

Markører for overbelastning under en fem-dagers fysisk krevende militærøvelse

Yngvar Gundersen, Bård Lundeland, Ingjerd Thrane, Per-Kristian Opstad
og Per Vaagenes

Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)

14.05.2008

FFI-rapport 2008/01089

109301

P: ISBN 978-82-464-1383-9

E: ISBN 978-82-464-1384-6

Emneord

Fysisk aktivitet/physical activity

Overbelastning/overreaching

Plasmamarkører/plasma markers

Immunologi/immunology

Godkjent av

Per Kristian Opstad

Prosjektleder

Bjørn Johnsen

Forskningsjef

Jan Ivar Botnan

Avdelingssjef

Sammendrag

Innledning: Intense og langvarige anstrengelser kan redusere den fysiske yteevnen både på grunn av overbelastning og ved at forekomsten av (særlig) øvre luftveisinfeksjoner øker. Det siste kan skyldes den negative påvirkningen av immunforsvaret. Når kraftige fysiske belastninger med submaksimal intensitet gjentas med korte og ofte utilstrekkelige hvileperioder over flere dager, slik som en ser ved f.eks. militære manøvrer, kan en tenke seg at disse effektene vil forsterkes. Målet med den aktuelle studien var å undersøke hvordan foreslåtte markører for overbelastning reagerte på en militærøvelse med en serie fysiske utfordringer over flere dager. **Materiale og metoder:** Åtte friske mannlige soldater ($22,8 \pm 0,8$ år) ble inkludert i studien. I løpet av fem dager gjennomførte de et fysisk krevende program, men fikk tilstrekkelig mat/drikke og søvn. Blodprøver ble tatt før øvelsen begynte (normalprøve), 1 time etter et standardisert 7 km langt feltløp på første dag, på morgenen dag 5, samt 1 time etter et identisk feltløp på dag 5. Som mål på hvordan soldatene taklet de fysiske utfordringene, undersøkte vi serumnivåene for utvalgte intracellulære enzymer, immunparametre, cytokiner og glutamin/glutamat-ratio. I *ex vivo* fullblod fra de samme tidspunktene undersøkte vi også hvordan de fysiske utfordringene påvirket de sirkulerende leukocyttenes evne til å reagere på et maksimalt stimulus (lipopolysakkarid, LPS) ved moderat hypertermi. **Resultater:** ASAT, ALAT og CK steg markant, sannsynligvis først og fremst på grunn av mikrotraumer i muskulaturen og derav følgende lekkasje ut av cellene. Begge feltløp førte til moderat stigning i totalt leukocyt-tall med økt antall granulocytter og reduserte lymfocytverdier. $CD4^+/CD8^+$ -ratio så ut til å stige utover i forsøket. Leukocyttenes evne til å reagere på LPS falt etter begge feltløpene. Før andre løp var nivåene imidlertid tilbake til det normale. Det var ingen forandringer i glutamin/glutamat-ratio. **Konklusjoner:** For gruppa som helhet fant vi bare moderate forandringer i de målte parametrene. Det var ingen sikre tegn til overbelastning.

English summary

Introduction: Prolonged and demanding physical activity may reduce the physical performance, both due to overreaching and because of increased incidence of (in particular) upper respiratory tract infections. The latter is a result of the negative impact upon immunity. When heavy physical exertion is repeated over several days, with short and inadequate time for restitution (as in military manoeuvres), these effects may be amplified. The aim of the present study was to investigate how a military exercise over five days influenced proposed markers of overreaching.

Materials and Methods: Eight male soldiers (22.8 ± 0.8 years) were included. During five consecutive days they completed a physically demanding program, but had sufficient food, fluid and sleep. Blood samples were drawn before the study started (baseline), 1h after a standardised 7 km military cross-country race on day 1, in the morning of day 5, and 1h following an identical race on day 5. As markers of the individual ability to cope with the physical challenges, we used selected intracellular enzymes, immune parameters, cytokines, and glutamine/glutamate (gln/glu)-ratio. In *ex vivo* whole blood sampled at the same time points we also measured how circulating leukocytes reacted to a maximal lipopolysaccharide (LPS) stimulus, and the effects of concomitant elevations of temperature. **Results:** Serum values of AST, ALT and CK increased markedly from baseline to end, presumably because of exercise-induced muscle damage and subsequent leakage of intracellular enzymes. The cross-country races led to moderate rises of total leukocyte count, hiding increased granulocyte count and reduced number of lymphocytes. $CD4^+/CD8^+$ -ratio increased during the study. The response of circulating immune cells to the LPS stimulus was reduced after both field courses. Before the second run the values were back to normal. No changes were seen for gln/glu-ratio. **Conclusions:** Only moderate changes of the chosen parameters were detected. No convincing evidence of overreaching was found.

Innhold

1	Innledning	7
2	Materiale og metoder	8
2.1	Forsøkspersoner	8
2.2	Aktivitetsprogram	8
2.3	Blodprøver og analyser	9
2.4	Hematologiske og biokjemiske målinger	10
2.5	Fullblodmodellen	10
2.6	Måling av cytokiner og aminosyrer	10
2.7	Statistisk analyse	10
3	Resultater	10
3.1	Fysiske karakteristika.	10
3.2	Maksimalt oksygenopptak (VO_{2max})	11
3.3	Biokjemiske målinger	11
3.4	Hematologiske verdier	12
3.5	Forandringer i immunologiske variabler	13
3.5.1	Hvite blodlegemer (leukocytter)	13
3.5.2	Subpopulasjoner av lymfocytter	13
3.6	Temperaturer	15
3.7	Inflammasjonsmarkører	15
3.7.1	Cytokiner	15
3.8	Cortisol	18
3.9	Forandringer i aminosyresammensetningen	18
4	Diskusjon	19
	Referanser	20

1 Innledning

For å spisse formen legger mange toppidrettsutøvere inn perioder med store og intensive treningsmengder kombinert med utilstrekkelige hvile ("overbelastning"). Dette fører til at prestasjonene på kort sikt synker, og det tar gjerne flere dager å gjenvinne det tapte. Formålet med dette opplegget er at kroppen under restitusjonen skal "overkompensere" slik at yteevnen deretter når en kortvarig topp. Hvis den manglende balansen mellom trening og hvile varer for lenge, kan konsekvensen i stedet bli "overtrening", en tilstand som gjør at funksjonsevnen synker i lang tid (måneder/år). Men det finnes også andre farer i kjølvannet av for store treningsmengder. De siste årene er det kommet en rekke rapporter som viser at det er en sammenheng mellom utmattende fysisk aktivitet og infeksjonsrisiko (særlig øvre luftveisinfeksjoner), (1). Infeksjonene ser også ut til å vare lenger og fører til flere komplikasjoner, bl.a. "postviralt utmattelsessyndrom". Infeksjonssykdommer, selv de mildeste formene, er kjent for å redusere den fysiske yteevnen (2). Idrettsutøvere på dette nivået balanserer altså på en knivsegg der riktig forhold mellom trening og hvile kan være avgjørende for suksess eller fiasko.

I militær sammenheng kan en tenke seg at overbelastning forekommer i forbindelse med øvelser og manøvrer som strekker seg over flere dager/uker og gjerne inneholder elementer som stor fysisk (evt. også psykisk) belastning, utilstrekkelig næring, mangel på søvn, samt ytre miljøpåkjenninger som varme, kulde, vind, fuktighet, høyde osv. Dersom kravene til fysisk yteevne overstiger kapasiteten til den enkelte deltaker, vil prestasjonsnivået sannsynligvis synke forbigående. Størrelsen og lengden på dette fallet er trolig avhengig av hvor nær og hvor lenge en person har operert i forhold til sin maksimale yteevne (VO_2 max)

Både i sivil og militær sammenheng har en prøvd å finne metoder som på et tidlig tidspunkt kan avsløre om gitte aktiviteter overstiger grensen for overbelastning. I litteraturen er det forslått en lang rekke markører til dette formålet:

1. Intracellulære enzymer (eks. CK, ASAT) i blod.

Ved skade, f.eks. fra muskulaturen, lekker disse enzymene ut av cellene og over i blodet, hvor de enkelt kan måles.

2. Immunparametre.

Det er vist at gjentatte og langvarige fysiske anstrengelser er forbundet med nedsatt funksjon i immunapparatet (3).

3. Proinflammatoriske cytokiner som TNF- α , IL-1 β og IL-6.

Mikrotraumer i muskulaturen kan utløse en lokal betennelsesreaksjon. Hvis restitusjonsfasen blir for kort, kan videre fysisk aktivitet gjøre tilstanden kronisk. Vedvarende lokal produksjon av proinflammatoriske cytokiner vil etter hvert utløse en generalisert inflammasjonstilstand som gir kliniske utslag. De som rammes, føler seg i dårlig form, er trøtte, mangler matlyst og er ofte nedstemte (4).

4. Glutamin; glutamin/glutamat ratio (gln/glu-ratio).

Økt fysisk aktivitet fører til at musklene forbruker mer av aminosyren glutamin. Glutamin syntetiseres fra ammoniakk og glutamat, og forandringer i forholdet mellom glutamin og glutamat er foreslått som en tidligmarkør på overbelastning (5).

I den foreliggende studien ønsket vi å undersøke om en militærøvelse over fem dager med betydelig fysisk innsats påvirket markørene for overbelastning. I tillegg ville vi se på hvordan den fysiske belastningen virket inn på leukocyttenes maksimale reaksjonsevne etter stimulering med lipopolysakkarid (LPS). LPS er en vital bestanddel i cellemembranen til alle Gram-negative bakterier og er mye brukt for å stimulere immunceller *in vitro*. Tette økter med langvarige fysiske anstrengelser medfører betydelig varmeproduksjon og økt kroppstemperatur (38-40 °C). Effekten av moderat økt temperatur på leukocytffunksjonen ble derfor også undersøkt.

2 Materiale og metoder

2.1 Forsøkspersoner

Åtte friske menn i alderen 21 – 26 år ble inkludert i studien.

2.2 Aktivitetsprogram

Programmet for øvelsen framgår av tabell 1. Deltakerne kunne spise og drikke fritt. Øvelsen inneholdt ingen elementer av søvnmangel.

Tabell 1. Program under øvelsen

Dag 1: TRE SESJONER MED FYSISKE AKTIVITETER MED VANLIG FELTBEKLEDNING

- Blodprøver (Dag 0)
- Frokost
- Fysisk aktivitet med skytetester før og etter
- 7 km med 22 kg oppakning (så raskt som mulig gruppevis; ca 50 min og 8 km/t)
- Blodprøver (dag 1) (1 time etter fysisk aktivitet)
- Lunsj
- Fysisk aktivitet med skytetester før og etter
- Marsj til kort hinderløype og tilbake (ca 3,6 km) og to ganger gjennomføring av hinderløype (ca 2 x 5 min) (så raskt som mulig individuelt)
- Middag
- Fysisk aktivitet med kognitiv test før og etter
- Bårebæring, 60 kg på 4 mann, ca 20 min på 2 km (ca 6 km/t) (så raskt som mulig gruppevis)

Dag 2,3,4: TRE SESJONER MED FYSISKE AKTIVITETER MED CBRN UTRUSTNING

3 konsept: A: "NORMANS" B: "Blücher på" C: "Blücher i sekken"

- Frokost
- Kognitiv test
- Fysisk aktivitet. Lang hinderløype (2 x 1,5 km) (så raskt som mulig individuelt; ca 30 min og ca. 6 km/t)
- Gassalarm (tar på vernemaske og bekledning og lukker alle åpninger)
- 15 min opphold i gassbua med CS-gass og med kognitiv test i bua. Kognitiv test (også etter opphold i bua)
- Lunsj
- Fysisk aktivitet med skytetester før og etter
- Marsj i ca 80 min inkludert 10 min hvile (går gruppevis i rask gange ca 6 km/t)
- Middag
- Fysisk aktivitet med skytetester før og etter
- Vannkannebæring, 20 kg, så langt som mulig på 15min (så raskt som mulig individuelt; fra 5 til 9 km/t)

Dag 5: EN SESJON MED FYSISKE AKTIVITETER MED VANLIG FELTBEKLEDNING

- Blodprøver (Dag 5/0)
- Frokost
- Fysisk aktivitet med skytetester og kognitiv test før og etter.
- 7 km med 22 kg oppakning (så raskt som mulig gruppevis; ca 50 min og 8 km/t)
- Blodprøver (Dag 5/1) (1 time etter fysisk aktivitet)
- Lunsj
- Besvarelse av spørreskjema
- Avslutning med prisutdeling (beste skytter, beste individ totalt sett og beste individ og gruppe på de fysiske testene)

2.3 Blodprøver og analyser

Blodprøvene ble tappet fra en armvene med forsøkspersonene sittende. Første prøve ble tatt før studien begynte (kontroll, tidspunkt 0), neste 1 time etter fullført 7 km feltløp på dag 1 (tidspunkt 1). På morgenen dag 5 ble det tatt kontrollprøve umiddelbart før gjennomføring av nytt og identisk 7 km feltløp (tidspunkt 5/0). Siste prøve ble tatt 1 time etter innkomst (tidspunkt 5/1). EDTA eller heparin glass (Vacuette, Greiner) ble brukt til oppsamling. Analyse og videre behandling ble gjort umiddelbart.

2.4 Hematologiske og biokjemiske målinger

Hemoglobin, hematokrit og totalt leukocyt-tall ble undersøkt i EDTA-blod på en automatisk hematologimaskin (Advia 60, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, USA). Målingene ble utført umiddelbart etter blodprøvetaking.

2.5 Fullblodmodellen

De hvite blodlegemenes (leukocyttenes) evne til å reagere på stimulering med LPS ble undersøkt i en fullblodmodell. Prøvene fra hver person ble fordelt i reagensglass á 3 ml og inkubert ved 3 forskjellige temperaturer:

1. 6 timer ved 37 °C
2. 3 timer ved 40 °C + 3 timer ved 37 °C
3. 6 timer ved 40 °C

Umiddelbart før inkubasjonen ble prøvene tilsatt LPS 5 ng/ml, en behandling som er antatt å føre til bortimot maksimal aktivering. Ved hver temperatur hadde vi dessuten en kontroll uten tilsats av LPS. Prøvene ble under hele forsøket sakte rotert for å hindre at cellene sedimenterte. Ved slutten av forsøket ble rørene sentrifugert, supernatanten avpipettert og øyeblikkelig plassert i – 20 °C. Temperaturens innvirkning på funksjonen i de sirkulerende hvite blodcellene ble undersøkt ved å måle konsentrasjonen av utvalgte cytokiner (TNF- α , IL-1 β , IL-8).

2.6 Måling av cytokiner og aminosyrer

Kommersielle kit fra R & D Systems ble brukt for å bestemme cytokinnivåene. Til bestemmelse av aminosyrenivåene brukte vi HPLC.

2.7 Statistisk analyse

Resultatene er angitt som middelerverdier \pm standardfeil. Under bearbeidelsen er resultatene først testet for normalfordeling, deretter med enveis RM ANOVA, eventuelt enveis RM ANOVA on ranks, etterfulgt av Dunnetts *post hoc*-test. *P*-verdier mindre enn 0,05 ble ansett som statistisk signifikante.

3 Resultater

3.1 Fysiske karakteristika.

Fem av åtte soldater fullførte øvelsen, og vi har i det etterfølgende bare tatt med målinger fra disse. Frafallet skyldtes at en av soldatene vrikket ankelen under hinderløp, mens de to resterende forsvant på grunn av utenforliggende årsaker (time hos fysioterapeut og ferie). De fysiske karakteristika til deltakerne er vist i tabell 2.

Tabell 2

Fysiske karakteristika (gjennomsnitt \pm standardfeil)

Alder (år)	22,8 \pm 0,8
Kroppsmasse dag 0 (kg)	85,5 \pm 3,0
Kroppsmasse dag 5 (kg)	85,5 \pm 3,1
Vektforandring (%)	0
Høyde (cm)	184,7 \pm 2,6
Kroppsmasseindeks (BMI) dag 0	25,1 \pm 0,8

3.2 Maksimalt oksygenopptak (VO_{2max})

VO_{2max} (maksimalt surstoffopptak, aerob kapasitet) måler evnen til å transportere og forbruke oksygen, altså kapasiteten til hjerte og lunger. Det er sannsynligvis det beste enkeltmål for fysisk form. VO_{2max} uttrykkes enten i absolutte tall (ml/min) eller relativt til kroppsvekten (ml/min/kg). Enkelte toppidrettsutøvere med stor muskelmasse (f.eks. roere) vil generelt oppnå lavere relative verdier enn utøvere med liten absolutt muskelmasse (f.eks. langrennsløpere). Tabell 3 viser resultatene for våre soldater sammenlignet med et tilfeldig utvalg av andre grupper. Målingene ble gjort ved Toppidrettssentret før øvelsen begynte. Som det går fram, lå verdiene godt over det som er snitt for denne aldersgruppen. Ved systematisk fysisk trening ville det likevel vært en del å hente for vår gruppe

Tabell 3

VO_{2max} (ml/min/kg) (gjennomsnitt \pm standardfeil)

Gjennomsnitt unge kvinner	38
Gjennomsnitt unge menn	45
Rena 2007	54,3 \pm 1,6
Veltrent konkurranseidrettsutøver	70
Bjørn Dæhlie	96
Veddeløpshester	180
Sledehunder	240

3.3 Biokjemiske målinger

Både ASAT og ALAT steg signifikant fra dag 0 til dag 5/1. Kontrollverdiene til CK ble omtrent firedoblet på slutten av øvelsen for 4 av de 5 deltakerne, mens de falt for den siste (målefeil?). Dermed ble verdiene ikke statistisk signifikante. Ingen av disse

enzymene er organspesifikke, men sannsynligvis stammer mesteparten fra muskulaturen (mikroskader). Mekanisk skade er vanlig ved langvarig fysisk aktivitet, spesielt aktivitet med eksentrisk kontraksjon (strekking), f.eks. løping. lekkasje fra traumatiserte røde blodlegemer kan forklare en mindre del av de økte ASAT-verdiene. Forøvrig var det stort sett bare små og ikke-signifikante endringer.

Tabell 4

Biokjemiske verdier (gjennomsnitt ± standardfeil)

	Dag 0	Dag 5/1
Natrium (mmol/l)	139,0 ± 1,3	140,2 ± 0,86
Kalium (mmol/l)	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,2
Klor (mmol/l)	101,8 ± 1,1	103,2 ± 1,2
Kalsium (mmol/l)	2,25 ± 0,03	2,25 ± 0,02
Magnesium (mmol/l)	0,87 ± 0,02	0,81 ± 0,04
Kreatinin (µmol/l)	106,2 ± 4,6	111,6 ± 5,7
Urea (mmol/l)	5,4 ± 0,5	4,9 ± 0,7
ASAT (U/l)	24,6 ± 2,8	71,0 ± 14,7 *
ALAT (U/l)	30,8 ± 3,0	47,4 ± 6,9 *
Albumin (g/l)	46,8 ± 1,6	49,0 ± 0,8
CK (U/l)	252,0 ± 68,1	731,0 ± 177,8 (NS)
Laktat (mmol/l)	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2
Glukose (mmol/l)	5,3 ± 0,2	4,4 ± 0,1 *

* $p < 0,05$ sammenliknet med utgangsverdien (parvis t-test)

3.4 Hematologiske verdier

De hematologiske verdiene ble målt på alle fire måletidspunkter. Resultatene er vist i tabell 5. Som en måtte forvente, sank blodprosenten signifikant fra dag 0 til dag 5/1 (fra $15,7 \pm 0,3$ til $14,9 \pm 0,5$). En må gå ut fra at dette først og fremst skyldes fortytning. Det er mulig å beregne den prosentvise endringen i plasmavolum ved å bruke følgende formel: $PV \% = [(Hb_{\text{kontroll}}/Hb_{\text{test}}) \times (100 - hct_{\text{test}})/(100 - hct_{\text{kontroll}}) - 1] \times 100$; (5,6). Forandringene fra kontrollprøvene til prøvetidspunkt 1, 5/0 og 5/1 var henholdsvis $2,7 \pm 0,6 \%$, $9,8 \pm 3,0 \%$ og $13,6 \pm 2,2 \%$. Hemoglobinfallet er således noe mindre enn det en ville forvente ut fra disse beregningene. I tillegg kommer at langdistanseløping kan ødelegge røde blodlegemer som følge av mekanisk påkjenning.

Tabell 5

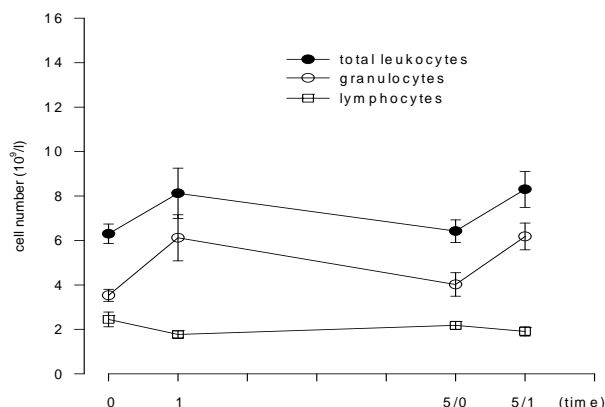
Hematologiske verdier (gjennomsnitt ± standardfeil)

	Dag 0	Dag 1	Dag 5/0	Dag 5/1
Hemoglobin (g/dl)	15,7 ± 0,3	15,8 ± 0,3	15,1 ± 0,3 *	14,9 ± 0,5 *
Hematokrit (%)	44,2 ± 0,7	44,3 ± 0,8	41,8 ± 0,9 *	41,4 ± 1,4 *
Blodplater (10 ⁹ celler/l)	251 ± 18	271 ± 13	262 ± 13	263 ± 18

* p < 0,05 sammenliknet med utgangsverdien (RM ANOVA + Dunnetts test)

3.5 Forandringer i immunologiske variabler

3.5.1 Hvite blodlegemer (leukocytter)



Figur 1. Leukocyt-tall i blodprøver tatt før og etter feltløp på dag 1 og dag 5. Totalverdiene stiger umiddelbart etter løpet, først og fremst på grunn av økt antall granulocytter. Lymfocytverdiene faller etter hvert løp. Se også tabell 6.

Feltløpet førte til karakteristiske forandringer i leukocytverdiene (figur 1). På dag 1 steg verdiene fra $6,3 \pm 0,4$ til $8,1 \pm 1,1 \cdot 10^9$ celler/l ($p = 0,08$; parvis t-test). En liknende utvikling fant vi også på dag 5 (fra $6,4 \pm 0,5$ til $8,3 \pm 0,8 \cdot 10^9$ celler/l; $p = 0,07$; parvis t-test). Bildet ble først og fremst bestemt av granulocyttopulasjonen, mens lymfocytene sank noe. Vi har tidligere gjort tilsvarende målinger på Krigsskolens stridskurs (8). Det er verd å merke seg at totalt antall hvite blodlegemer på stridskurset steg fra $6,2 \pm 0,5$ til $14,7 \pm 1,3 \cdot 10^9$ celler/l ($p < 0,05$), noe som kan antyde at den totale fysiske belastningen for krigsskolekadettene var betydelig høyere.

3.5.2 Subpopulasjoner av lymfocytter

Lymfocytter er hvite blodlegemer som gjerne deles opp i tre hovedkategorier, nemlig T-celler, B-celler og NK-celler. De to første hører til det ervervede immunforsvaret. Selv om lymfocytverdiene samlet så ut til å falle i forbindelse med feltløpet (figur 1, tabell 6), kan dette

tallet skjule viktige forskjeller i de ulike undergruppene. B-cellene er primært involvert i den humorale immuniteten (produksjon av antistoffer). I tråd med andre undersøkelser så B-celleverdiene ut til å være uendret (9). T-cellene er ansvarlig for det cellemedierte immunforsvaret. Det finnes to hovedtyper T-celler, nemlig T-hjelpeceller (CD4⁺) og T-effektorceller (cytotoksiske T-celler, CD8⁺). Kort kan en si at CD4⁺-cellene koordinerer den immunologiske responsen, mens CD8⁺-cellene uskadeliggjør infiserte celler (og kreftceller). Begge er essensielle for at den cellemedierte delen av immunforsvaret skal fungere, noe som kan illustreres ved det som skjer ved en HIV-infeksjon. HIV-viruset går spesifikt på CD4⁺-cellene, som angripes og ødelegges. Etter begge feltløpene falt tallet på CD8-celler signifikant, men fra dag 0 til dag 5/0 fant vi ingen endringer, en indikasjon på at soldatene fikk tilstrekkelig hvile til å hente seg inn. Noe av det samme var også tilfelle for CD4⁺-cellene. CD4⁺/CD8⁺ ratio ser ut til å falle i forbindelse med overbelastning (og f.eks. HIV-infeksjoner). Under kurset fant vi derimot en signifikant økning.

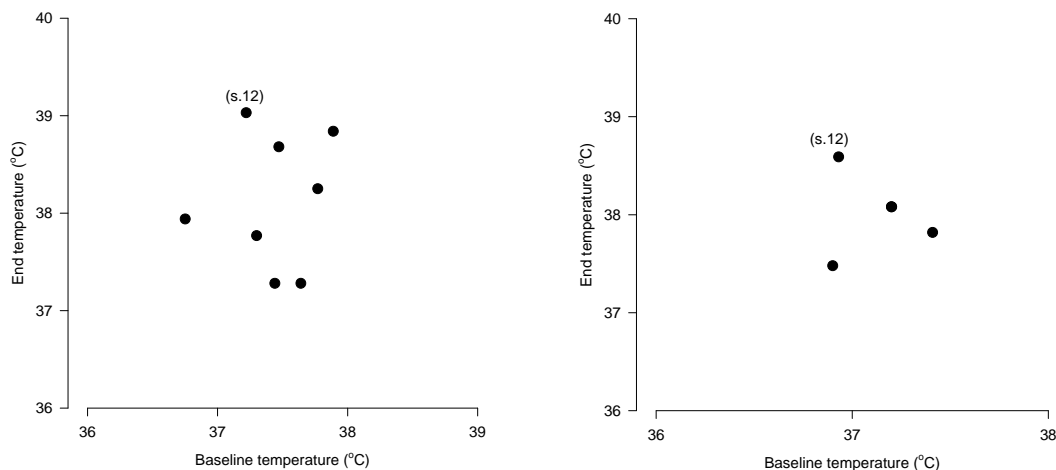
Tabell 6

Subpopulasjoner av lymfocytter (gjennomsnitt ± standardfeil)

	Dag 0	Dag 1	Dag 5/0	Dag 5/1
Lymfocytter	2,21 ± 0,29	1,69 ± 0,11*	2,31 ± 0,13#	2,02 ± 0,24
CD4 ⁺ T-celler	0,82 ± 0,10	0,70 ± 0,05	0,94 ± 0,06#	0,86 ± 0,08
CD8 ⁺ T-celler	0,67 ± 0,10	0,45 ± 0,05*	0,60 ± 0,07	0,49 ± 0,06*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	1,30 ± 0,12	1,62 ± 0,11*	1,67 ± 0,18*	1,82 ± 0,16*
CD3 ⁺ celler	1,62 ± 0,20	1,22 ± 0,09*	1,68 ± 0,10#	1,46 ± 0,15
CD19 ⁺ B-celler	0,25 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,03

* p < 0,05 sammenliknet med utgangsverdien; # p < 0,05 sammenliknet med foregående måling. (RM ANOVA + Student-Newman-Keuls test)

3.6 Temperaturer



Figur 2. Kjernetemperaturer før og etter feltløpene på dag 1 (venstre) og dag 5 (høyre). En deltaker utmerker seg med spesielt høy temperaturstigning (s.12).

Kjernetemperaturen ble målt ved hjelp av en sensor i tarmsystemet. (Måtte svelges av alle deltakerne). Verdiene ble kontinuerlig overført til en sentral. Som det går fram av figur 2, lå utgangstemperaturen stort sett i overkant av 37 °C. Umiddelbart etter løpet var imidlertid spredningen større, noe som delvis kan forklares med forskjeller i de fysiske forutsetningene. Enkelte deltakere fant løpet svært krevende, mens andre opplevde utfordringen som minimal. Det betyr også at soldatene opererte på svært ulike nivåer i forhold til sin VO_{2max} . På dag 5 fikk vi bare observasjoner fra 4 deltakere, men det var en klar tendens til lavere slutt-temperatur. En nærliggende årsak kan være motivasjonssvikt og lav intensitet under det siste feltløpet, men det kan også ha spilt en rolle at de minst motiverte også har lettest for å falle fra.

3.7 Inflammasjonsmarkører

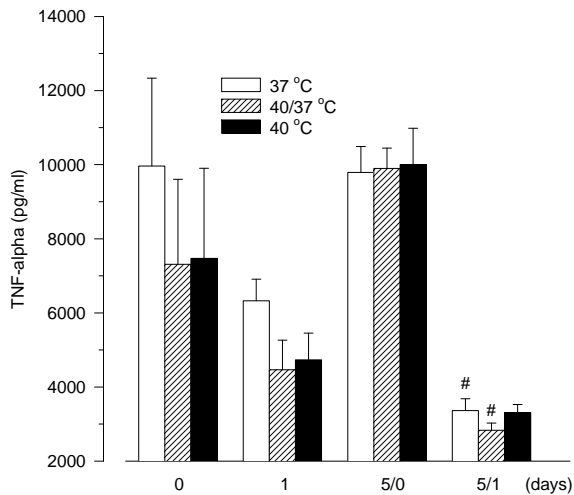
3.7.1 Cytokiner

Cytokiner er små molekyler som en rekke forskjellige celletyper produserer og frigjør for å kommunisere seg imellom. Cytokinene består hovedsakelig av vannløselige proteiner og glykoproteiner (proteiner som er festet til en sukkerkjede) med en masse mellom 8 og 30 kDa. De spiller en viktig rolle både i det medfødte og i det ervervede immunforsvaret. Når et cytokin binder seg til spesifikke overflatemolekyler på en gitt celle, aktiveres en kaskade av signaler fra overflaten og inn til cellekjernen. Cellens funksjon endres ved at gener og transkripsjonsfaktorer opp- eller nedreguleres. Cytokinene klassifiseres ofte som pro- eller anti-inflammatoriske

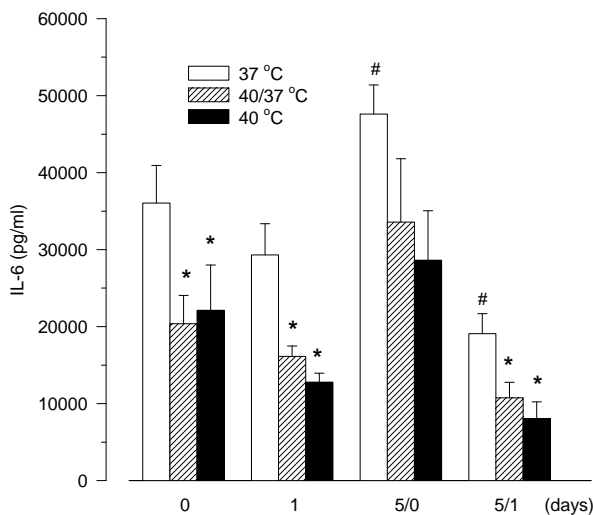
avhengig av om de stimulerer eller hemmer en inflammasjonsreaksjon. Kjemokiner er cytokiner som leder cellenes vandring mot et fokus (infeksjon, skade o.l.).

En rekke ytre påkjenninger kan utløse produksjon av cytokiner, bl.a. skader, kjemiske substanser og bakterieprodukter. Til den siste gruppen hører lipopolysakkarid (LPS). LPS er et relativt stort molekyl og varierer i struktur mellom ulike bakterietyper. Men enkelte deler er konstante og felles for alle bakterier. Cellene har egne reseptorer som binder seg til disse konstante strukturene i LPS-molekylet (Toll-reseptor 4, TLR 4). *In vitro* er stimulering med LPS mye brukt for å få et mål på cellenes funksjonsnivå. En viss tid etter påbegynt stimulering (i vårt tilfelle 6 timer) kan en tallfeste cellenes evne til å respondere på et ytre stimulus ved å måle konsentrasjonen av ett eller flere cytokiner ekstracellulært.

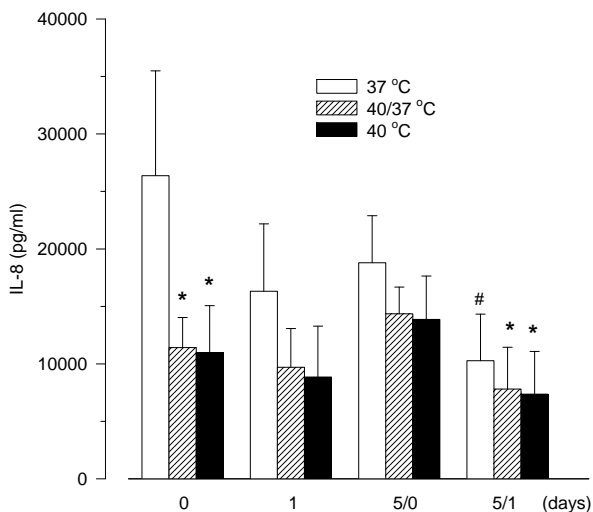
Figurene 3-5 sier litt om disse sammenhengene slik de framkom i løpet av øvelsen. Begge feltløpene svekket evnen til å respondere på LPS med økt produksjon av cytokiner. Dette gjaldt alle cytokiner. Det var ingen entydige signifikante forskjeller mellom kontrollverdiene på dag 0 og dag 5/0 (uendret for TNF- α , stigning for IL-6, fall for IL-8). For IL-6 og IL-8 virket økte temperaturer negativt ved alle måletidspunkter, for TNF- α så denne effekten ut til å forsvinne på dag 5.



Figur 3. Konsentrasjon av cytokinet TNF- α i supernatanten etter 6 timers *ex vivo* inkubasjon i fullblod tilsatt 5 ng/ml LPS. Anstrengelsene som følge av feltløpet senket leukocyttenes maksimale evne til å produsere TNF- α både på dag 1 og dag 5. Videre var det en tendens til at temperatureffektene på dag 0 ble borte på dag 5/0. # $p < 0,05$ vs. kontroll for hver temperatur (RM ANOVA + Dunnets test)



Figur 4. Konsentrasjon av cytokinet IL-6 i supernatanten etter 6 timers *ex vivo* inkubasjon i fullblod tilsatt 5 ng/ml LPS. Feltløpet senket leukocyttenes maksimale evne til å produsere IL-6 både på dag 1 og dag 5. Temperatureffektene er nokså like ved alle måletidspunkter. * $p < 0,05$ vs. 37 °C på hver enkelt dag. # $p < 0,05$ vs. kontroll for hver temperatur (RM ANOVA + Dunnets test)



Figur 5. Konsentrasjon av kjemokinet IL-8 i supernatanten etter 6 timers *ex vivo* inkubasjon i fullblod tilsatt 5 ng/ml LPS. Feltløpet senket leukocyttenes maksimale evne til å produsere IL-8 både på dag 1 og dag 5. Temperatureffektene tenderer til å bli noe redusert mot slutten av øvelsen. * $p < 0,05$ vs. 37 °C på hver enkelt dag. # $p < 0,05$ vs. kontroll for hver temperatur (RM ANOVA + Dunnets test)

3.8 Cortisol

Fysisk stress utfordrer likevekten i organismen, og for å bevare den blir både HPA-aksen (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis) og det autonome nervesystemet aktivert. I blodet avspeiles denne aktiveringen blant annet av henholdsvis økte cortisolverdier og økt adrenalin/noradrenalin. Som det går fram av tabell 7, førte ingen av feltløpene til den forventede stigning i cortisolspeilet. Tvert om falt verdiene begge ganger, noe som delvis kan skyldes at anstrengelsene ikke hadde den nødvendige lengde og intensitet. Dessuten gikk løpene på formiddagen, og cortisolverdiene vil da normalt være fallende (høyest om morgenen). Plasmafortynning kan muligens også spille en rolle.

Tabell 7

Cortisol (gjennomsnitt ± standardfeil)	Dag 0	Dag 1	Dag 5/0	Dag 5/1
Cortisol (mmol/l)	559 ± 71	452 ± 85	625 ± 21*	323 ± 35*

* p < 0,05 sammenliknet med utgangsverdien (parvis t-test)

3.9 Forandringer i aminosyresammensetningen

Glutamin er en ikke-essensiell aminosyre som forekommer i høye konsentrasjoner i humant plasma og muskelvev. Balansen som normalt finnes mellom frisetting og opptak, blir forrykket ved større skader og alvorlige sykdommer. Forbruket øker ved langvarig og kraftig muskelarbeid, og dette er noe av bakgrunnen for at glutamin blir markedsført som kosttilskudd innenfor en rekke idrettsgrener. Glutamin er også viktig for å opprettholde immunfunksjonen og for å hindre at proteiner blir brutt ned ved katabole tilstander. Langvarig intenst muskelarbeid fører til at glutaminkonsentrasjonen i plasma synker. Ved overtrening og overbelastning har en samtidig funnet økte glutamat-konsentrasjoner, og forandringer i forholdet mellom glutamin og glutamat (gln/glu-ratio) er derfor en mulig tidligmarkør for disse tilstandene (5, 10). Verdier < 3,58 er foreslått som tegn på overbelastning (5). Som det går fram av tabell 8, lå våre verdier godt over denne grensen, og det var heller ingen endring i forholdstallet fra dag 0 til dag 5/1.

Tabell 8

Aminosyrer (gjennomsnitt ± standardfeil)	Dag 0	Dag 5/1
Glutamat (mmol/l)	83,0 ± 4,9	82,0 ± 1,4
Glutamin (mmol/l)	311,8 ± 10,5	305,7 ± 6,7
Glutamin/glutamat ratio	3,71 ± 0,30	3,74 ± 0,12
Glysin (mmol/l)	236,6 ± 12,1	190,4 ± 2,7*
Taurin (mmol/l)	50,2 ± 3,8	63,3 ± 2,3*
Alanin (mmol/l)	244,6 ± 15,2	211,9 ± 10,4*

* p < 0,05 sammenliknet med utgangsverdien (parvis t-test)

Målingene viste signifikante fall i plasmakonsentrasjonen av både glysin og alanin. Det meste kan forklares ut fra beregnet økning i plasmavolum. Derimot økte konsentrasjonen av taurin-nivåene signifikant tross i denne fortyningen. Konsentrasjonen av taurin i skjelettmuskulaturen er omkring 500 ganger høyere enn i plasma, og det er vist at muskelkontraksjoner fører til lekkasje av taurin fra cellene, og dermed økte verdier i plasma (11). Frisettingen av taurin øker ved samtidig iskemi, ødem og produksjon av frie oksygenradikaler (11).

4 Diskusjon

Resultatene ovenfor viser noen av endringene som skjer ved fysisk aktivitet, både akutt og etter flere gjentakelser. Målet var å finne fram til enkle markører for overbelastning. Samlet sett var det lite som tydet på at det oppsatte programmet for denne øvelsen gikk utover soldatenes kapasitet. De utslagene vi så i immunologiske parametre (endringer i total leukocyttkonsentrasjon og i subpopulasjoner), proinflammatoriske cytokiner (TNF- α , IL-1 β og IL-6), intracellulære enzymer (CK, ASAT, ALAT), glutamin/glutamat-ratio og temperatur, var innenfor det en må forvente som en normal reaksjon på slike påkjenninger. Enkelte av markørene forandret seg overhodet ikke (eks. gln/glu-ratio), mens andre ga tydelige beskjed om at deltakerne hadde vært gjennom et fysisk krevende program (eks. CK, ASAT, ALAT, taurin). Kontrollprøvene på dag 5 var ikke vesensforskjellige fra dag 0, og det var heller ingen påfallende endring i leukocyttens reaksjonsevne etter de to feltløpene, noe som tyder på at soldatene fikk anledning til å ta seg inn seg mellom øktene

Verdiene skjuler til dels betydelige individuelle variasjoner. En av deltakerne skilte seg ut med spesielt kraftige utslag (eks. $tp > 39$ °C etter feltløpet, leukocyttstigning fra 7,8 til 12,0 (snitt fra $6,3 \pm 0,4$ til $8,1 \pm 8,1$), CK-stigning fra 229 til 1163 (snitt fra 252 ± 68 til 731 ± 178), ASAT fra 27 til 110 (snitt fra $24,6 \pm 2,8$ til $71,0 \pm 14,7$) og ALAT fra 38 til 74 (snitt fra $30,8 \pm 3,0$ til $47,4 \pm 6,9$)). I seg selv er ikke dette direkte alarmerende, men ved et hardere program kunne kanskje verdiene gitt grunnlag for nøyere oppfølging. På andre markører var for øvrig utslagene små. Således var både gln/glu-ratio og $CD4^+/CD8^+$ -ratio begge uendret. Leukocyttverdiene var tilbake på basalnivå før det siste feltløpet, en indikasjon på tilstrekkelig restitusjon.

Immunforsvaret reagerer nokså stereotypt på intense og langvarige fysiske anstrengelser. Vanligvis oppstår en generell inflammasjon med samtidig reduksjon i det cellulære immunforsvaret, mest uttalt 1-4 timer etter avsluttet aktivitet. De bakenforliggende mekanismene er ikke fullstendig klarlagt, men flere faktorer spiller sannsynligvis en rolle, eksempelvis nevroendokrinologiske (adrenalin, noradrenalin, cortisol) og metabolske forandringer. Småskader (mikrotraumer) i muskulaturen har også vært framhevet (12). I vårt materiale fant vi klare tegn på dette (lekkasje av intracellulære muskelenzymer, økt IL-6). Muskelskader kan også forklare en del av økningen i nøytrofile granulocytter (13).

De kliniske følgene er svært varierte og spenner fra lett ømhet i muskulaturen til uttalt funksjonsnedsettelse og generelle infeksjoner.

Studien har flere iøynefallende svakheter. Det var vanskelig å kontrollere at de fysiske utfordringene ble skikkelig standardisert. Dessuten varierte intensiteten sannsynligvis betydelig i forhold til den enkeltes $VO_{2\max}$. I og med at bare 5 deltakere fullførte, ble også materialet for spinkelt til å trekke sikre konklusjoner.

Referanser

1. Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1385-1394.
2. Sharp JCM. Virus and the athlete. *Br J Sports Med* 1989; 23: 47-48.
3. Nieman DC. Is infection risk linked to exercise workload? *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: S406-S411.
4. Smith LL. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 317-331.
5. Smith DJ, Norris SR. Changes in glutamine and glutamate for tracking training tolerance. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 684-689.
6. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 1974; 37: 247-248.
7. Lundvall J Bjerkhoel P. Pronounced and rapid plasma volume reduction upon quiet standing as revealed by a novel approach to the determination of the intravascular volume change. *Acta Physiol Scand* 1995; 154: 131-142.
8. Gundersen Y, Opstad PK, Reistad T, Thrane I, Vaagenes P. Seven days' around the clock exhaustive physical exertion combined with energy depletion and sleep deprivation primes circulating leukocytes. *Eur J Appl Physiol* 2006;97:151-157.
9. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80: 1055-1081.
10. Halson SL, Lancaster GI, Jeukendrup AE, Gleeson M. Immunological responses to overreaching in cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 854-861.
11. Ørtenblad N, Young JF, Oksbjerg N, Nielsen JH, Lambert IH. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells. *A, J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C1362-C1373.
12. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 is related to muscle damage. *J Physiol* 1997; 499: 833-841.
13. Pizza FX, Mitchell JB, Davis BH, Starling RD, Holtz RW, Bigelow N. Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27: 363-370.