antibody production, spleen cell proliferation, IL-5 and IL-17 levels, and significantly increased TGF- β and INF- γ levels (P<0.05).

Conclusion: Betaine as a naturally occurring chemical in the body has significant effects on IgE production and levels of some key cytokines of asthma. So, this substance could be considered as a possible candidate for modulating immune responses in asthma.

Keywords: ovalbumin, betaine, immunomodulation, asthma

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 30 (184): 1-13 (Persian).

* Corresponding Author: Nowruz Delirezh- Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (E-mail: n.delirezh@urmia.ac.ir)

بررسی اثرات بتائین بر بهبود سیمای بیوشیمیایی مدل آسم تجربی در موش Balb/c

زینب شاکرمی گندابه^۱

نوروز دلیرژ^۲

رحیم حب نقی^۲

علی شیخیان^۳

چکیده

سابقه و هدف: آسم، بیماری التهابی مزمن مجاری هوایی است که با تحریک پذیری بیش از حد و انسداد مجاری هوایی مرتبط است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات بتائین بر بهبود سیمای بیوشیمیایی مدل آسم تجربی در موش BALB/c بود.

مواد و روش‌ها: جامعه آماری مطالعه حاضر شامل ۳۲ سر موش Balb/c بود که به طور تصادفی در چهار گروه مساوی قرار گرفتند. گروه اول شامل موش‌هایی بودند که تحت ایمونیزاسیون با اوآلبومین جهت القای مدل بیماری آسم قرار نگرفتند. گروه دوم، سوم و چهارم شامل موش‌هایی بودند که بعد از القای مدل بیماری به مدت ۸۱ روز به ترتیب با فرسفات نمکی، بتائین (1%w/w) جیره به صورت محلول در آب آشامیدنی) و پردنیزولون (۳mg/kg) به صورت محلول در آب آشامیدنی) دریافت کردند. سپس در روز ۸۱ مطالعه، از موش‌های مورد مطالعه نمونه خون و طحال جهت بررسی اثرات تعدیل‌کنندگی ایمنی، جداسازی شد و در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تیمار موش‌های حساس شده با بتائین نسبت به گروه بیمار (آسمی) موجب کاهش معنادار میزان تولید آنتی‌بادی IgE، تکثیر سلول‌های طحالی و سایتوکاین‌های IL-5 و IL-17 گردید. سایتوکاین‌های TGF- β و INF- γ به طور معنی‌دار افزایش یافتند ($P < 0.05$).

استنتاج: بتائین به عنوان یکی از ترکیبات طبیعی بدن اثرات معنی‌داری بر میزان تولید IgE و نیز برخی سایتوکاین‌های کلیدی در بیماری‌زایی آسم دارد. بنابراین، ماده مذکور را می‌توان به عنوان نوعی کاندید احتمالی برای تعدیل پاسخ‌های ایمنی در بیماری آسم در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: اوآلبومین، بتائین، تعدیل ایمنی، مدل موشی آسم

مقدمه

در انواع غذاها از جمله گندم، اسفناج، غذاهای دریایی، صدف و به خصوص بی‌مهرگان دریایی یافت

بتائین که ابتدا از عصاره چغندر قند در قرن نوزدهم کشف شد، یکی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است که

E-mail: n.delirez@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: نوروز دلیرژ - ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی

۱. دانشجو دکتری ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات داروی‌های گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۷/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

می‌شود. بتائین از نظر ساختار شیمیایی، یک ترکیب آمونیم چهارتایی زوییترونیک است که از مشتقات آن می‌توان تری‌متیل‌گلسین، گلسین بتائین، لیسین و اکسینورین را نام برد. مطالعات مختلف از بتائین به عنوان ترکیبی که از نظر عملکرد فیزیولوژیکی نقش یک اسمولیت ارگانیک برای محافظت از سلول‌ها در مقابل استرس و یک منبع کاتابولیک با گروه‌های متیل که از طریق ترانس متلیه شدن برای استفاده در بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی است، یاد می‌کنند (۱). بتائین در بدن موجودات زنده به طور طبیعی حضور داشته و به عنوان یک اسمولیت، از سلول‌ها، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها از استرس محیطی محافظت می‌کند. همچنین به عنوان یک اهداکننده متیل، در درجه اول در کبد و کلیه انسان از طریق بتائین-هوموسیتین متیل ترانسفراز، هوموسیتین را به متیونین تبدیل می‌کند و این گونه در چرخه متیونین شرکت دارد. بتائین نقش مهمی در تنظیم اسمزی در کلیه‌ها دارد که مرتباً در طول عمل طبیعی مکانیسم تغلیظ ادرار در معرض اسمولاریته بالای خارج سلولی قرار می‌گیرند (۲). در مطالعات کوتاه مدت و بلندمدتی که بر روی موش صورت گرفت، مشخص شد که بتائین در تمام دوزهای ۰ تا ۵ درصد رژیم غذایی مورد مطالعه، غیر سمی است (۳). شواهد جمع‌آوری شده نشان داده است که بتائین در بسیاری از بیماری‌ها عملکرد ضد التهابی دارد. بتائین متابولیسم اسیدهای آمینه گوگرد را در برابر استرس اکسیداتیو بهبود می‌بخشد، فعالیت فاکتور هسته‌ای -kB و فعال‌سازی NLRP3 اینفلازوم را مهار می‌کند، سوخت و ساز انرژی را تنظیم می‌کند و استرس شبکه آندوپلاسمی و آپوپتوز را کاهش می‌دهد. بنابراین، بتائین در چندین بیماری انسانی مانند چاقی، دیابت، سرطان و آلزایمر اثرات مفیدی دارد (۴). آسم، از جمله بیماری‌های التهابی مزمن مجاری تنفسی است که حدود سیصد میلیون نفر را در دنیا تحت تأثیر قرار داده است. تخمین زده شده است که این آمار تا سال ۲۰۲۵ به چهار صد میلیون نفر برسد (۵). آسم از جمله اختلالات

هتروژن بوده که در آن سلول‌هایی از قبیل نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک، سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های عضله صاف مجاری هوایی، Th1، Treg، Th2 و Th17 سایتوکین‌های مرتبط با بیماری را تولید می‌کنند و افزایش سطح‌شان در نمونه‌های بالینی و مدل‌های موشی آسم مشخص شده است، نفوذ مداوم مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها به مجاری هوایی و تولید مکرر واسطه‌های التهابی منجر به تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. فاکتورهای رشدی مثل GM-CSF و PDGF در ترمیم بافتی ریه و کموکین‌هایی مثل MIP-1 و RANTES، MPC-1 و ائوتاکسین و گیرنده‌هایشان مثل CCR3، CCR4 در فراخوانی سلول‌های التهابی گردشی به مجرای تنفسی بیماران آسمی نقش دارند (۶). از نظر ایمونوپاتولوژی بیماری آسم، پلاریزه شدن پاسخ‌های سیستم ایمنی به سمت Th2 و افزایش تولید سایتوکاین‌های IL-4، IL-5 و IL-13 نقش مهمی در آسیب‌های بافتی و پیشرفت بیماری دارند. افزایش میزان این سایتوکاین‌ها در بدن از جمله نشانه‌های اصلی اختلالات آلرژیک بوده که به دنبال حضور و برخورد ماده آلرژن با سلول‌های سیستم ایمنی است. این سایتوکاین‌ها موجب تغییر کلاس ایزوتایپ آنتی‌بادی‌های حاصل از لنفوسیت‌های B به سمت IGE و افزایش فراخوانی ائوزینوفیل‌ها به مجاری تنفسی می‌شوند. تولید فراوان موکوس و انسداد مجاری تنفسی ناشی از آن، از جمله ویژگی‌های مهم آسم آلرژیک و التهاب‌های آلرژیک مزمن تنفسی بوده که دشواری در تنفس را در پی خواهد داشت (۷). از طرفی به خاطر انسداد راه هوایی ایجاد شده طی این بیماری و اختلال در خروج CO₂، تجمع و احتباس CO₂ در خون موجب بالا رفتن غلظت H⁺ و H₂CO₃ نسبت به بی‌کربنات و بروز اسیدوز تنفسی می‌گردد، این وضعیت باعث تولید بیش‌تر گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین تولید گونه‌های فعال نیتروژن نیز می‌شود. عدم تعادل بین تولید این گونه‌ها با آنتی‌اکسیدان‌های خنثی‌کننده، منجر به

مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه

جامعه مورد مطالعه، شامل ۳۲ موش ماده خالص نژاد Balb/c با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته با وزن ۲۰-۲۵ گرم بودند که از انستیتو پاستور ایران یک هفته قبل از شروع مطالعه جهت سازگاری با محیط خریداری شدند.

القا آسم توسط اوآلبومین

چهارصد میکروگرم اوآلبومین در هزار میکرولیتر بافر PBS حل شد و به مدت نیم ساعت با حجم برابر از آلوم مخلوط گردید. سپس از محلول حاصل توسط سر سوزن شماره G27 در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ به هر موش صد میکرولیتر از مخلوط به صورت داخل صفاقی تزریق شد. موش‌ها در روزهای ۲۷، ۲۹، ۳۱ و سپس هر هفته سه بار تا روز ۸۱ به صورت داخل بینی ۲۰ نانوگرم اوآلبومین در حجم پنجاه میکرولیتر را دریافت کردند (تصویر شماره ۱). به منظور تجویز داخل بینی محلول اوآلبومین، موش‌ها ابتدا مقید شده و سپس ۱۵۰ میکرولیتر از محلول پنجاه میکروگرم/میکرولیتر اوآلبومین در PBS استریل در هر سوراخ بینی چکانده شد تا محلول توسط موش استنشاق شود. در گروه کنترل، PBS استریل به صورت داخل صفاقی و داخل بینی تجویز گردید (۱۲، ۱۳).



تصویر شماره ۱: طرح کلی مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه

موش‌ها پس از خریداری و طی زمان تطابق یک هفته‌ای در گروه‌های زیر قرار گرفتند:
گروه ۱: شامل ۸ سر موش سالم بود که تحت تزریق داخل صفاقی و داخل بینی PBS قرار گرفتند. رژیم غذایی مورد دسترس برای این گروه شامل رژیم غذایی و آب آشامیدنی استاندارد بود.

بروز استرس اکسیداتیو می‌گردد. این گونه‌های فعال باعث تخریب پروتئین‌ها، آسیب به DNA و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند. برخی از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی خون و ریه، که برای مهار تولید گونه‌های فعال و مقابله با سمیت آن‌ها وارد عمل می‌شوند، شامل آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز و کوآنزیم گلوکاتیون می‌باشند (۸). اگرچه نشانه‌های التهاب آلرژیک مجاری تنفسی و آسم آلرژیک توسط داروها قابل کاهش و سرکوب هستند، ولی قابل درمان نمی‌باشند. کورتیکواستروئیدهای استنشاقی از جمله عوامل ضدالتهابی عمومی هستند که برای درمان التهاب مجاری تنفسی تجویز می‌شوند. کورتیکواستروئیدهای خوراکی (معمولاً پردنیزون یا پردنیزولون) برای درمان آسم حاد شدید به کار می‌روند. اثرات جانبی سیستمیک پردنیزولون مانند پوکی استخوان، تهوع، افزایش وزن، زخم‌های گوارشی، بیماری‌های کلیوی، کاتاراکت و اختلالات قلبی می‌باشد که در صورت مشاهده درمان‌های بدون استروئید باید مدنظر قرار گیرند (۹)، تعدیل‌کننده‌های لکوترینی، مسیر لکوترین را مسدود کرده و هر دو خاصیت ضدالتهابی و گشادکنندگی برونش را از خود نشان می‌دهند (۱۰). آنتی‌بادی مونوکلونال نو ترکیب Omalizumab با اتصال اختصاصی به IgE های آزاد موجب مهار رویدادهای التهابی می‌شود (۱۱). لذا تجویز داروها یا ترکیبات شیمیایی تغییر مهمی در پاسخ‌های ایمنی یا تغییر وضعیت التهاب آلرژیک مجاری تنفسی ایجاد نمی‌کند. با توجه به اهمیت آسم به عنوان یک بیماری التهابی مزمن و نقش عمده التهاب و استرس اکسیداتیو در پاتورنز آن و از آنجا که مطالعات مختلفی در زمینه استفاده از بتائین در اختلالات التهابی و آنتی‌اکسیدانی ناشی از عملکرد سیستم ایمنی انجام شده است و این که تا کنون مطالعه‌ای بر اساس کاربرد بتائین در درمان آسم انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات تعدیل‌کنندگی ایمنی بتائین در مدل آسم تجربی موش Balb/c تعریف شد.

بیستون سرنگ طی در حضور آنزیم له و یکنواخت شده و پس از برداشت بافت‌های همبندی و کپسول طحال، در حضور بافر لیزکننده گلوبول‌های قرمز، سانتریفیوژ شد. پلت سلولی به صورت سوسپانسیون در آمد تا در مراحل بعدی استفاده شود. سوسپانسیون سلولی حاصل از طحال موش‌های گروه‌های بیمار، پردنیزولون و بتائین را به غلظت 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر رسانده و در حضور 200 میکروگرم در میلی‌لیتر اوآلبومین به مدت 72 ساعت در انکوباتور CO_2 در در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در پلیت‌های 96 خانه در حجم 200 میکرولیتر و در پلیت 24 خانه در حجم 1000 میکرولیتر انکوبه شد. قابل ذکر است سلول‌های طحالی موش‌های سالم به جای اوآلبومین با 25 میکرولیتر فیتوهم‌گلوتینین مجاور شدند. بعد از 72 ساعت، مایع رویی پلیت 24 خانه جهت تست‌های الایزا جمع‌آوری گردید (۱۳، ۱۶-۱۸).

اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها در مایع رویی طحال

برای اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-5 (سایتوکاین شاخص زیر رده $Th2$)، $TGF-\beta$ (سایتوکاین شاخص زیر رده $Treg$)، $IFN-\gamma$ (سایتوکاین شاخص زیر رده $Th1$) و IL-17 (سایتوکاین شاخص زیر رده $Th17$) در نمونه مایع رویی کشت سلول‌های طحال، از کیت‌های الایزای تجاری (Abcam) اختصاصی موش، با حساسیت $IL-5 = 1.5 pg/ml$ ، $IL-17 = 0.5 pg/ml$ ، $IFN-\gamma$ کم‌تر از $5 pg/ml$ و $TGF-\beta = 7.8 pg/ml$ ، استفاده شد. پس از قرائت جذب نوری استاندارد‌ها و نمونه‌ها در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر، غلظت سایتوکاین نمونه‌ها با مقایسه OD نمونه‌های تست با منحنی استاندارد طبق پروتکل شرکت سازنده محاسبه گردید. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ترسیم شد، محور Y شاخص میزان جذب نور استاندارد‌های سایتوکاین در طول موج 450 نانومتر و محور X شاخص غلظت استاندارد‌های سایتوکاین برحسب میلی‌لیتر/بیکوگرم می‌باشد.

گروه ۲: شامل ۸ سر موش سالم بود که فرایند حساس‌سازی به اوآلبومین را به طور کامل طی کردند. رژیم غذایی مورد دسترس برای این گروه شامل رژیم غذایی و آب آشامیدنی استاندارد بود و تا روز نمونه‌برداری (روز ۸۱)، فسفات بافر سالین (PBS) دریافت کردند.

گروه ۳: شامل ۸ سر موش سالم بود که فرایند حساس‌سازی به اوآلبومین را به طور کامل طی کردند. این موش‌ها از روز ۳۱ مطالعه تا روز نمونه‌برداری (روز ۸۱)، بتائین $1 w/w$ درصد جیره (۱۴) به صورت محلول در آب آشامیدنی دریافت کردند.

گروه ۴: شامل ۸ سر موش سالم بود که حساس‌سازی به اوآلبومین به طور کامل در آن‌ها انجام شده بود. این موش‌ها از روز ۳۱ مطالعه تا روز نمونه‌برداری (روز ۸۱)، $3 mg/kg$ پردنیزولون (۱۵) به صورت محلول در آب آشامیدنی دریافت کردند.

اندازه‌گیری IgE/اختصاصی اوآلبومین

برای اندازه‌گیری IgE اختصاصی OVA از کیت الایزای تجاری (Abcam 157718) اختصاصی موش با حساسیت $1/83$ نانوگرم در میلی‌لیتر، استفاده شد. IgE اختصاصی OVA در نمونه سرم جداسازی شده از خون محیطی موش‌ها مورد سنجش قرار گرفت. پس از قرائت جذب نوری استاندارد‌ها و نمونه‌ها در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر، غلظت IgE نمونه‌ها با مقایسه OD نمونه‌های تست با منحنی استاندارد محاسبه گردید. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ترسیم شد، محور Y شاخص میزان جذب نور استاندارد‌های IgE در طول موج 450 نانومتر و محور X شاخص غلظت استاندارد‌های IgE برحسب ng/ml می‌باشد.

جداسازی سلول‌های طحالی و کشت آن‌ها در حضور اوآلبومین

طحال موش‌ها در شرایط آسپتیک جدا شد و در محیط کشت سلول قرار گرفت. بافت طحال به وسیله

بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحالی

به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، ۲۵ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر PBS) اضافه شده و مخلوط سلولی چهار ساعت انکوبه شد. سپس به هر یک از چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و مقادیر OD (Optical Density) توسط دستگاه الیزاید در طول موج ۴۹۰ نانومتر سنجیده شد (۱۹).

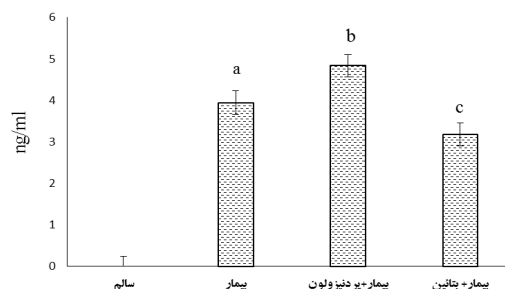
بررسی آماری

برای بررسی آماری نتایج از نرم افزار SPSS23 استفاده شد و تفاوت‌های معنی دار آماری به وسیله تست دانت (Dennett's) و با روش ANOVA بررسی و ارزیابی گردید. در تمامی آزمایشات $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد.

یافته‌ها

میزان تولید آنتی بادی IgE اختصاصی اوآلبومین

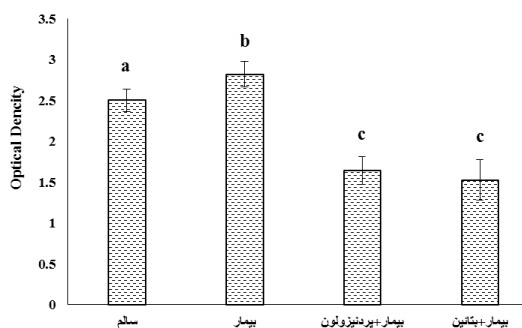
نتایج مطالعه ما (نمودار شماره ۱) نشان داد که میزان تولید آنتی بادی IgE در گروه‌های درمانی با بتائین نسبت به گروه بیمار (آسمی) کاهش معناداری داشت؛ این در حالی بود که در گروه درمانی با پردنیزولون نسبت به گروه بیمار (آسمی) افزایش معنی داری داشته است ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۱: مقایسه سطح آنتی بادی IgE در گروه بیمار (آسمی) نسبت به گروه‌های درمانی: (بیمار + پردنیزولون) و (بیمار شده با پردنیزولون) و (بیمار شده با بتائین) (حروف لاتین مشابه بین دو گروه نشان دهنده عدم معناداری و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی داری در سطح $P < 0.05$ می باشد).

نتایج حاصل از تست تکثیر لنفوسیتی

سلول‌های طحال در حضور آنتی ژن اوآلبومین کشت داده شدند و میزان تکثیر سلولی با روش MTT مورد سنجش قرار گرفت (نمودار شماره ۲). نتایج نشان داد که میزان تکثیر سلول‌های طحالی در گروه بیمار نسبت به گروه سالم افزایش معناداری یافته بود ($P < 0.05$). در گروه‌های تیمار شده با بتائین و پردنیزولون، میزان تکثیر نسبت به گروه بیمار کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۲: میزان تکثیر سلول‌های طحالی به دنبال تیمار با بتائین و پردنیزولون در موش‌های گروه‌های مختلف (حروف لاتین مشابه بین دو گروه نشان دهنده عدم معناداری و حروف غیر مشابه نشان‌دهنده معنی داری در سطح $P < 0.05$ می باشد).

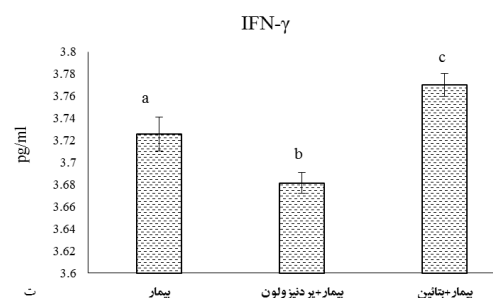
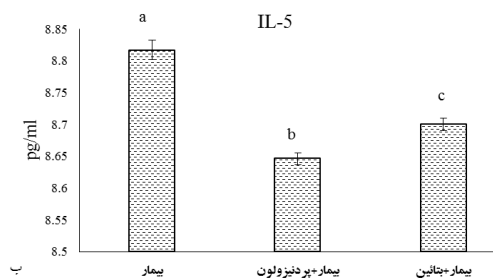
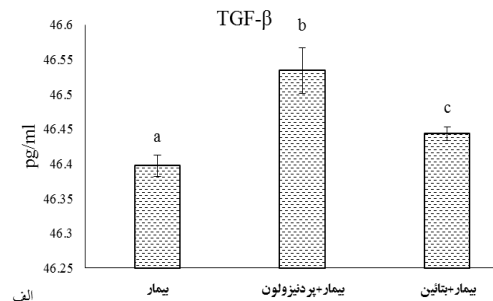
سنجش سایتوکاین‌های مایع رویی سلول‌های طحالی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سایتوکاین‌های تولید شده در نمونه مایع رویی طحالی (نمودار شماره ۳) نشان داد که میزان سایتوکاین‌های IL-5 و IL-17A افزایش معنی داری در گروه بیمار (آسمی) نسبت به گروه کنترل سالم یافته بود. نتایج به خوبی نشان داد که به دنبال تجویز بتائین و پردنیزولون، میزان سایتوکاین‌های IL-5 و IL-17A نسبت به گروه بیمار کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0.05$). هم چنین میزان سایتوکاین‌های TGF- β در هر دو گروه درمانی نسبت به گروه بیمار افزایش معنی داری یافته بود ($P < 0.05$). میزان سایتوکاین اینترفرون گاما در گروه درمانی با پردنیزولون نسبت به گروه بیمار کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0.05$).

بحث

آسم یک اختلال پیچیده و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن دوران کودکی است. این بیماری با انسداد برگشت پذیر جریان هوا، پاسخ بیش از حد برونش و مخاط، مهاجرت سلول‌های التهابی به مجاری هوایی و ترمیم مجاری هوایی مشخص می‌شود. طی یک دهه گذشته، شیوع آسم در سراسر جهان در حال افزایش است. اگرچه ویژگی‌های بالینی آسم به خوبی شرح داده شده است، اما ویژگی‌های پاتوفیزیولوژیک آسم کم‌تر درک شده است و استراتژی‌های درمانی بیش‌تر بر کنترل آسم متمرکز شده‌اند. پاسخ‌های التهابی در آسم توسط مکانیسم‌های ایمنی شامل سایتوکاین‌ها که واسطه انتقال سیگنال بین سلول‌های مختلف ایمنی می‌باشند، هدایت می‌شود، بنابراین سایتوکاین‌ها نقش مهمی در پاتوژنز آسم دارند (۲۰). با مرور متون منتشر شده، مشخص گردید تاکنون مطالعات اندکی در ارتباط با تاثیر بتائین به عنوان یک مکمل غذایی ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان در درمان بیماری‌های خودایمن و آسم و آلرژی انجام گرفته است. ما در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا به بررسی اثرات درمانی تجویز بتائین بروی بیماری آسم در مدل موشی پردازیم. بدین منظور با تجویز بتائین (۱w/w درصد چیره به صورت محلول در آب آشامیدنی) به موش‌هایی که با اوآلبومین بیماری آسم در آنها القا شده بود، اثرات تجویز بتائین بر میزان سایتوکاین‌های شاخص سلول‌های Th1، Th2، Th17 و T تنظیمی (سایتوکین‌های تولیدی این سلول‌ها) مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس، نتایج مطالعه ما نشان داد که به دنبال درمان بیماری آسم آلرژیک با بتائین، سطح سایتوکاین اصلی لنفوسیت‌های Th2 (IL-5) و Th17 (IL-17) کاهش معنی‌داری یافت. هم‌زمان سطح سایتوکین‌های سلول T تنظیمی (TGF- β) افزایش معناداری را در مایع رویی سلول‌های طحالی نشان داد ($P < 0.05$). میزان سایتوکین اصلی لنفوسیت‌های Th1 (INF- γ) در مایع رویی طحال افزایش معناداری را

در حالی بود که میزان اینترفرون گاما افزایش معنی‌داری در گروه‌های درمانی با بتائین نسبت به گروه بیمار یافته بود ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۳: نتایج تولید سایتوکاین‌های TGF- β (الف)، IL-5 (ب)، IL-17A (پ) و IFN- γ (ت) به دنبال تجویز بتائین و پردنیزولون در مایع رویی سلول‌های طحالی در موش‌های گروه‌های مختلف (حروف لاتین مشابه بین دو گروه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ می‌باشد).

غذایی موجب حفاظت بافت ریه حتی از آسیب‌های مخاطره‌آمیز سیگار نیز می‌شود (۲۳).

Yang و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه مدل موشی آنفالومیلیت تجربی خود ایمنی که به‌طور گسترده جهت بررسی MS استفاده می‌شود، در مقایسه با گروه کنترل متوجه شدند، موش‌های تحت درمان با بتائین، کاهش نفوذ لکوسیت‌ها و وسعت کم‌تری از دمیینه شدن در CNS و درصد قابل توجهی کاهش سلول‌های Th17 یکی از مهم‌ترین سلول‌های مؤثر در پیشرفت بیماری MS، در سیستم ایمنی محیطی و CNS را نشان می‌دهند و درمان با بتائین با مهار تولید IL-6 مشتق از DC و تمایز Th17، بیماری‌زایی MS را بهبود می‌بخشد (۲۴).

Ahn و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که بتائین با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش واسطه‌های التهابی مانند ژن نیتریک اکسید سنتاز (INOS) و COX-2، باعث کاهش آسیب کبدی ناشی از CCL4 می‌شود (۲۵).

Hirose و همکاران در سال ۲۰۱۷ ثابت کردند که در بیماری آسم، سایتوکاین‌های اختصاصی Th2 محرک تولید آنتی‌بادی از نوع IgE، افزایش حضور و فعال‌سازی ائوزینوفیل‌ها، هجوم نوتروفیل‌ها و مونوسیت به بافت‌ها، تولید فیبروز و موکوس در بیماری آسم می‌باشند (۲۶).

Raedler و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که آنتی‌بادی IgE اختصاصی آلرژن نقش مهمی در شروع و پیشرفت بیماری آسم با حساس‌سازی و فعال‌سازی ماست سل‌ها و بازوفیل‌ها بر عهده دارد (۲۷). نعمتی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که به دنبال القا آسم در موش به کمک اوآلبومین، جهت‌دهی پاسخ‌های سیستم ایمنی به سمت Th2 شروع شده و سایتوکاین‌های IL-4، IL-13 و IL-5 با بیشترین فراوانی در محیط حضور دارند (۲۸).

در مطالعه حاضر بتائین باعث کاهش معنی‌داری در میزان تولید آنتی‌بادی IgE در گروه‌های تیمار شده با بتائین

نسبت به گروه بیمار نشان داد ($P < 0.05$). همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که بتائین می‌تواند به طور معناداری موجب کاهش میزان آنتی‌بادی IgE سرمی و کاهش تکثیر سلول‌های طحالی در موش‌های مبتلا به آسم نسبت به گروه تیمار نشده شود.

بتائین در واقع جزء ترکیبات نیتروژنی چغندر قند است که به‌طور تجاری از شیر قند از طریق جدا شدن و کریستالی شدن با کروماتوگرافی بر اساس آب استخراج می‌شود و همچنین می‌تواند به‌عنوان یک مکمل به غذا اضافه شود (۱). مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که بتائین ضمن این که در متابولیسم سلولی اختلال ایجاد نمی‌کند، در بافت‌های حیوانی و ارگانسیم‌های مختلف به میزان زیاد با عملکرد آنزیمی قابل سازش می‌باشد و عملکردهای متابولیکی سلول را در برابر انواع مختلف استرس در بافت‌های حیوانی و ارگانسیم‌های مختلف تثبیت می‌کند (۲). هم‌چنین بتائین با تحریک ماکروفاژهای کبدی از تشکیل پروستاگلاندین و بیان سیکلواکسیژناز ۲ جلوگیری می‌کند. با تنظیم فعالیت ATPase های غشاء اریتروسیت از طریق تغییرات کنفورماسیونی سبب کنترل حجم سلول می‌شود. بتائین علاوه بر این، ATPase میوزین ماهیچه اسکلتی را محافظت و مانع از تغییرات ساختاری میوزین به واسطه اووره می‌گردد و از آپوپتوز ناشی از استرس هایپرتونیک در سلول اندوتلیال شریان ریوی خوگ جلوگیری می‌نماید (۲۱).

Kim و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای با عنوان اثرات درمانی بتائین بر سرطان کولون ناشی از کولیت اولسراتیو طراحی کردند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که بتائین با خاصیت ضد التهابی موجب کاهش بروز و پیشرفت انواع سرطان‌ها و هایپرپلازی‌ها می‌گردد (۲۲).

Ying و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای با عنوان بررسی اثرات ارتباط بین میزان مصرف بتائین در رژیم غذایی و خطر ابتلا به سرطان ریه طراحی کردند. نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از بتائین در رژیم

شده است که در بیماران مبتلا به آسم شدید وابسته به استروئید، آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی ضد IgE که غلظت IgE در گردش خون را به شدت کاهش می‌دهد، مزایای شگفت آور ایجاد می‌کند، نیاز به کورتیکواستروئیدهای خوراکی را کاهش می‌دهد و به برخی از بیماران اجازه می‌دهد استروئیدهای خوراکی را به‌طور کامل قطع کنند (۳۱).

اینترلوکین پنچ (IL-5) توسط ائوزینوفیل‌ها، ماست سل‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی (NK)، سلول‌های CD4+ T و CD8+ T و سلول‌های غیرخونساز مانند سلول‌های اپیتلیال تولید می‌شود. گیرنده IL-5 (IL-5R) در ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها و لنفوسیت‌های B بیان شده است. IL-5 در رشد، بقا و جذب شیمیایی ائوزینوفیل‌ها نقش اساسی دارد. توسط لنفوسیت‌های T در مجاری هوایی آسمی ترشح می‌شود و تعداد ائوزینوفیل خلط را در بیماران آسمی افزایش می‌دهد. انسداد IL-5 با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد IL-5 (mepolizumab) در آسم به‌طور قابل توجهی التهاب ائوزینوفیلیک را کاهش می‌دهد. سطح IL-5 پلاسما در طول درمان با استروئید در آسم شدید کودکان کاهش می‌یابد. سطح بالای IL-5 و IgE در کودکان با آسم شدید ثبت شده است (۲۰). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که به دنبال درمان بیماری آسم آلرژیک با بتائین و پردنیزولون، سطح IL-5 نسبت به گروه بیمار (آسمی) کاهش معنی‌داری یافت که با مطالعات مذکور هم‌خوانی داشت. اینترلوکین ۱۷، سایتوکین مشتق از سلول CD4+ T (Th17) است. ترشح آن توسط IL-23 القا می‌شود. IL-17A سایتوکین اصلی تولید شده توسط سلول‌های Th17 است. این سلول‌ها، سلول‌های اپیتلیال، اندوتلیال و فیروبلاست را تحریک می‌کند تا سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-8، IL-6، GM-CSF، β -TGF، β -IL-1 و فاکتور α نکروز تومور (TNF α) را ترشح کند. نمونه‌های مختلف (خلط، BALF، بیوپسی برونش و پلاسما) کودکان مبتلا به آسم سطح بالای IL-17 در انسداد مجاری هوایی را نشان

نسبت به گروه بیمار (آسمی) شد، این در حالی بود که پردنیزولون که در تحقیق ما به عنوان داروی انتخابی جهت بررسی و مقایسه اثرات احتمالی بتائین مدنظر قرار گرفت، باعث افزایش معنی‌داری در میزان تولید آنتی‌بادی IgE در گروه درمانی با پردنیزولون نسبت به گروه بیمار (آسمی) شد. این اثر پردنیزولون با اثرات مفید کورتیکواستروئیدها که در مدیریت بالینی بیماری‌های آلرژی بسیار موثرند، متناقض بود؛ اما پس از مطالعه مقالات و منابع مشخص شد که مطالعه ما همسو با مطالعات دیگر در این زمینه بوده است. به عنوان مثال در مطالعه Zieg و همکاران تحت عنوان اثرات داخل بدن گلوکوکورتیکوئیدها بر تولید IgE در داخل بدن (In vivo)، به ۱۰ بیمار مبتلا به آسم یک دوره ۷ روزه ۲۰ میلی‌گرم پردنیزولون داده شد که به صورت خوراکی دو بار در روز تجویز می‌شد. بعد از دوره پردنیزولون، در تمام بیماران افزایش سطح IgE وجود داشت ($P = 0/005$). علی‌رغم افزایش در سنتز IgE، بعد از دوره پردنیزولون، افزایش قابل توجهی در حجم بازدم اجباری (FEV) در ثانیه دوم مشاهده شد ($P = 0/01$). این داده‌ها نشان می‌دهد که افزایش مشاهده شده در تولید IgE در ارتباط با درمان پردنیزولون از نظر بالینی مضر نیست بلکه اثرات کورتیکواستروئیدها بر لنفوسیت‌های T را منعکس می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که القای سنتز IgE به دو سیگنال نیاز دارد سیگنال اول: IL-4 که باعث سوئیچ (تعویض) سلول‌های B به پلاسماسل‌های تولیدکننده IgE می‌شود. سیگنال دوم شامل: سلول‌های T، اپشتین بار و ویروس، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال لیگاند برای CD40 سلول B و کورتیکواستروئیدها می‌باشد (۲۹). سنتز IgE ناشی از کورتیکواستروئید، در حضور IL-4، به افزایش بیان CD40L (که معمولاً در لنفوسیت‌های T فعال شده بیان می‌شود)، بستگی دارد. جایی که با CD40 (که در تمام لنفوسیت‌های B بیان می‌شود) در ارتباط است، تعامل بین CD40L و CD40 برای القاء سنتز IgE توسط IL-4 و IL-13 بسیار مهم است (۳۰). اخیراً مشخص

داده است. بیان IL-17 در سرم کودکان مبتلا به آسم شدید به میزان قابل توجهی بالا می رود. بنابراین، غلظت IL-17 سرم به عنوان یک نشانگر مستقل التهاب در آسم شدید توصیف شده است و اندازه گیری آن یک روش غیر تهاجمی برای ارزیابی شدت آسم ارائه می دهد. علاوه بر این، بیان IL-17 در بیمارانی که از کورتیکواستروئیدها استفاده می کنند کاهش می یابد (۲۰). در مطالعه حاضر نیز بیمار موش های مبتلا به آسم با بتائین و پردنیزولون باعث کاهش معنی دار IL-17 نسبت به گروه بیمار (آسمی) گردید.

اینترفرون گاما یک سایتوکاین Th1 است که تولید سایتوکین های Th2 مانند IL-4، IL-5 و IL-13 را مهار می کند و تولید Ige را کاهش می دهد. در کودکان مبتلا به آسم، سطح IFN- γ به طور قابل توجهی پایین می باشد. سطح بالای سرمی IFN- γ با کاهش تعداد ائوزینوفیل خون و سطح Ige در کودکان ارتباط دارد (۲۰). در مطالعه ما نیز بتائین باعث افزایش معنی دار سطح IFN- γ در گروه بیمار (آسمی) تحت تیمار با بتائین نسبت به گروه بیمار گردید که با کاهش سطح اینترلوکین ۵ و ۱۷ و کاهش میزان Ige همخوانی داشت. اما میزان سایتوکاین اینترفرون گاما در گروه درمانی با پردنیزولون نسبت به گروه بیمار کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0/05$). که مطابق با اثر مهارگی گلوکوکورتیکو استروئیدها است که فعال شدن سیگنالینگ Janus kinase-STAT توسط اینترفرون گاما را مسدود می کند. اینترفرون گاما به یک گیرنده هترودیمریک سطح سلول متصل می شود، اتصال به IFN-R منجر به فعال شدن تیروزین کینازهای مرتبط با گیرنده Jak1 و Janus kinase (Jak2) می شود و منجر به فسفوریلاسیون تیروزین و فعال شدن فاکتور رونویسی (STAT2, STAT1)، می شود. Xiaoyu و همکاران در سال ۲۰۰۳ به مطالعه مهار سیگنالینگ IFN- γ با گلوکوکورتیکواستروئیدها پرداختند. طی این مطالعه افزودن دگزامتازون به کشت PBMC منجر به مهار

چشمگیر فعال سازی IFN- γ از STAT1 شد. چندین روز قرار گرفتن در معرض GC برای مهار سیگنالینگ IFN- γ لازم بود. گلوکوکورتیکواستروئیدها باعث سرکوب بیان STAT1 mRNA می شوند اما پایداری پروتئین STAT1 را تحت تأثیر قرار نمی دهد. GCs بیان ژن محرک IFN- γ را مهار می کنند. این نتایج نشان می دهد که مهار سیگنالینگ IFN- γ به عملکرد سرکوب کننده سیستم ایمنی بدن به واسطه GC کمک می کند. در طی واکنش التهابی، GCs درونزا ممکن است برای مسدود کردن سیگنالینگ IFN- γ کافی نباشد، اما درمان با دوزهای دارویی GCها ممکن است قادر به سرکوب بیان STAT1 و سیگنالینگ IFN- γ باشد. در مطالعات، گرایش به سرکوب بیان STAT1 در بیماران مبتلا به بیماری های التهابی شدید که تحت درمان با دوز بالای متیل پردنیزولون قرار گرفته بودند، یافته شد (۳۲).

Zhu و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که سلول های T تنظیمی، نقش کلیدی در محدود کردن یا خاتمه دادن به آسیب های سلولی و بیوشیمیایی ناشی از Th2 یا Th1 دارند. همچنین گزارش کردند که فعالیت کم سلول های T تنظیمی در ریه افراد مبتلا به آسم آلرژیک، موجب برهم خوردن تعادل پاسخ سلول های Th2/Th1 به نفع پاسخ های لنفوسیت های Th2 می گردد (۳۳). سلول های T تنظیمی (Treg) می توانند از طریق مکانیسم های مختلف، بیماری های آلرژیک را کنترل و اصلاح کنند. این سلول ها می توانند از فعال شدن سلول های Th2 جلوگیری کنند و از این طریق ترشح IL-4، IL-5، IL-13 و IL-9 سایتوکاین هایی که در واکنش های آلرژیک ضروری هستند، کاهش می یابد. سلول های Treg همچنین با اثر مستقیم و غیرمستقیم بر روی سلول های ماست سل، بازوفیل ها و ائوزینوفیل ها باعث سرکوب التهاب آلرژیک می شوند. علاوه بر این، نشان داده شده است که سلول های Treg همچنین می توانند تأثیر مستقیمی بر سلول های B داشته باشند تا ترشح Ige اختصاصی آلرژن را سرکوب کنند. اثرات

TGF- β پس از کنترل دارویی (درمان با پردنیزولون) به طور قابل توجهی افزایش یافت. منطقی است که حدس بزینم که TGF- β ممکن است به وفور برای تنظیم و مهار روند التهابی، حتی برای کمک به بهبود زخم و ترمیم مجاری هوایی آسیب دیده در مرحله تأخیری یا درمان استروئیدی آسم تولید شود (۳۴). در مطالعه حاضر نیز بتائین و پردنیزولون باعث افزایش معنی دار سطح TGF- β در گروه‌های بیمار (آسمی) تحت تیمار با بتائین و پردنیزولون نسبت به گروه بیمار (آسمی) گردید.

بتائین اثرات معنی داری بر میزان تولید Ige و نیز برخی سایتوکاین‌های کلیدی در بیماری‌زایی آسم دارد. بنابراین، این ماده به عنوان نوعی ترکیب طبیعی در دسترس و مقرون به صرفه، ممکن است در کنار درمان‌های استاندارد آسم، برای تعدیل پاسخ‌های ایمنی به منظور درمان این بیماری مفید باشد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه مقطع دکتری دانشجوی زینب شاکرمی می باشد. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی افرادی که در پیشبرد این مطالعه ما را یاری نمودند اعلام می دارند.

References

- Cai D, Liu H, Hu Y, Jiang Y, Zhao R. Gestational Betaine, Liver Metabolism, and Epigenetics. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer; 2017; 1-14.
- Choi YJ, Na JD, Jun DW, Kim YC. Protective effect of betaine against galactosamine-induced acute liver injury in rats. J Function Food 2018; 44: 65-73.
- Hayes KC, Pronczuk A, Cook MW, Robbins MC. Betaine in sub-acute and sub-chronic rat studies. Food Chem Toxicol 2003; 41(12): 1685-1700.
- Zhao G, He F, Wu C, Li P, Li N, Deng J, Zhu G, Ren W and Peng Y Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications. Front Immunol 2018; 9: 1070.
- Global Initiative for Asthma (GINA): Global strategy for asthma management and prevention. 2014 and Online Appendix. Available at: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/01/2014-GINA.pdf>. Accessed May 2, 2019.
- Tang L, Zhang H, Wang C, Zhang Q, Bai J. M2A and M2C macrophage subsets ameliorate inflammation and fibroproliferation

سلول‌های Treg از طریق طیف گسترده‌ای از عوامل محلول و غشایی مانند CTLA-4، TGF- β ، IL-10، پروتئین ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PD-1) یا گیرنده‌های هیستامین نوع ۲ اعمال می‌شود (۱۶).

Tsai و همکاران در مطالعه بررسی سطح IL-10 و TGF- β در سرم کودکان مبتلا به آسم حاد شدید گزارش کردند که سطح TGF- β در بیماران آسمی با ثبات تحت کنترل با پردنیزولون نسبت به بیماران مبتلا به آسم حاد شدید و افراد کنترل (سالم) به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. IL-10 و TGF- β هر دو سایتوکاین‌های پلیوتروپیک با خواص ضد التهابی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و تنظیم‌کننده‌های کلیدی در حفظ هموستاز ایمنی هستند. TGF- β تولید سایتوکاین‌های التهابی از ماکروفاژها، سلول‌های B و سلول‌های T را مهار می‌کند. علاوه بر این، TGF- β همچنین محرک قوی میوفیبروبلاست‌ها و سنتز کلاژن است. این بدان معنی است که TGF- β ممکن است در بازسازی بافت ریه آسمی آسیب دیده نقش داشته باشد. همچنین TGF- β ممکن است توسط اتوزینوفیل‌ها تولید شود تا در مرحله تأخیری، از پاسخ‌گویی بیش از حد مجاری هوایی ناشی از آلرژن جلوگیری کند. در مطالعه Tsai و همکاران، سطح

- in acute lung injury through interleukin 10 pathway. *Shock* 2017; 48(1): 119-129.
7. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev* 2017; 278(1): 162-172.
 8. Dean JB. Hypercapnia causes cellular oxidation and nitrosation in addition to acidosis: implications for CO₂ chemoreceptor function and dysfunction. *J Appl Physiol* 2010; 108(6): 1786-1795.
 9. Dworski R, Fitzgerald GA, Oates JA, Sheller JR. Effect of oral prednisone on airway inflammatory mediators in atopic asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 149(4): 953-959.
 10. Jiang Z, Zhu L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J Asthma Allergy* 2016; 9: 101-107.
 11. Ionescu L, Byrne RN, van-Haaften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(11): L967-L977.
 12. Lee SY, Kim JS, Lee JM, Kwon SS, Kim KH, Moon HS, et al. Inhaled corticosteroid prevents the thickening of airway smooth muscle in the murine model of chronic asthma. *Pulm Pharmacol Therap*, 2008; 21(1): 9-14.
 13. Esmaili Gourvarchin Galeh H, Meysam Abtahi Froushani S, Afzale Ahangaran N, Hadai SN. Effects of Educated Monocytes with Xenogeneic Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium in a Mouse Model of Chronic Asthma. *Immunol Invest* 2018; 47(5): 504-520.
 14. Nazari M, Moghimipour E, Tabandeh MR. Betaine Down Regulates Apelin Gene Expression in Cardiac and Adipose Tissues of Insulin Resistant Diabetic Rats Fed by High-Calorie Diet. *Int J Peptide Res Therapeutics* 2016; 23: 181-190.
 15. HSU CH, Sun HL, Sheu JN, KU MS, HU CM, ChaN Y, et al. Effects of the Immunomodulatory Agent *Cordyceps militaris* on Airway Inflammation in a Mouse Asthma Model. *Pediatr Neonatol* 2008; 49(5): 171-178.
 16. Castro MS, Azpiroz MB, Molina MA, Mourelle AC, Alaniz FC, Maldonado AM, et al. Preliminary Studies on the Prevention of the Ovalbumin-Induced Allergic Response by *Enterococcus faecalis* CECT7121 in Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157(1): 11-20.
 17. Małaczewska J. The splenocyte proliferative response and cytokine secretion in mice after 28-day oral administration of silver nanocolloid. *Polish J Veterinary Sci* 2014; Sci 17(1): 27-35.
 18. Khodaei H, Alizadeh M. Inhibition of IL4 but not IFN- γ production by splenocytes of mice immunized with ovalbumin after oral administration of 5-hydroxymethylfurfural. *Food Agric Immunol* 2017; 28(1): 27-34.
 19. Jabbari N, Zarei L, Esmaeili Govarchin Galeh H, Mansori Motlagh B. Assessment of synergistic effect of combining hyperthermia with irradiation and calcium carbonate nanoparticles on proliferation of human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7 cells). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(Supl 2): 364-372.
 20. Hatami H, Ghaffari N, Ghaffari J, Rafatpanah H. Role of Cytokines and Chemokines in the Outcome of Children With Severe Asthma: Narrative Review. *J Pediatr Rev* 2019; 7(1): 17-28 (Persian).
 21. Jung YS, Kim SJ, Kwon DY, Kim YS, Choi DW, et al. Alleviation of alcoholic liver

- injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 292-298.
22. Kim DH, Sung B, Chung HY, Kim ND. Modulation of Colitis-associated Colon Tumorigenesis by Baicalein and Betaine. *J Cancer Prev* 2014; 19(3): 153-160.
23. Ying J, Rahbar MH, Hallman DM, Hernandez LM, Spitz MR, Forman MR, et al. Associations between dietary intake of choline and betaine and lung cancer risk. *PLoS One* 2013; 8(2): e54561.
24. Yang C, Lai W, Zhou J, Zheng X, Cai Y, Yang W, et al. Betaine Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Dendritic Cell-Derived IL-6 Production and Th17 Differentiation. *J Immunol* 2018; 200(4): 1316-1324.
25. Ahn M, Park JS, Chae S, Kim S, Moon C, Hyun JW, et al. Hepatoprotective effects of *Lycium chinense* Miller fruit and its constituent betaine in CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Acta histochemica* 2014; 116(6): 1104-1112.
26. Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol Rev* 2017; 278(1): 145-161.
27. Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, Bock A, Otto R, Prazeres da Costa O, et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(1): 81-91.
28. Neamati A, Boskabady MH, Mohaghegh Hazrati S, Khakzad MR, Moosavi SH. The effect of natural adjuvants (G2, G2F) on lung inflammation of sensitized guinea pigs. *Avicenna J Phytomed* 2013; 3(4): 364-370 (Persian).
29. Zieg G, Lack G, Harbeck RJ, Gelfand EW, Leung DY. In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94(2): 222-230.
30. Barnes PJ. Corticosteroids, IgE, and atopy. *J Clin Invest* 2001; 107(3): 265-266.
31. Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody rhuMAB-E25 Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341(26): 1966-1973.
32. Hu X, Li WP, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* 2003; 170(9): 4833-4839.
33. Zhu J, Liu X, Wang W, Ouyang X, Zheng W, Wang Q. Altered expression of regulatory T and Th17 cells in murine bronchial asthma. *Exp Ther Med* 2017; 14(1): 714-722.