

## Research Paper

**The Effect of Short-Term Eccentric Endurance Exercise on T-helper Cells Following Injection of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D DNA Vaccine**

**M. T. Afshounpour<sup>1</sup>, M. Molanouri Shamsi<sup>2</sup>, S. Soudi<sup>3</sup>, H. Soleimanjahi<sup>4</sup>, R. Gharakhanlou<sup>5</sup>**

1. PhD, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Jala Ale Ahmad Exp. Tehran, I.R. Iran
2. PhD, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Jala Ale Ahmad Exp. Tehran, I.R. Iran (Corresponding Author)
3. Sara Soudi, PhD, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Jala Ale Ahmad Exp. Tehran, I.R. Iran
4. Hoorieh Soleimanjahi, PhD, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University; Tehran, Iran; Jala Ale Ahmad Exp. Tehran, I.R. Iran
5. Reza Gharakhanlou, PhD, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Jala Ale Ahmad Exp. Tehran, I.R. Iran

Received: 2021/01/25

Accepted: 2021/05/15

---

**Abstract**

Exercise activities can act as an endogenous adjuvant, enhancing the efficiency of the host immune response after vaccination. However, the effect of repeated bouts of eccentric endurance exercise on cellular and humoral immune-related responses to the vaccine is unclear. The present study was performed to investigate the activation of type 1 and 2 (Th) helper lymphocytes following three bouts of endurance eccentric exercise as an adjuvant for DNA vaccination. Thirty-six female Balb-c mice (6-8 weeks, body mass mean=18g) were randomly divided into six groups: control, exercise, vaccine, PcDNA, exercise-vaccine and exercise-PcDNA (6 mice in each group). Different groups underwent DNA vaccine and PcDNA injection immediately after the last exercise, all stages of exercise and injections were repeated after 12 days according to the vaccine protocol, and 12 days after the second vaccine injection, spleen samples were collected. On-way variance analysis was used for statistical analysis and  $P < 0.05$  considered for significance.

- 
1. Email: mohamad.afshon@gmail.com
  2. Email: mahdieh\_molanouri@yahoo.com
  3. Email: soudi@modares.ac.ir
  4. Email: soleim\_h@modares.ac.ir



According to the results of the study, the ratio of Th1/Th2 after antigen stimulation was significantly different between the control group with vaccine and exercise-PcDNA ( $P < 0.05$ ). Also, the exercise-vaccine group was significantly different from all research groups ( $P < 0.05$ ). The results of the present study confirm the increase in the Th1/Th2 cell ratio following repeated bouts of eccentric endurance exercise. Stimulation of muscle damage through exercise before DNA vaccination may have been effective in invoking innate immune system cells and effectively stimulating acquired immunity.

**Key Words:** Endurance Exercise, Vaccine, Immune System, Adjuvant.

---

## **Extended Abstract**

### **Background and Purpose**

Vaccination is the best and most cost-effective way to prevent death and spread of infectious diseases in humans and animals. Common vaccines mainly include attenuated live pathogens and subunit vaccines such as inactivated bacterial toxins. The goal of vaccination is to create a strong immune response to provide long-term protection against infection (1). The immune response to the vaccine is accompanied by the simultaneous activation of innate and acquired immunity to elicit an effective response to the antigens present in the vaccine (2). Exercise activities can act as an endogenous adjuvant, enhancing the efficiency of the host immune response after vaccination. It is proposed that in young samples, using higher intensities of eccentric endurance exercise, given that they are also involved in increasing muscle blood flow while causing muscle damage, can be effective in creating adjunctive effects. However, the effect of repeated bouts of eccentric endurance exercise on cellular and humoral immune-related responses to the vaccine is unclear.

### **Materials and Methods**

The present study was carried out to investigate the activation of type 1 and 2 (Th) helper lymphocytes following three bouts of endurance eccentric exercise as an adjuvant for DNA vaccination. Thirty-six female Balb-c mice (6-8 weeks, body mass mean=18g) were randomly divided into six groups: control, exercise, vaccine, empty mammalian expression vector with the CMV promoter (PcDNA), exercise-vaccine, and exercise-PcDNA (6 mice in each group). Different groups underwent DNA vaccine and PcDNA injection immediately after the last exercise. All stages of exercise and injections were repeated after 12 days according to the vaccine protocol, and 12 days after the second vaccine injection, spleen samples were collected. The exercise protocol used in this study consisted of a three-session eccentric endurance exercise the protocol consisted, and a warm-up period of 15 min at a speed of 15 meters per minute. Then for 60 minutes, the speed



increased every 10 minutes until it reached a speed of 24 meters per minute. At this time, the interval phase began as follows: 5 repetitions of 1 minute at a speed of 30 meters per minute, which was 4 minutes at a speed of 17 meters per minute between each repetition. The mice then ran 10 x 2-minute repetitions at 30 meters per minute, with each repetition lasting 2 minutes at 17 meters per minute. In the last stage of the interval, the mice ran for 3 repetitions of 1 minute at a speed of 40 meters per minute, which was between each of them for 4 minutes at a speed of 17 meters per minute. At this time, the rats ran at a speed of 17 meters per minute until they reached exhaustion. Moreover, interleukin-4 (IL-4) and interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) as indices for Th1 and Th2 activation were determined in spleen cell cultures. One-way variance analysis was used for statistical analysis and  $P < 0.05$  was considered as the significance level.

### Findings

To evaluate the activation of T-helper 1 and T-helper 2 cells, the levels of INF- $\gamma$  and IL-4 cytokines were measured as an indicator of the activation of these cells in spleen suspension by enzyme-linked immunosorbent assay method. The significant differences were observed between the groups in IL-4 levels by antigen stimulation ( $P < 0.05$ ). Based on the results of the Tukey test, all research groups showed a significant difference from the exercise group. Regarding the changes of INF- $\gamma$  between the groups in the pre-stimulation phase with the peptide, no significant difference was observed between the groups ( $P > 0.05$ ). But after stimulation with antigen, there was a significant difference between the research groups ( $P < 0.05$ ). The Tukey follow-up test showed a significant difference between the control group with exercise and exercise + vaccine groups. Besides, there was a significant difference between the vaccine and exercise groups. According to the study's results, the ratio of Th1/Th2 after antigen stimulation was significantly different between the control group with vaccine and exercise-PcDNA ( $P < 0.05$ ). Also, the exercise-vaccine group was significantly different from all research groups ( $P < 0.05$ ). The results of the Tukey post hoc test showed a significant difference between the exercise + PcDNA and exercise + vaccine groups with all research groups ( $P < 0.05$ ). On the other hand, after stimulation with antigen peptides, there was a significant difference between the control group and the vaccine, exercise + PcDNA, and exercise + vaccine groups ( $P < 0.05$ ). The vaccine group also showed a significant difference with the PcDNA and exercise + vaccine groups ( $P < 0.05$ ), and the exercise + vaccine group differed significantly from all research groups ( $P < 0.05$ ).



## Conclusion

The findings of the present study confirm the increase in the Th1/Th2 cell ratio following repeated bouts of eccentric endurance exercise. The stimulation of muscle damage through exercise before DNA vaccination may have been effective in invoking innate immune system cells and effectively stimulating acquired immunity (3). Physical exercises that are mainly done with endurance and moderate intensity, typically, either do not show ocular effects, or mainly affect cellular immunity. In one study, in mice vaccinated against hepatitis B that exercised at moderate intensity (approximately 70% of maximal oxygen intake), the cellular immune response increased with the production of Th1-dependent cytokines and proliferation of virus-specific T cell antigen (4). However, the findings indicate no major changes in Th2 responses. This indicator can be effective in stimulating the production of antibodies. Antibody responses are seen primarily or secondarily as antibody responses following physical exercise. Although the effect of different types of exercise activities with different intensities is not yet known, it seems that optimal intensities can be effective in possibly increasing the effectiveness of vaccines. In addition, despite studies on traditional vaccines and physical exercise, limited studies have been conducted on newer vaccines such as DNA vaccines and their effects on the immune system. The stimulation of immune responses in young specimens, especially cellular immunity, has also been considered in previous studies. It seems that further studies in this area, especially the use of samples with weakened immune systems, are needed.

**Key Words:** Endurance Exercise, Vaccine, Immune system, Adjuvant.

## References

1. Bartlett BL, Pellicane AJ, Tyring SK. Vaccine immunology. *Dermatol Ther.* 2009;22(2):104-9.
2. Todryk SM. T Cell Memory to Vaccination. *Vaccines (Basel).* 2018;6(4):84.
3. Paulsen G, Ramer Mikkelsen U, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise immunology review.* 2012;18.
4. Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira V, Niu Y, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scandinavian journal of medicine & science in sports.* 2012;22(5):643-52.



## تأثیر یک دوره کوتاه مدت فعالیت ورزشی برون گرای استقامتی بر سلول‌های کمک کننده T به دنبال تزریق DNA واکسن بیان کننده گلیکوپروتئین D و ویروس

### هریس سیمپلکس تیپ یک

محمدطاهر افشون پور<sup>۱</sup>، مهدیه ملانوری شمسی<sup>۲</sup>، سارا صعودی<sup>۳</sup>، حوریه سلیمان جاهی<sup>۴</sup>، رضا قراخانلو<sup>۵</sup>

۱. دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۲- دانشیار گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس (نویسنده مسئول)
۳. دانشیار گروه ایمونولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۴. استاد گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۵. استاد گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۶

#### چکیده

فعالیت‌های ورزشی می‌توانند به عنوان یک ادجوانت اندوژن عمل کنند و موجب افزایش بهره‌وری پاسخ ایمنی میزبان بعد از واکسیناسیون شوند؛ با این حال، تأثیر فعالیت‌های ورزشی چند وهله‌ای برون گرا که به صورت استقامتی انجام می‌شوند، بر پاسخ‌های مرتبط با ایمنی سلولی و هومورال به واکسن مشخص نیست. پژوهش حاضر به منظور بررسی فعال سازی لنفوسیت‌های کمک کننده انواع یک و دو (Th) به دنبال سه وهله فعالیت ورزشی برون گرای استقامتی به عنوان اجوانت DNA واکسن انجام شد. سی‌وشش سر موش بلب‌سی ماده (شش تا هشت هفته با میانگین وزن ۱۸ گرم) به طور تصادفی به شش گروه کنترل، ورزش، واکسن، PcDNA، ورزش-واکسن و ورزش-PcDNA تقسیم شدند (شش موش در هر گروه). گروه‌های مختلف بلافاصله بعد از آخرین وهله ورزش تزریق DNA واکسن و PcDNA رو پشت سر گذاشتند. همه مراحل اجرای فعالیت ورزشی و تزریقات براساس پروتکل واکسن بعد از ۱۲ روز تکرار شد و ۱۲ روز بعد از دومین تزریق واکسن نمونه‌های پژوهش گردآوری شدند. برای تحلیل داده‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و

1. Email: mohamad.afshon@gmail.com
2. Email: mahdieh\_molanouri@yahoo.com
3. Email: soudi@modares.ac.ir
4. Email: soleim\_h@modares.ac.ir



$P < 0.05$  در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج پژوهش، در نسبت  $Th1/Th2$  بعد از تحریک با آنتی‌ژن بین گروه‌های کنترل با واکسن و ورزش  $PcDNA$  تفاوت معناداری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). گروه ورزش-واکسن با تمام گروه‌های پژوهش به صورت معنادار متفاوت بود ( $P < 0.05$ ). نتایج مطالعه حاضر تأییدکننده افزایش نسبت سلول‌های  $Th1/Th2$  به دنبال فعالیت‌های ورزشی چندوله‌ای استقامتی طولانی‌مدت برون‌گراست. تحریک آسیب عضلانی از طریق فعالیت ورزشی در هنگام تزریق  $DNA$  واکسن احتمالاً در فراخوانی سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی و تحریک مؤثر ایمنی اکتسابی مؤثر است.

**واژگان کلیدی:** ورزش استقامتی، واکسن، سیستم ایمنی، اجوانت.

## مقدمه

واکسیناسیون<sup>۱</sup> بهترین و مقرون به صرفه‌ترین روش برای جلوگیری از مرگ‌ومیر و شیوع خسارات ناشی از بیماری‌های عفونی در انسان‌ها و حیوانات است. واکسن‌های رایج عمدتاً پاتوژن‌های زنده ضعیف‌شده و واکسن‌های زیرواحدی مانند توکسین‌های باکتری غیرفعال هستند (۱). هدف واکسیناسیون ایجاد پاسخ ایمنی قوی برای ایجاد حفاظت طولانی‌مدت علیه عفونت است. برای رسیدن به این هدف، برخلاف واکسن‌های زنده ضعیف‌شده، عموماً آرگانیزم کامل کشته می‌شود یا واکسن‌های زیرواحدی<sup>۲</sup> برای تأثیرگذار بودن، به افزودن ترکیباتی نیاز داشته که اجوانت<sup>۳</sup> دارند. واژه «اجوانت» به معنی کمک یا افزایش است. اجوانت‌ها ترکیباتی هستند که واکنش ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های تلقیح‌شده را با بهبود پاسخ سلول  $T$  و  $B$  با درگیر شدن اجزای سیستم ایمنی ذاتی افزایش می‌دهند. اجوانت‌ها باید مطابق با معیارهای مختلفی انتخاب شوند که از جمله آن‌ها گونه‌های هدف، نوع آنتی‌ژن، نوع و مدت پاسخ ایمنی مورد نیاز برای حفاظت است (۲، ۳).

پاسخ ایمنی به واکسن با فعال‌سازی هم‌زمان ایمنی ذاتی و اکتسابی همراه است تا باعث پاسخ مؤثر به آنتی‌ژن‌هایی شود که در واکسن وجود دارد. به دنبال تزریق واکسن به صورت عضلانی، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APCs)<sup>۴</sup> در سیستم ایمنی ذاتی، به ویژه سلول‌های دندریتیکی ویژه بافت، آنتی‌ژن را تشخیص می‌دهند. قبل از مهاجرت به گره‌های لنفاوی آنتی‌ژن به سلول‌های  $TCD4+$  از طریق سیگنالینگ  $MHC$  نوع II به گیرنده سلول  $T$  عرضه می‌شود. سایتوکاین اینترفرون گاما

1. Vaccination
2. Subunit Vaccine
3. Adjuvant
4. Antigen-Presenting Cell (APC)



(INF- $\gamma$ )<sup>۱</sup> به توسعه سلول‌های TCD4+Th1 منجر می‌شود. به علاوه، اینترلوکین-۴ (IL-4)<sup>۲</sup> آزاد شده به واکنش سلول‌های Th2CD4+T منجر می‌شود. TCD4+Th1 واسطه پاسخ‌های سلولی است؛ در حالی که سلول‌های Th2CD4+T باعث سیگنالینگ به سلول‌های B شده که به پاسخ‌های هورمونی به واکنش منجر می‌شوند. پاسخ ایجاد شده به واسطه سلول باعث تکثیر سلول‌های TCD8+ می‌شود که سلول‌های موثر سیتوتوکسیک سیستم ایمنی هستند. پاسخ هورمونی شامل سلول‌های B ویژه آنتی‌ژن می‌شود که آنتی‌بادی‌ها را آزاد می‌کند. فرایند توصیف شده پاسخ وابسته به تیموس است که به کمک سلول‌های T برای شروع پاسخ آنتی‌بادی از سلول‌های B لازم است (۴، ۱). زمانی که خطر اولیه عفونت پشت سر گذاشته شد، پاسخ اولیه به آنتی‌ژن به پایان می‌رسد و سلول‌های T و B خاطره‌ای برای مقابله با عفونت‌های مشابه باقی می‌مانند؛ بنابراین هنگام تزریق واکسن فعال‌سازی سلول‌های Th1 و Th2 می‌توانند در القای مؤثر پاسخ‌های سیستم ایمنی مؤثر باشند (۴).

فعالیت ورزشی منظم روشی مؤثر در پیشگیری از بیماری‌هاست و گاهی به عنوان یک روش درمانی مؤثر استفاده می‌شود (۵). مطالعات متعددی به مطالعه اثرات ورزش بر پارامترهای ایمنی پرداخته‌اند (۶-۸). شدت‌های مشخصی از ورزش ممکن است پاسخ‌های سیستم ایمنی را در عضله اسکلتی یا به صورت سیستمیک تحریک کنند (۹-۱۱). پیشنهاد شده است که فعالیت‌های ورزشی احتمالاً می‌توانند به عنوان یک ادجوانت اندوژن عمل کنند و موجب افزایش بهره‌وری پاسخ ایمنی میزبان بعد از واکسیناسیون شوند (۱۳، ۱۲، ۳)؛ باین‌حال، تأثیر انواع فعالیت‌های ورزشی بر ایجاد اثرات اجوانتی به صورت کامل مشخص نیست. برخی از مطالعات اثرات اجوانتی یک وهله فعالیت‌های ورزشی با جزء برون‌گرا به‌ویژه ورزش‌های مقاومتی را در مدل‌های مختلف واکسن بررسی کرده‌اند، اما به نظر می‌رسد نتایج ضد و نقیض است (۳). با توجه به اینکه عواملی مانند سن، جنس، نوع واکسن و... می‌توانند در ایجاد اثرات اجوانتی مؤثر باشند (۱۴)، این امکان وجود دارد که در نمونه‌های جوان استفاده از شدت‌های بیشتر فعالیت‌های ورزشی برون‌گرا استقامتی با توجه به اینکه هم‌زمان با ایجاد آسیب عضلانی در افزایش جریان خون عضلانی نیز درگیرند، بتوانند در ایجاد اثرات اجوانتی مؤثر باشند. همچنین، پیشنهاد شده است که فعالیت‌های ورزشی چندوهله‌ای با شدت متوسط با توجه به تحریک پاسخ‌های سیستم ایمنی سلولی می‌تواند در ایجاد اثرات اجوانتی مؤثر باشند (۱۵)؛ باین‌حال، تأثیر فعالیت‌های ورزشی چندوهله‌ای با شدت بیشتر بر پاسخ‌های مرتبط با ایمنی سلولی و هومورال مشخص نیست. پژوهش حاضر به منظور بررسی فعال‌سازی سلول‌های Th1 و Th2 در استفاده فعالیت‌های ورزشی

1. Interferon Gamma

2. Interleukin-4



چندوهله‌ای برون‌گرای استقامتی به‌عنوان اجوانت واکسن DNA بیان‌کننده گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ (HSV-gD1) انجام شد.

### روش پژوهش

سی‌وشش سر موش بالبسی ماده (شش تا هشت‌هفته‌ای با میانگین وزن ۱۸ گرم) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به شش گروه کنترل، ورزش، واکسن، و PCDNA<sup>۲</sup> ورزش-واکسن و ورزش-PCDNA (شش موش در هر گروه) تقسیم شدند. موش‌ها دو هفته در حیوان‌خانه نگهداری شدند تا با محیط آشنا شوند و آمادگی انجام فعالیت ورزشی روی نوار گردان را داشته باشند. همه اصول اخلاقی و شرایط نگهداری مربوط به حیوانات آزمایشگاهی درباره آن‌ها رعایت شد. این پژوهش زیر نظر کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته و در کمیته اخلاق این دانشگاه با کد IR.TMU.REC.1396.595 ثبت شده است. گروه‌های کنترل، واکسن و PCDNA هیچ‌گونه فعالیت ورزشی نداشتند و تنها برای همسان‌سازی استرس روی نوار گردان قرار گرفتند. گروه‌های مختلف بلافاصله بعد از آخرین وهله ورزش، تزریق DNA واکسن و PCDNA را پشت سر گذاشتند. همه مراحل اجرای فعالیت ورزشی و تزریقات، براساس پروتکل واکسن بعد از ۱۲ روز تکرار شد و ۱۲ روز بعد از دومین تزریق واکسن، نمونه‌های پژوهش گردآوری شدند (۱۶).

پروتکل ورزشی به‌کاررفته در این مطالعه، سه وهله فعالیت ورزشی به فاصله ۲۴ ساعت بود که به‌صورت جزئی هر وهله به این شرح بود: ابتدا مرحله گرم‌کردن به‌مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۵ متر در دقیقه انجام شد. سپس طی مدت ۶۰ دقیقه، سرعت هر ۱۰ دقیقه یک‌بار افزایش یافت تا اینکه به‌سرعت ۲۴ متر در دقیقه برسد. در این زمان، مرحله اینتروال شروع شد؛ به‌طوری‌که پنج تکرار یک‌دقیقه‌ای با سرعت ۳۰ متر در دقیقه که بین هر تکرار، چهار دقیقه با سرعت ۱۷ متر در دقیقه بود، موش‌ها دویدند. سپس موش‌ها ۱۰ تکرار دو دقیقه‌ای با سرعت ۳۰ متر در دقیقه دویدند که بین هر تکرار دو دقیقه با سرعت ۱۷ متر در دقیقه بود. در مرحله آخر اینتروال نیز موش‌ها طی سه تکرار یک‌دقیقه‌ای با سرعت ۴۰ متر در دقیقه دویدند که بین هر کدام چهار دقیقه با سرعت ۱۷ متر در دقیقه قرار داشت. در این زمان، موش‌ها با سرعت ۱۷ متر در دقیقه تا زمانی که به واماندگی برسند، دویدند. شیب لحاظ‌شده برای این پروتکل روی نوار گردان، ۱۵- درجه بود (۱۱).

1. Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D
2. Empty Mammalian Expression Vector with the CMV Promoter



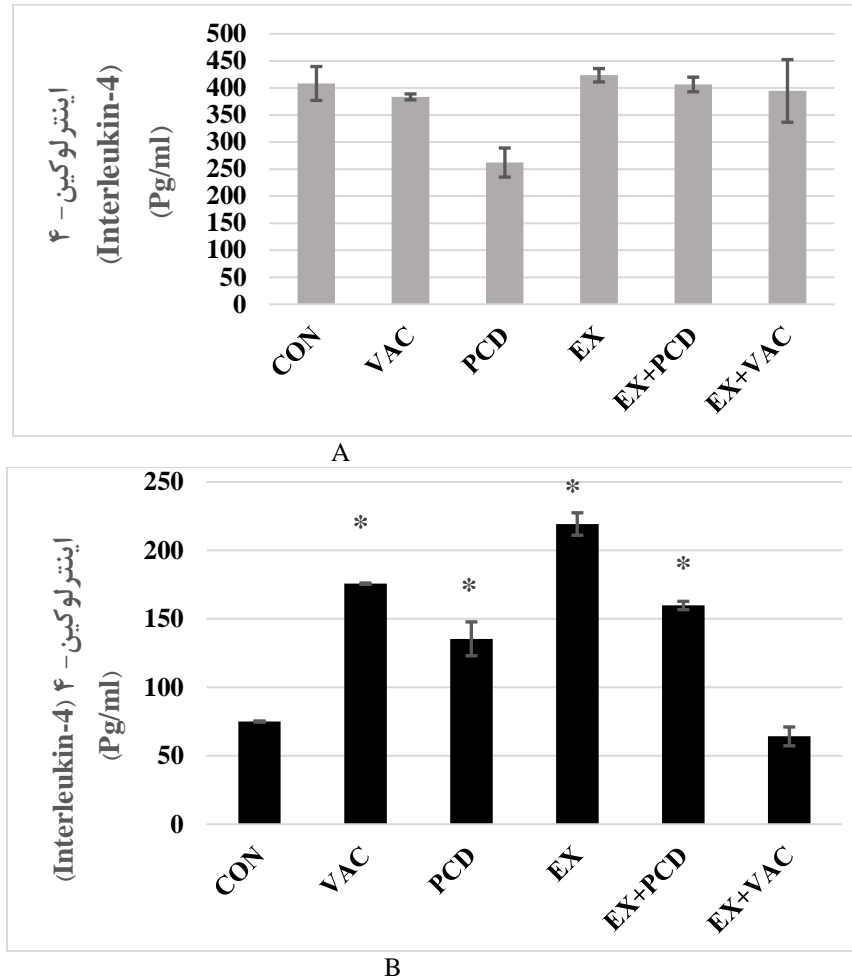


کشت سلولی و سنجش سایتوکاین های  $\text{INF-}\gamma$  و  $\text{IL-4}$  با روش الایزا در سلول های طحال: در شرایط استریل طحال از بدن خارج شد و در پلیت درون بافر PBS قرار گرفت. سپس به صورت سوسپانسیون درآمد و دو بار در PBS سرد و دور  $300\text{ g}$  و دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه شست و شو شد و به رسوب به دست آمده بافر لیزکننده به حجم  $5\text{ ml}$  اضافه شد و آن گاه به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به آن ها به مقدار  $5\text{ ml}$  محیط  $\text{RPMI-1640} + \text{FBS } 10\%$  اضافه شد و پس از عبور سلول ها از الک سلولی سه بار در PBS همانند دفعه قبل شست و شو شد. سپس در محیط کشت  $\text{RPMI-1640} + \text{FBS } 10\%$  سوسپانسیون شد، یک نمونه از آن با رنگ تریپان بلو رنگ شد و به کمک لام نئوبار شمارش شد. در نهایت، سلول ها به سوسپانسیون  $3 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  رسانیده شد. از سوسپانسیون سلولی به دست آمده در پلیت بیست و چهار خانه ای کشت داده شد و با آنتی ژن اختصاصی تحریک گردید. در هر حفره  $6 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ ، در محیط کشت قرار گرفت و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور  $37$  درجه به همراه پنج درصد  $\text{CO}_2$  کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت سوپروبی جمع آوری شد و تست الایزا برای سنجش میزان سایتوکاین های مذکور با استفاده از کیت های تجاری R&D ساخت کشور آمریکا براساس پروتکل کارخانه سازنده انجام شد.

## نتایج

برای بررسی فعال سازی سلول های  $\text{Th1}$  و  $\text{Th2}$  میزان سایتوکاین های  $\text{INF-}\gamma$  و  $\text{IL-4}$  به عنوان شاخص فعال سازی این سلول ها در سوسپانسیون طحال با روش الایزا اندازه گیری شد. میزان سایتوکاین  $\text{IL-4}$  در شکل شماره نشان داده شده است. براساس این شکل، قبل از استفاده از پپتید تفاوت معناداری بین گروه های پژوهش وجود نداشت ( $P > 0.05$ ، شکل شماره یک A). با تحریک پپتید 9D1 تفاوت معناداری بین گروه های پژوهش مشاهده شد ( $P < 0.05$ ، شکل شماره یک B). براساس نتایج آزمون توکی، تمام گروه های پژوهش تفاوت معناداری را با گروه EX نشان دادند ( $P < 0.05$ ، شکل شماره یک B).





شکل ۱- سایتوکاین اینترلوکین-۴ (IL-4) در گروه‌های پژوهش

شکل A: مرحله قبل از تحریک با پپتید؛ شکل B: مرحله بعد از استفاده از پپتید 9D1

\*: تفاوت معنادار با گروه کنترل؛ CON: کنترل؛ VAC: واکسن؛ PCD: PCDNA؛ EX: تمرین؛ EX+PCD:

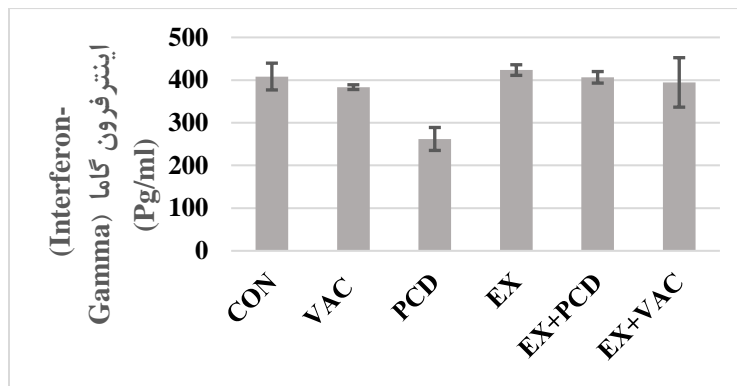
تمرین + واکسن؛ EX+VAC: تمرین + واکسن

**Figure 1: Interleukin-4 (IL-4) cytokine levels in different groups A: Before peptide stimulation; Figure B: After using the 9D1 peptide**

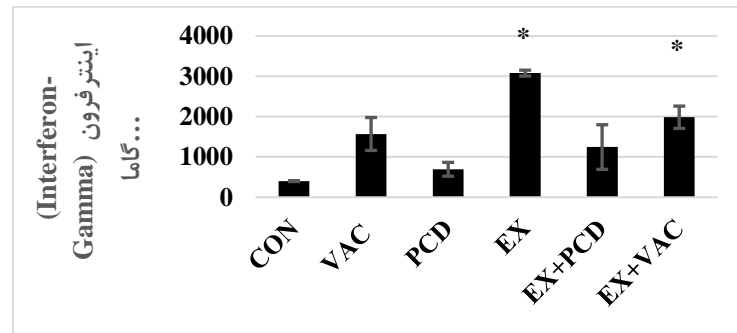
\*:significant difference with the control group; CON: control; VAC: vaccine; PCD: PCDNA; EX: Exercise Group; EX+PCD: Exercise + PCDNA; EX+VAC: Exercise + Vaccine



نتایج مربوط به سایتوکاین  $INF-\gamma$  در شکل شماره دو نشان داده شده است. درباره تغییرات  $INF-\gamma$  باید گفت، بین گروه‌های پژوهش در مرحله قبل از تحریک با پپتید تفاوت معناداری مشاهده نشد ( $P>0.05$ ، شکل شماره دو A)، اما بعد از تحریک با پپتید تفاوت معناداری بین گروه‌های پژوهش دیده شد ( $P<0.05$ ، شکل شماره دو B). آزمون پیگیری توکی تفاوت معناداری را بین گروه‌های کنترل با EX و EX+VAC نشان داد. همچنین تفاوت معناداری بین گروه واکسن و EX مشاهده شد (شکل شماره دو B).



A



B

شکل ۲- نتایج مربوط به سایتوکاین اینترفرون گاما ( $INF-\gamma$ ) در گروه‌های پژوهش

Figure 2- Interferon-Gamma cytokine levels in different groups.

شکل A: مرحله قبل از تحریک با پپتید؛ شکل B: مرحله بعد استفاده از پپتید 9D1

\*: تفاوت معنادار با گروه کنترل؛ VAC: واکسن؛ PCD: PCDNA؛ EX: تمرین؛ EX+PCD: تمرین +

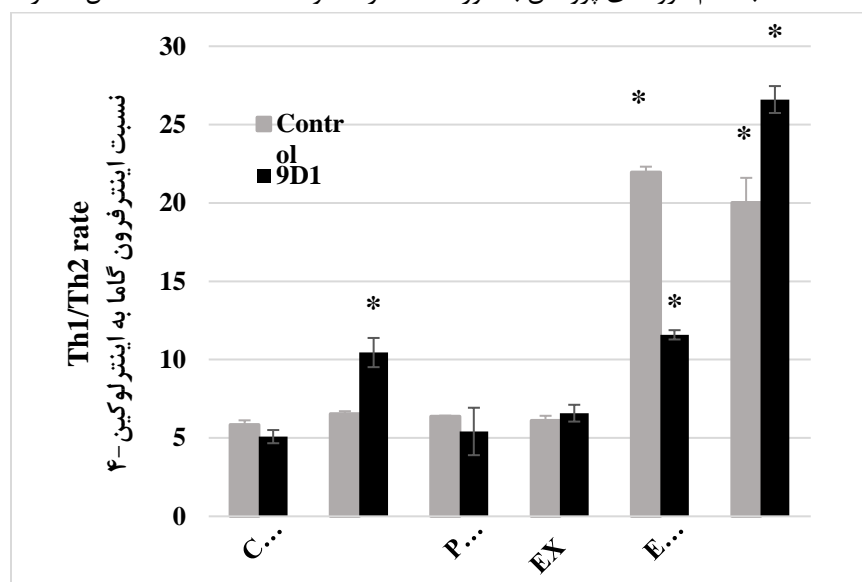
PCDNA؛ EX+VAC: تمرین + واکسن

Figure 2: Interferon-Gamma ( $INF-\gamma$ ) cytokine levels in different groups A: Before peptide stimulation; Figure B: After using the 9D1 peptide



\*:significant difference with the control group; CON: control; VAC: vaccine; PCD: PCDNA; EX: Exercise Group; EX+PCD: Exercise + PCDNA; EX+VAC: Exercise + Vaccine

نتایج مربوط به نسبت  $INF-\gamma$  به  $IL-4$  به عنوان شاخص فعال سازی  $Th1/Th2$  در شکل شماره سه نشان داده شده است. براساس نتایج، تفاوت معنادار بین گروه‌های پژوهش مشاهده می‌شود ( $P < 0.05$ ؛ شکل شماره سه). نتایج آزمون تعقیبی توکی درباره گروه کنترل نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های  $EX+PCD$  و  $EX+VAC$  با تمام گروه‌های پژوهش است. از سوی دیگر، بعد از تحریک با پپتید 9D1 بین گروه‌های کنترل با واکسن،  $EX+PCD$  و  $EX+VAC$  تفاوت معناداری مشاهده می‌شود. گروه واکسن همچنین با گروه‌های  $PCD$  و  $EX+VAC$  تفاوت معناداری را نشان داده است و گروه  $EX+VAC$  با تمام گروه‌های پژوهش به صورت معنادار متفاوت است ( $P < 0.05$ ، شکل شماره سه).



شکل ۳- نسبت  $Th1/Th2$  در گروه‌های پژوهش

\*: تفاوت معنادار با گروه کنترل؛ C: کنترل؛ VAC: واکسن؛ PCD: PCDNA؛ EX: تمرین؛ EX+PCD: تمرین + PCDNA؛ EX+VAC: تمرین + واکسن

Figure 3: Th1/Th2 Ratio in different groups

\*:significant difference with the control group; CON: control; VAC: vaccine; PCD: PCDNA; EX: Exercise Group; EX+PCD: Exercise + PCDNA; EX+VAC: Exercise + Vaccine



## بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش در نتایج مربوط به نسبت  $\text{INF-}\gamma$  به  $\text{IL-4}$  به عنوان شاخص فعال سازی  $\text{Th1/Th2}$  بعد از تحریک با پپتید 9D1 بین گروه های کنترل با واکسن،  $\text{EX+PCD}$  و  $\text{EX+VAC}$  تفاوت معنادار مشاهده می شود. همچنین گروه  $\text{EX+VAC}$  با تمام گروه های پژوهش تفاوت معنادار دارد. این نتایج تأییدکننده اثرات اجوانتی گروه  $\text{EX+VAC}$  است. نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده تأثیرات اجوانتی سه وهله فعالیت ورزشی برون گرای استقامتی به عنوان اجوانت DNA واکسن HSV-gD1 است. پاسخ-های ایمونولوژیک ایجاد شده درباره سلول های  $\text{Th1}$  و  $\text{Th2}$  تأییدکننده این موضوع است.

مطالعات دیگری در حیطه ایمونولوژی ورزش، اثرات اجوانتی فعالیت های ورزشی را در نمونه های انسانی و حیوانی و در مدل های مختلف واکسن بررسی کرده اند. نکته درخور توجه این است که بیشتر مطالعات در این زمینه از فعالیت ورزشی برون گرا استفاده کرده اند که در نمونه های انسانی به صورت مقاومتی اجرا شده است (۱۸، ۱۷، ۳). همچنان که تأیید شده است، این نوع فعالیت ورزشی هم زمان با فعال سازی عوامل آسیب سلولی در عضله اسکلتی است که می توانند در فراخوانی بیشتر سلول های عرضه کننده آنتی ژن مؤثر باشند (۲۰، ۱۹). نکته تأمل کردنی در این مطالعات، توجه به ایمنی سلولی و هومورال و تأثیرپذیری هر دو بخش سیستم ایمنی از شدت تمرینات برون گراست. ادواردز و همکاران طی مطالعه ای، ۱۶۰ فرد سالم جوان را به چهار گروه تقسیم کردند: گروه کنترل، گروه ورزش با شدت ۶۰ درصد قدرت یک تکرار بیشینه، گروه ورزش با شدت ۸۵ درصد قدرت یک تکرار بیشینه و گروه ورزش با شدت ۱۰۰ درصد قدرت یک تکرار بیشینه. همه آزمودنی های گروه های ورزشی، ۵۰۰ مرتبه انقباض اکسنتریک در اندام فوقانی انجام دادند. بلافاصله پس از اتمام ورزش، به همه آزمودنی ها واکسن نیم دوز آنفولانزا تزریق شد. خون گیری قبل از مداخله و ۲۸ روز پس از مداخله صورت گرفته بود. براساس نتایج، بین عملکرد ایمونولوژیک گروه کنترل و گروه های ورزشی تفاوت وجود داشت، اما بین گروه های ورزشی با شدت های مختلف تفاوت دیده نشد (۲۱). در مطالعه دیگری، ۱۵۶ آزمودنی سالم (۷۶ مرد و ۸۰ زن) به چهار گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه واکسن بلافاصله پس از ورزش، گروه واکسن شش ساعت پس از ورزش و گروه واکسن ۴۸ ساعت پس از ورزش. گروه های ورزش ۵۰ مرتبه انقباض اکسنتریک با ۸۵ درصد قدرت یک تکرار بیشینه خود، با اندام فوقانی اجرا کردند. خون گیری ها قبل از مداخله و ۲۸ روز پس از آن صورت گرفت. نتایج تحقیق هیچ گونه تفاوتی در

1. Edwards et al



Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

ایمنی همورال و سلولی بین گروه‌های مختلف نشان نداد که پژوهشگران دلیل آن را داشتن سیستم ایمنی سالم و عملکرد مناسب آن را در آزمودنی‌ها گزارش کردند (۱۸). از سوی دیگر، فعالیت‌های ورزشی که به‌صورت عمدتاً استقامتی و با شدت متوسط انجام شده‌اند، به‌صورت معمول یا اثرات اجوانتی را نشان نمی‌دهند یا عمدتاً دربارهٔ اثرات آن‌ها بر ایمنی سلولی مشاهده می‌شود (۲۳، ۲۲، ۱۵، ۶). در مطالعه‌ای، در موش‌های واکسینه‌شده در برابر هیپاتیت B که در شدت متوسط (حدود ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) ورزش کرده بودند، پاسخ ایمنی سلولی با افزایش تولید سایتوکاین‌های وابسته به Th1، تکثیر آنتی‌ژن اختصاصی سلول‌های T و پیروسی افزایش یافت (۲۴).

لانگ و همکاران<sup>۱</sup>، ۶۰ فرد جوان و ۶۰ فرد سالمند را به دو گروه ورزش و کنترل تقسیم کردند و خون‌گیری اولیه را انجام دادند. گروه‌های ورزش، با شدت ۵۵ درصد حداکثر ضربان قلب خود به مدت ۴۵ دقیقه پیاده‌روی کردند. بلافاصله پس از اتمام ورزش، نیمی از آزمودنی‌ها دوز کامل واکسن پنوموکوکال و نیم دیگر آن‌ها دوز نیم‌برابر واکسن آنفلانزا را دریافت کردند. پس از چهار هفته، خون‌گیری مجدد انجام شد. نتیجه مطالعه نشان داد، تفاوتی در عملکرد ایمنی و اثرگذاری ورزش به‌عنوان اجوانت برای واکسن در بین گروه‌ها دیده نشد که احتمالاً به‌دلیل کمبود شدت فعالیت ورزشی بود (۶). فعالیت‌های ورزشی به‌ویژه فعالیت‌های یک‌وهله‌ای با توجه به ایجاد آسیب‌های ریزعضلانی می‌توانند در فراخوانی بیشتر سلول‌های ایمنی ذاتی به‌سمت عضله اسکلتی و در نتیجه فعال شدن مؤثر سیستم ایمنی اکتسابی تأثیرگذار باشند (۲۵، ۳). تأثیر انواع فعالیت‌های ورزشی با شدت‌های مختلف هنوز مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد شدت‌های بهینه می‌توانند در افزایش احتمالی کارایی واکسن‌ها مؤثر باشند.

با وجود مطالعات انجام‌شده در زمینه واکسن‌های سنتی و فعالیت‌های ورزشی درباره واکسن‌های جدید مانند DNA، درمورد واکسن‌ها و تأثیرات آن‌ها بر سیستم ایمنی هنگام استفاده از فعالیت‌های ورزشی به‌عنوان اجوانت مطالعات محدودی انجام شده‌اند. به نظر می‌رسد، این مدل واکسن‌ها در بیماری‌های نوظهور بیشتر به کار می‌رود (۲۶، ۲۵)؛ بنابراین لزوم بررسی پاسخ‌های ایجادشده در سلول‌های سیستم ایمنی در کنار فعالیت‌های ورزشی مدنظر است. بیشترین پاسخ‌های ایجادشده در سلول‌های T در گروه سه‌وهله ورزش و واکسن و تحت تأثیر آنتی‌ژن ایجاد شده است. در مطالعات گذشته نیز به تحریک پاسخ‌های سیستم ایمنی در نمونه‌های جوان به‌ویژه ایمنی سلولی بدون واکسن توجه شده است (۲۷).

1. Long et al



۲۴). تغییرات هورمونی، نوروترانسمتورها و افزایش شاخص‌های آسیب عضلانی به دنبال فعالیت‌های استقامتی طولانی مدت با بخش برون گرا می‌توانند از عوامل تحریک کننده پاسخ‌های ایمنی سلولی در مطالعه حاضر باشند (۳).

باین حال، توجه به نتایج نشان دهنده نبود تغییرات عمده در پاسخ‌های Th2 است این شاخص می‌تواند در تحریک تولید آنتی‌بادی‌ها مؤثر باشد. برخی از مطالعات پیشنهاد می‌کنند که اثرات اجوانتی فعالیت‌های ورزشی می‌توانند در افراد با ضعف سیستم ایمنی مانند افراد سالمند مدنظر قرار گیرد (۳۰-۲۸). پاسخ‌های آنتی‌بادی‌های به صورت اولیه یا ثانویه به دنبال فعالیت‌های ورزشی مشاهده می‌شود؛ از این رو به نظر می‌رسد انجام مطالعات بیشتر در این زمینه به ویژه استفاده از نمونه‌های با ضعف سیستم ایمنی می‌تواند به بخشی از سؤال‌های موجود پاسخ دهد.

### پیام مقاله

نتایج مطالعه حاضر تأییدکننده افزایش نسبت سلول‌های Th1/Th2 به دنبال فعالیت‌های ورزشی چندوله‌ای استقامتی طولانی مدت برون گرا بوده است. تحریک آسیب عضلانی از طریق فعالیت ورزشی در هنگام تزریق DNA واکسن احتمالاً در فراخوانی سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی و تحریک مؤثر ایمنی اکتسابی مؤثر بوده است. باین حال مطالعات بیشتر در این زمینه و استفاده از نمونه‌های مختلف با شدت‌ها و مدت مختلف فعالیت‌های ورزشی می‌تواند به بخشی از سؤالات موجود در زمینه ی ارتباط بین فعالیت‌های ورزشی و واکسن‌ها به ویژه واکسن‌های جدید پاسخ دهد.

### منابع

1. Bartlett BL, Pellicane AJ, Tying SK. Vaccine immunology. *Dermatol Ther.* 2009;22(2):104-9.
2. Bolhassani A, Talebi S, Anvar A. Endogenous and exogenous natural adjuvants for vaccine development. *Mini Rev Med Chem.* 2017;17(15):1442-56.
3. Pascoe AR, Fiatarone Singh MA, Edwards KM. The effects of exercise on vaccination responses: a review of chronic and acute exercise interventions in humans. *Brain Behav Immun.* 2014;39:33-41.
4. Todryk SM. T Cell memory to vaccination. *Vaccines (Basel).* 2018;6(4):84.
5. Gleeson M, Bishop N, Walsh N. *Exercise immunology.* London: Routledge; 2013.
6. Long JE, Ring C, Bosch JA, Eves F, Drayson MT, Calver R, et al. A life-style physical activity intervention and the antibody response to pneumococcal vaccination in women. *Psychosom Med.* 2013;75(8):774-82.
7. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology.* 2007;103(2):693-9.



8. Simpson RJ, Campbell JP, Gleeson M, Krüger K, Nieman DC, Pyne DB, et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection? *Exercise Immunology Review*. 2020;26:8-22.
9. Nielsen HG, Oktedalen O, Opstad PK, Lyberg T. Plasma cytokine profiles in long-term strenuous exercise. *J Sports Med (Hindawi Publ Corp)*. 2016;2016:7186137.
10. Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev*. 2002;8:49-100.
11. Parise G, McKinnell IW, Rudnicki MA. Muscle satellite cell and atypical myogenic progenitor response following exercise. *Muscle Nerve*. 2008;37(5):611-9.
12. molanouri M, Jamali AJ, Mahdavi M. Adjuvant effect of short term endurance training on regulatory T cells in HSV-1 vaccine and its boosters. *Journal of Sport Biosciences*. 2018;10(1):77-85.
13. Molanouri Shamsi M, Mahdavi M, Heydarzadeh E. Changes in interleukin-2 and interleukin-12 cytokines in spleen cells of balb-c mice after using an acute endurance exercise as an adjuvant for herpes simplex virus 1 vaccine. *Sport Physiology*. 2017;9(35):63-74.
14. Giefing-Kröll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 2015;14(3):309-21.
15. Shamsi MM Najedi S, Hassan Z, Isanejad A, Mahdavi M. Short term exercise training enhances cell-mediated responses to HSV-1 vaccine in mice. *Microbial Pathogenesis*. 2017;110:457-63.
16. Ghaemi A, Soleimanjahi H, Bamdad T, Soudi S, Arefeian E, Hashemi SM, et al. Induction of humoral and cellular immunity against latent HSV-1 infections by DNA immunization in BALB/c mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007;30(4):197-210.
17. Edwards KM, Burns VE, Allen LM, McPhee JS, Bosch JA, Carroll D, et al. Eccentric exercise as an adjuvant to influenza vaccination in humans. *Brain Behav Immun*. 2007;21(2):209-17.
18. Edwards KM, Burns VE, Reynolds T, Carroll D, Drayson M, Ring C. Acute stress exposure prior to influenza vaccination enhances antibody response in women. *Brain Behav Immun*. 2006;20(2):159-68.
19. Paulsen G, Ramer Mikkelsen U, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise Immunology Review*. 2012;18:42-97.
20. Thompson H, Scordilis S, Clarkson P, Lohrer W. A single bout of eccentric exercise increases HSP27 and HSC/HSP70 in human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2001;171(2):187-93.
21. Edwards KM, Campbell JP, Ring C, Drayson MT, Bosch JA, Downes C, et al. Exercise intensity does not influence the efficacy of eccentric exercise as a behavioural adjuvant to vaccination. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2010;24(4):623-30.





22. Rogers CJ, Zaharoff DA, Hance KW, Perkins SN, Hursting SD, Schlom J, et al. Exercise enhances vaccine-induced antigen-specific T cell responses. *Vaccine*. 2008;26(42):5407-15.
23. Molanouri Shamsi M, Jamali A. Adjuvant effect of an acute moderate endurance exercise in herpes simplex virus 1 vaccination and its boosters on interleukin 10 cytokine and granzyme B in mice. *Tehran University Medical Journal*. 2018;76(2):96-102.
24. Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira V, Niu Y, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2012;22(5):643-52.
25. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2011;3(1):73.
26. Smith TR, Patel A, Ramos S, Elwood D, Zhu X, Yan J, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nature Communications*. 2020;11(1):1-13.
27. Jeyanathan M, Afkhami S, Smaill F, Miller MS, Lichty BD, Xing Z. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(10):615-32.
28. Campbell JP, Edwards KM, Ring C, Drayson MT, Bosch JA, Inskip A, et al. The effects of vaccine timing on the efficacy of an acute eccentric exercise intervention on the immune response to an influenza vaccine in young adults. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2010;24(2):236-42.
29. Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G, Bigley AB, LaVoy EC, Kunz H. Exercise and the aging immune system. *Ageing Research Reviews*. 2012;11(3):404-20.
30. Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J. Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(7):3043-7.
31. Bohn-Goldbaum E, Pascoe A, Singh MF, Singh N, Kok J, Dwyer DE, et al. Acute exercise decreases vaccine reactions following influenza vaccination among older adults. *Brain, Behavior, & Immunity-Health*. 2020;1:100009.



**استناد به مقاله**

افشون پور محمدطاهر، ملانوری شمسی مهدیه، صعودی سارا، سلیمان جاهی حوریه، قراخانلو رضا. تأثیر یک دوره کوتاه مدت فعالیت ورزشی برون گرای استقامتی بر سلول های کمک کننده T به دنبال تزریق DNA واکسن بیان کننده گلیکوپروتئین D ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۴۰۲؛ ۱۵(۵۷): ۴۸-۱۳۱. شناسه دیجیتال: 10.22089/SPJ.2021.9996.2109

M. T. Afshounpour, M. Molanouri Shamsi, S. Soudi, H. Soleimanjahi, R. Gharakhanlou. The Effect of Short-Term Eccentric Endurance Exercise on T-helper Cells Following Injection of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein D DNA Vaccine. Spring 2023; 15(57): 131-48. (In Persian). Doi: 10.22089/SPJ.2021.9996.2109

