

## Diagnostischer Ansatz zur Erkennung des Übertrainings-Syndroms durch Immunphänotypisierung der Lymphozyten<sup>1</sup>

H. Gabriel<sup>a</sup>, A. Urhausen<sup>a</sup>, G. Valet<sup>b</sup>, B. Weiler<sup>a</sup>, U. Heidelberg<sup>a</sup>, W. Kindermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut für Sport- und Leistungsmedizin an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

<sup>b</sup>Arbeitsgruppe Zellbiochemie am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

### Diagnostic Approach towards Recognizing Overtraining by Lymphocyte Immunophenotyping in Endurance-Trained Athletes

During overtraining periods of 17 endurance trained athletes (age: 16-35 years;  $VO_{2max}$ :  $61.2 \pm 7.5$  ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>) immunological data were acquired within a prospective longitudinal investigation of  $19 \pm 3$  months. Each individual had five or more time points of investigation, of which at least one was a typical overtraining (OT; n=15) or overload (OL; n=8) condition. Venous blood samples were taken at physical rest for leukocyte immunophenotyping (CD14, CD45, CD45RO, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56, antiHLA-DR) by flow cytometry. Activated T-cells (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) and cytotox., not-MHC-restr. T-cells (CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>+</sup>) were slightly but significantly increased at OL/OT, while eosinophils decreased significantly. All other leukocyte and lymphocyte subpopulations were not significantly altered during OL/OT. However, highly significant increases of CD45RO antigen density on the lymphocyte's cell surfaces were detected during OL/OT. A self learning classification of the list mode files (CLASSIF1-program system) classified OL/OT from N with 91% specificity and 65% sensitivity.

In conclusion it was shown that the blood cell concentrations of common lymphocyte subpopulations did not change during OL/OT. An increase of the T-cell activity resulted in a slight increase of HLA-DR<sup>+</sup> T-cells and a clear upregulation of the CD45RO<sup>+</sup> receptor density on T-cells.

**Key words:** cyclists, overtraining-syndrome, immuno-phenotyping, leukocyte common antigen, CD45RO

### Einleitung

Das körperliche Training wird in seiner Effektivität in erster Linie von Intensität und Umfang sowie dem Zeitpunkt der aufeinanderfolgenden Belastungen bestimmt. Ein Mißverhältnis zwischen aktueller Belastung und Belastbarkeit kann zu einem Übertrainings-Syndrom führen (ÜT). Während eines ÜT wird über eine erhöhte Infektanfälligkeit berichtet (1). Veränderungen immunologischer Parameter wie z.B. der sog. Aktivitätsmarker CD25 (Interleukin-2 Rezeptor) und HLA-DR auf Lymphozytenoberflächen (2, 3) sowie mitogene Stimulationstests der Lymphozyten *in vitro* (3, 7) weisen auf eine eventuell erhöhte Aktivität insbesondere der T-Lymphozyten hin. Neuerdings wird die wichtige Substratfunktion des Glutamins für die Lymphozyten diskutiert, die Plasmakonzentration soll im ÜT erniedrigt sein (5). Weiterhin wurde im Zustand der Überbelastung (ÜB) eine *in vitro* verringerte Synthese von IgG und IgM durch B-Zellen gefunden (7).

In einer prospektiven Längsschnittstudie über einen Beobachtungszeitraum von 1,5 Jahren wurde die Wertigkeit der in der Literatur vorgeschlagenen immunologischen Kriterien zur Diagnostik eines ÜT überprüft. Hier werden die Ergebnisse der Immunphänotypisierung der Lymphozyten vorgestellt.

<sup>1</sup> Dieses Projekt wurde mit Forschungsmitteln des Bundesinstituts für Sportwissenschaft unter den Geschäftszeichen: VF 0407/01/09/89, 01/11/90, 01/10/91, 01/08/92 und 01/18/93 gefördert.

## Methodik

17 männliche Ausdauersportler (Radrennfahrer und Triathleten;  $VO_{2max}$ :  $61,2 \pm 7,5$  ml·kg<sup>-1</sup>·Alter: 16-35 Jahre, Körperhöhe:  $178 \pm 7$  cm, Körpermasse:  $69 \pm 7$  kg) wurden über einen Beobachtungszeitraum von  $19 \pm 3$  Monaten jeweils 5 (in einem Fall 6) mal untersucht. Die Untersuchungen umfaßten zu jedem Termin die Anamnese, den körperlichen Befund, Laborparameter, Ruhe- und Belastungs-EKG sowie an einem zweiten Untersuchungstag eine intensive Ausdauerbelastung mit 110% der individuellen anaeroben Schwelle (Streßtest; 4). Die Diagnose eines ÜT bzw. eines ÜB wurde anhand der typischen klinischen Anamnese und Symptomatik sowie der Dauer der Symptome gestellt. Aus dem Vollblut einer standardisierten Ruheblutentnahme im nüchternen Zustand und zur individuell jeweils gleichen morgendlichen Tageszeit wurden die Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen mit direkter Immunfluoreszenztechnik (verwandte monoklonale Antikörper: CD14, CD45, CD45RO, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56, antiHLA-DR) und Durchflußzytometrie gemessen (4). Am Vortag vor der Blutentnahme war lediglich regeneratives Training erlaubt.

Alle Parameter sind als Mittelwerte und Standardabweichung aufgeführt. Als statistisches Testverfahren wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben verwandt. Darüber hinaus wurden die durchflußzytometrischen Listendaten mit dem selbstlernenden Klassifizierungsprogrammssystem Classif 1 (Partec, Münster; 6) ausgewertet.

## Ergebnisse

Von den 17 Sportlern konnten 16 mindestens einmal im ÜT bzw. ÜB untersucht werden, 15 mal wurde ein ÜT, 8 mal ein ÜB beobachtet. Die Dauer der Beschwerden betrug im Mittel 24 Tage. Von allen Symptomen war das Gefühl der „schweren Beine“ bei schon ungewöhnlich geringer Trainingsintensität eindeutig dominierend. Objektiver Parameter für die reduzierte Leistungsfähigkeit war die signifikant geringere Dauer im sogenannten Streßtest (Normalzustand [NZ],  $23 \pm 9$  min; ÜT/ÜB:  $18 \pm 8$  min;  $p < 0,01$ ). Die absoluten Zellzahlen der Eosinophilen lagen im ÜT/ÜB ( $236 \pm 177$  Zellen· $\mu$ l<sup>-1</sup>) signifikant niedriger als im NZ ( $295 \pm 217$  Zellen· $\mu$ l<sup>-1</sup>;

$p < 0,01$ ). Bei den Lymphozytensubpopulationen lagen die Anteile der HLA-DR<sup>+</sup> bzw. der CD16/CD56<sup>+</sup> Zellen an den CD3<sup>+</sup> T-Zellen im ÜT/ÜB signifikant höher als im NZ (Abbildung 1).

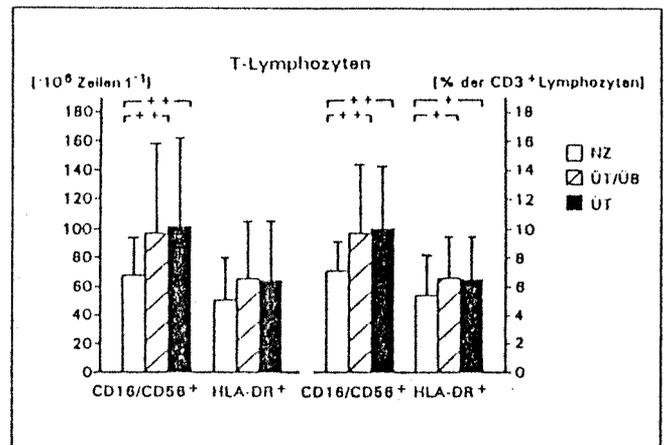


Abbildung 1. Absolute Zellzahlen (li) und prozentualer Anteil (re) der aktivierten (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) und zytotoxischen, nicht MHC-restringierten T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>+</sup>) in Ruhe (\*:  $p < 0,005$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Sämtliche übrigen Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen zeigten hinsichtlich ihrer prozentualen oder absoluten Zellzahlen keine signifikante Differenz zwischen NZ und ÜT/ÜB. Bei der Betrachtung der relativen Rezeptordichten auf den Zelloberflächen der Lymphozyten ergab sich im ÜT/ÜB gegenüber dem NZ ein signifikanter Anstieg für den CD45RO<sup>+</sup> Rezeptor (Abbildung 2). Die selbstlernende Klassifizierung der durchflußzytometrischen Listendaten ließ in der retrospektiven Betrachtung eine Einordnung des NZ zu 91% und des ÜT/ÜB zu 65% zu.

## Diskussion

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen auf, daß die Betrachtung der reinen Zellzahlen der Lymphozytensubpopulationen bei der Diagnostik des ÜT keine Hilfe bieten, da sie sich im Vergleich zum Normalzustand weder im körperlichen Ruhezustand, noch während einer erschöpfenden, intensiven Ausdauerbelastung (Ergebnisse nicht dargestellt) signifikant unterscheiden. Die geringen Anstiege der HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen sprechen für eine geringgradige Aktivierung der T-Zellen im Übertrainingszustand. Ein eindeutiger Hinweis auf den erhöhten Funktionszustand der Zellen

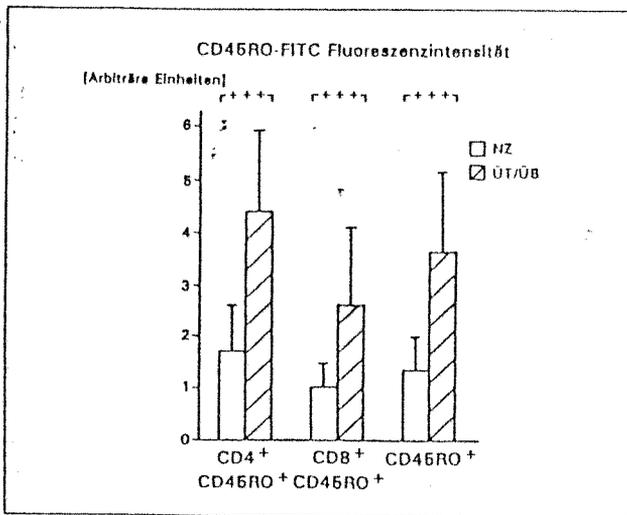


Abbildung 2. Fluoreszenzintensität für den FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper der gesamten CD45RO<sup>+</sup>, den CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Lymphozyten als Ausdruck der relativen Rezeptordichte; NZ: n=55; ÜT/ÜB: n=23; +++: p<0,001).

zeigt die Hochregulation des CD45RO<sup>+</sup> Rezeptors auf. Dieser Rezeptor stellt einen Isotyp des allgemeinen Leukozytenantigens dar, das eine wesentliche Regulationsfunktion für die Lymphozyten besitzt.

Die Anwendung eines neuartigen Klassifizierungsprogramms für durchflußzytometrische Listendaten zeigte aufgrund der unterschiedlichen Rezeptordichten des CD45RO<sup>+</sup> Rezeptors die mögliche Diagnostizierbarkeit des Übertrainings auf. Es handelt sich hierbei um einen quasi unerwarteten Zufallsbefund, der jedoch für die Auswahl und kombinierte Auswertung zukünftiger durchflußzytometrischer und nicht-durchflußzytometrischer Daten wegweisend sein könnte.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Betrachtung der reinen Zellzahlen der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen keine Diagnose des Übertrainings zuläßt, jedoch die Ausweitung der Auswertungen auf die Ausprägung der Oberflächenrezeptoren für die Zukunft erfolgver-

sprechend ist. Im Übertraining ist eine geringe Aktivierung der T-Zellen sowie eine Reduktion der Eosinophilenzahlen zu erkennen, was bruchstückhaft auf die Reaktionsweise des Immunsystems im Verlauf eines Übertrainings-Syndrom schließen läßt.

## Literatur

- 1 Fitzgerald L: Overtraining increases the susceptibility to infections. *Int J Sports Med* 12 (1991), 5-8.
- 2 Fry R W, Morton A R, Keast D: Overtraining in athletes. *Sports Med* 12 (1991), 32-65.
- 3 Fry R W, Morton A R, Garcia-Webb P, Crawford G P M, Keast D: Biological responses to overload training in endurance sports. *Eur J Appl Physiol* 64 (1992), 335-344.
- 4 Gabriel H, Urhausen A, Kindermann W: Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion. *Eur J Appl Physiol* 63 (1991), 449-457.
- 5 Parry-Billings M, Budgett R, Koutedakis Y, Blomstrand E, Brooks S, Williams C, Calder P C, Pilling S, Baigrie R, Newsholme E A: Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: Possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 24 (1992), 1353-1358.
- 6 Valet G, Valet M, Tschöpe D, Gabriel H, Rothe G, Kellermann W, Kahle H: White cell and thrombocyte disorders - Standardized, self learning flow cytometric list mode data classification with the Classif 1 program system. *Ann NY Acad Sci* 677 (1993), 233-251.
- 7 Verde T, Thomas S, Shephard R J: Potential markers of heavy training in highly trained distance runners. *Br J Sports Med* 26 (1992), 167-175.

Für die Verfasser:

Dr. med. H. Gabriel

Institut für Sport- und Leistungsmedizin

Universität des Saarlandes

Im Stadtwald

66041 Saarbrücken