

Fagfelleurdert artikkel

Militærpsykologisk forskning i felt: En case-studie av biologiske markører under solokryssing av Antarktisk

Bjørn Helge Johnsen¹, Rune Gjeldnes², Hans Olav Monsen Neteland³,
Julian F. Thayer⁴ og Terry M. Phillips⁵



Rune Gjeldnes er marinejeger, eventyrer og polfarer. I 2005 – 2006 gjennomførte han verdens lengste skimarsj på 4.800 km på 90 dager over Antarktis uten etterforsyning. Bilde: Rune Gjeldnes.

Adresser all korrespondanse til: Bjørn Helge Johnsen Institutt for Samfunnspsykologi, Universitetet i Bergen, Christies gt. 12, 5015 Bergen, e-post: bjorn.johnsen@uib.no

¹Institutt for Samfunnspsykologi, Universitetet i Bergen. ²Rune Gjeldnes. Rune Gjeldnes AS, Polfarer.

³Saniteten i Sjøforsvaret og Apotek1. ⁴University of California, Irvine. ⁵Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia.

Sammendrag: Tradisjonelt har registrering av blodparametere i militærpsykologisk og medisinsk forskning krevd betydelige logistiske, økonomiske og faglige ressurser. Dette har vanskeliggjort bruken av slike parametere. Imidlertid er det utviklet alternative metoder og denne case-studien undersøker anvendeligheten av «Dried Blood Spots» (DBS) under polare forhold. Det første målet med studien er en utprøving av anvendbarheten av DBS (registrering, lagring og ekstrahering av variabler), analysert ved hjelp av «recycling immunoaffinity chromatography», under ekstreme polare feltmessige forhold. Det andre målet med studien var å undersøke om stress og immunparametere målt ved DBS gjenspeiler subjektive evalueringer av belastning under skimarsjen. Det tredje målet var å beskrive hormonelle og immun-responser under ekstreme polare belastninger. Metoden som ble benyttet var DBS registrert under en 90 dagers solo-ekspedisjon uten etterforsyninger, gjennomført over syd-popolområdet. Ekspedisjonen var verdens lengste skitur. Resultatene viste at alle 16 planlagte parametere ble ekstrahert med suksess ni måneder etter ekspedisjonen. For å undersøke samvariasjonen mellom subjektive opplevelser og biologiske markører på belastning ble kortisolnivå og pro- og anti-inflammatoriske markører (IL-6 og IL-10) sammenlignet med polfarerens dagbok. Basert på dagboken ble seks faser med ulik belastning identifisert. Resultatene viste at kortisol og IL-6 responser samvarierte med disse fasene. Resultatene viste også ekstreme kortisol og IL-6 responser under mestring av ekspedisjonen. DBS viste seg dermed som en relevant metode for bruk i felt, under polare betingelser.

Introduksjon

Psykofysiologiske studier er vanskelig å gjennomføre under feltmessige forhold (Nindl, 2004). En av de vanskeligste fysiologiske responser å registrere har vært blodparametere (McDade, Williams & Snodgrass, 2007). Innsamling og analysering har krevd et stort logistisk apparat. Tradisjonelle blodprøver krever medisinsk personell som leger og/eller sykepleiere og prøvene må fryses ned i tiden mellom registrering og analyse. Behovet for frysekapasitet ved innsamling og oppbevaring gjør tradisjonell registrering av blod-parametere svært komplisert å gjennomføre under feltmessig forhold. Under slike forhold vil ikke bare selve administrering av prøvetakingen skape ulike dilemma, det vil sannsynligvis også være militære krav mot forsøkspersonene som vil stå i konflikt med behovet fra forskerne. Tradisjonell blodprøvetaking vil kreve betydelig tid slik at forsøkspersonene må avslutte aktiviteter de er pålagt å gjennomføre. Dette kan skape betydelig motstand mot prøvetaking i felt. Logistiske utfordringer med hensyn til innsamling av blod data, overføring gjennom kulde-kjeden til lagring og analyser av prøvene samt forhold som plass og temperaturkontroll ved nedfrost lagring, resulterer i at slike studier ofte har store økonomiske konsekvenser (McDade, et al., 2007). Til tross for at prøver nedfrost til -80 grader celsius er ansett å være tilstrekkelig for bevaring av blodprøver kan små molekyler degenereres ved denne temperaturen (Bradburne Graham, Brenner, Pamuku & Carruth, 2015). Under polare forhold vil de logistiske utfordringer være utpreget da blodprøvetaking fra vener, begrensning i lagring og etterforsyninger kan vanskeliggjøre slike studier, noe som ofte resulterer i få datapunkter i polare studier. For eksempel studerte Žáková & Zezulová (2019), i et

longitudinelt design, endringer av blodparametere på 15 deltager i en tsjekkisk ekspedisjon til Antarktisk. De benyttet tre måletidspunkt der kun et av tidspunktene var under oppholdet i polområdet. Kern, Polley, Hamrock, Bussler, James, Varadharaj og Troup (2019) gjennomførte en case studie av solokryssing av Antarktisk. De rapporterte blant annet relevante biomarkører for prestasjoner, men studien var gjennomført ved bruk av et pre-post-design. Kern et al., (2019) konkluderte med at cortisolnivåene var moderat hevet og testosteron nivået var i lavere delen av normalområdet målt etter ekspedisjonen var avsluttet.

Imidlertid er det utviklet metoder for enkel registrering av blodprøver og disse kan oppbevares uten behov for frysekapasitet (Parker & Cubbit, 1999). Denne metoden, kalt «Dried Blood Spots» (DBS), innebærer at forsøkspersoner selv kan gjennomføre blodprøvetaking. Dette gjøres ved at forsøkspersonen penetrerer huden på finger eller hel og tapper en dråpe blod. Blod-dråpen blir så overført til et trekkpapir hvor den tørker (Bradburne et al., 2015). Trekkpapiret med blodprøven blir forseglet i en plastpose påført relevante opplysninger og overleveres til forsøksleder ved anledning. Kjeden fra datasampling til lagring krever ingen frysekapasitet og kan derfor gjennomføres på den mest hensiktsmessige måte, og data kan lagres ved varierende temperatur. Datasamplingen innebærer at blodprøven er trukket fra kapillærer og ikke vener. Punktering av kapillærer gir betydelig mindre blødninger sammenlignet med venepunktering. En annen fordel ved denne metoden er at den er svært enkel og krever minimal opplæring. Problem med sikker avfallshåndtering i felt, av brukte nåler og sprøyter, er fjernet ved denne metoden og infeksjonsfaren er betydelig redusert. Det er imidlertid en viss smittefare for enkelte virus som f.eks. Hepatitt B, som er aktive opp til syv dager på overflater (Farzadegan, Quinn & Polk, 1987).

I militær setting har denne metoden blitt benyttet ved blodprøvetaking i ulike avdelinger med godt resultat. For eksempel Taberner, Bruguera, Rodriguez, Mayor og Batallia (2002) screenet en militær avdeling for hepatitt B og Rubio, Post, Doctors van Leeuwen, Henry, Lindergard og Hommel (2002) sammenlignet tradisjonelle blodprøver med DBS ved screening for malaria etter en internasjonal operasjon i Afrika. Post et al. (2002) konkluderte med at analysemetoden benyttet ved DBS var mer sensitiv og spesifikk sammenlignet med mikroskop-undersøkelse av nedfrost blod. Videre sammenlignet Nindle (2009) DBS av «Insulin-like growth factor-I» (IGF-I) i en gruppe US Marines. Data ble samlet inn i laboratoriet og sammenlignet med data på en åtte dagers øvelse. IGF-I er relatert til metabolske prosesser samt somatisk helse og resultatene viste en klar korrelasjon mellom IGF-I målt i serum og målt som DBS ($r = .92$). DBS har dermed vist seg som en metode med predikativ og samtidig validitet.

DBS har også tidligere blitt benyttet innen norsk militærpsykologisk forskning. Under en vinter-øvelse, studerte Sandvik, Bartone, Hystad, Thayer og Johnsen (2013) sammenhengen mellom personlighet og biomarkører, målt med DBS fra Sjøkrigsskole kadetter. Hardføre (målt som «Personality Hardiness») kadetter viste en undertrykking av pro-inflammatoriske cytokiner (IL-12) og en øket mengde anti-inflammatoriske cytokiner (IL-4 og IL-10), samt lavere nivåer av neuropeptid-Y, sammenlignet med mindre hardføre kadetter. Hardføre kadetter viste dermed en mer moderat og sunn immun og neuroendokrin respons i møte med belastende vinter-øvelser.

Felles for studiene nevnt over er at de er gjort på relativt store grupper og de fleste sammenligner DBS med etablerte metoder for samme variabel eller studien var ment å predikere psykofysiologiske responser. Disse studiene har derimot ikke studert samvariasjonen mellom individers subjektive opplevelser og fysiologiske prosesser det er rimelig å anta er relatert til slike opplevelser. Dersom man ser en forventet samvariasjon mellom slike opplevelser og fysiologiske responser kan en anta at DBS viser konvergent validitet. En feilkilde ved å studere militære avdelinger i felt og relasjonen til neuroendokrine og immunresponser, er at militære avdelinger i felt er sårbare for ytre påvirkning i form av skader, miljømessige variabler man ikke har kontroll over (avgasser/ukontrollerbare stressorer som variasjon i søvn og type oppdrag etc.) og infeksjoner. Slike ukontrollerbare variabler, skaper støy i data og vanskeliggjør konklusjoner.

Det norske forsvar skal være spesielt dyktig på Arktisk krigføring. For å øke kunnskap om forhold som påvirker soldater i felt under slike forhold er det behov for metoder som er økonomiske, enkelt gjennomføres feltmessig, transporteres, lagres og analyseres, uten at prøvene forvitres. Miljømessige forhold ved studier under Arktiske forhold kan innebære langvarige (kontinuerlige) operasjoner, ekstrem variasjon fra sterk kulde til varme (ekstrem kulde under skimarsj og sterk varme i telt), oppbevaring av prøver under primitive forhold (inn og ut av sekk/ annen mekanisk påvirkning).

En måte å studere nytten av DBS som metode, der en øker generaliserbarheten ved å kontrollere for utfordringene nevnt over, er ved langvarige soloekspedisjoner i polare områder. Soloekspedisjoner har en klar fordel ved at sannsynligheten for smitte fra andre personer er sterkt redusert og etter start av ekspedisjonen er den eliminert. I 2005-2006 gjennomførte en av forfatterne verdens lengste skimarsj over Antarktisk (Gjeldnes, 2006a) hvor Sjøforsvaret var hovedsponsor for ekspedisjonen. En slik skimarsj innebærer ekstreme belastninger, både psykologisk og fysisk. Psykologiske stressorer som frykt og isolasjon (Bartone, Roland, Bartone, Krueger, Sciarretta & Johnsen, 2019), samt fysiske belastninger som slitasje og nedbryting av fett og muskler, vil være sentrale elementer under slike ekspedisjoner. Det mest benyttede endokrine målet på stresserhormonet kortisol. For eksempel viste Johnsen, Hansen, Murrison, Eid og Thayer (2012) en relasjon mellom kardiovaskulære responser og kortisol ved indusering av fryktbasert stress i Sjøkrigsskole kadetter. Både pro-inflammatoriske og anti-inflammatoriske responser kan indikere et individs stressnivå ved at glukokortikoider (kortisol) og katekolaminer (f. eks. adrenalin og noradrenalin) undertrykker pro-inflammatoriske og stimulerer anti-inflammatoriske prosesser (Elenkov & Chrousos, 2002; Padgett & Glaser, 2003; Padgett, Marucha, & Sheridan, 1998). I tillegg vil vedvarende belastning resulterer i nedbryting av vev og inflammatoriske prosesser vil opptre. Pro-inflammatoriske responser som Interleukin-6 (IL-6) er knyttet til akutte reaksjoner på ekstrem belastning (Elosua, Bartali, Ordoas, Corsi, Lauretani & Ferrucci, 2005). Samtidig er det rapportert at ved langvarig fysisk belastning vil en se en økning av anti-inflammatoriske responser, noe som kan tolkes som en homeostatisk regulering av immunresponser (Kasapis & Thompson, 2005). Tidligere feltstudier har benyttet IL-10 som anti-inflammatorisk cytokin (Sandvik et al., 2013). Det er derfor rimelig å anta at ved egenrapportering av øket belastning under solo-ekspedisjoner vil en se øket kortisolnivå, øket pro- (IL-6) og anti-inflammatoriske responser (IL-10).

Både hormoner, pro- og anti-inflammatoriske cytokiner er derfor interessante parametere for feltstudier i militær kontekst. Neuropeptider er en tredje gruppe variabler av interesse. For eksempel er neuropeptid-Y knyttet til funksjonelle responser til stress (Sandvik et al., 2013; Morgan, Rasmusson, Wang, Hoyt, Hauger & Hazlett, 2002; Yehuda, Brand, & Yang, 2006) og Substans P er foreslått som sentralt element i smertepersepsjon (De Felipe, Herrero, O'Brien, Palmer, Doyle, Smith, Laird, Belmonte, Cervero, & Hunt, 1998).

Formålet med denne case-studien er tredelt. For det første ønsker vi å se om DBS er en metode som kan benyttes i militær forskning under ekstremt krevende vinterforhold. Ved å benytte DBS under en soloekspedisjon i polområder er det mulig å undersøke egnetheten for selvadministrering av prøver, om DBS lar seg analysere etter lagring i flere måneder under ekstreme feltmessige forhold med uhygienisk og svært varierende temperaturforhold samt vedvarende mekanisk påvirkning. Dersom DBS er en anvendbar metode innen feltstudier i polare settinger, må det være mulig å analysere en rekke relevante biomarkører. Det ble derfor planlagt å trekke ut tre typer responser; relevante hormoner; relevante cytokiner og relevante neuropeptider.

Det andre målet med studien var å studere konvergent validitet av DBS. Mer spesifikt, om DBS som metode fanger opp forholdet mellom subjektiv opplevelse av belastning og blodparametere på belastning. Dersom dette er tilfelle, vil en se korresponderende variasjon i stresshormonet kortisol og pro- og anti-inflammatoriske (IL-6 og IL-10) responser sammenlignet med selvrapportert belastning i situasjonen.

Det tredje målet var en beskrivelse av polfarerens fysiologiske responser under solo-ekspedisjonen. Verdens lengste skitur, gjennomført alene over Antarktisk, er en ekstrem utfordring og studien ønsker å kartlegge nivåer på stresshormonet kortisol, pro- og anti-inflammatoriske (IL-6 og IL-10) responser for å beskrive hvordan organismen tilpasser seg slike ekstreme krav i miljøet.

Metode

Forsøksperson

Studien er en case-studie der en svært erfaren polfarer ble studert. Forsøkspersonen har deltatt i en rekke ekspedisjoner både i Arktisk og Antarktisk og har blant annet tidligere krysset polhavet, Grønland på langs og gjennomført flere ekspedisjoner til Sydpolen.

Prosedyre og utstyr

Studien ble gjennomført som ledd i en solo-ekspedisjon over Antarktisk. Marsjen innebar en kryssing av polområdet på langs, og varte i 90 døgn der 4804 kilometer ble tilbakelagt (se Gjeldnes, 2006a for en beskrivelse av ekspedisjonen). Dette var den lengste skimarsj som er gjennomført uten etterforsyning.

Registrering av DBS ble gjennomført ved penetrering av en finger ved bruk av Accucheck fastclix lansett. Lansettspennen kan justeres for dybde i penetrering, noe som er viktig da kulde påvirker gjennomstrømming av blod i kapillærer. Polfareren ble instruert at blodet ikke skulle presses ut av fingeren da dette kan være en feilkilde ved prøvetaking i ekstrem kulde. Bloddråpen ble overført til et trekkpapir av typen

Whatman filterpaper grade 1, og lufttørket i 10 minutter før det ble plassert i en plastpose og merket med dato og tid.



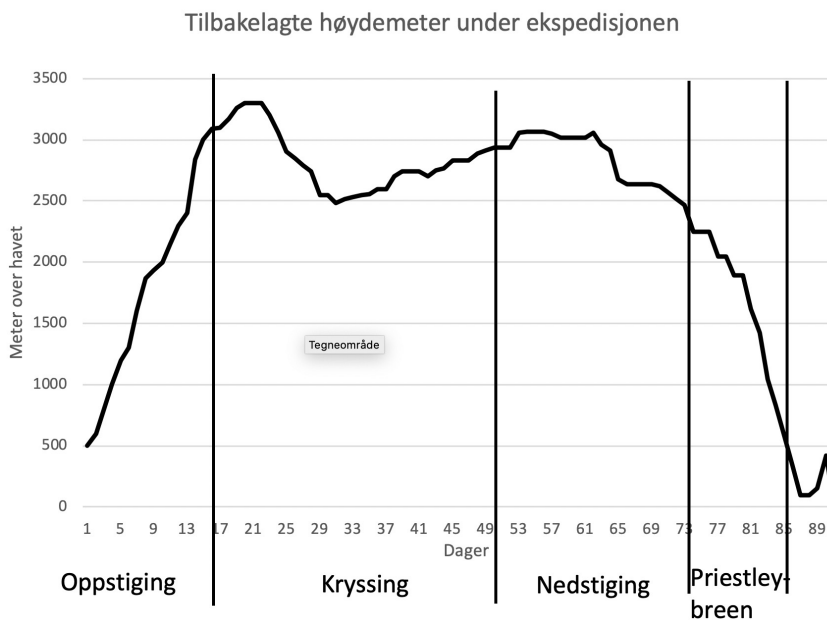
Polfareren gjennomfører blodprøvetaking i teltet på vei over Antarktisk (Gjeldnes, 2006a)

DBS var planlagt registrert to ganger i uken, men under ekspedisjonen varierte antall prøver og tidspunkt for prøvetaking grunnet praktiske årsaker. Etter avsluttet ekspedisjon ble prøvene fraktet til Norge sammen med resten av ekspedisjonsutstyret og lagret i romtemperatur i seks måneder. Totalt var prøvene oppbevart under varierende forhold i ni måneder.

Bloodprøvene ble analysert ved Ultramicro Analytical Immunochemistry Laboratory, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA) ved hjelp av «Recycling immunoaffinity chromatography» (Phillips, 2001; Phillips & Krum, 1998). Det ble i alt trukket ut 16 biomarkører. Fem pro-inflammatoriske interleukiner ble planlagt analysert (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-8 og IL-12) samt Tumor Nekrose Faktor-alfa (TNF-Alpha). Det ble også planlagt ekstrahering av anti-inflammatoriske cytokiner. Fire anti-inflammatoriske interleukiner ble trukket ut (IL-2, IL-4, IL-10 og IL-13) samt Interferon gamma (IFNg). Fire relevante neuropeptider ble planlagt analysert. Substans P er knyttet til smerte persepsjon og regnes også som pro-inflammatorisk (De Felipe et al., 1998). Et annet neuropeptid av interesse er «Calcitonin gene-related peptide» (CGRP). Peptidet har blitt knyttet til veksthormon produksjon og smertepersepsjon (Nakamura, Shimatsu, Murabe, Mizuta, Ihara & Nakao, 1998). Videre ble Neuropeptid Y valgt for analyse. Peptidet er assosiert med adaptive stressresponser (Sandvik et al., 2013; Morgan, et al., 2002). Det siste neuropeptidet som ble planlagt analysert var «Vasoactive intestinal peptide» (VIP) som er antatt relatert til produksjon av veksthormon,

regulering av blodtrykk og fordøyelse (Steyn, Tolle, Chen & Epelbaum, 2016). I tillegg ble fire hormoner relatert til aktivering og stressresponser i organismen planlagt trukket ut (kortisol, nor-adrenalin, adrenalin, adrenocorticotropt-hormon/ACTH og beta-endorfin).

For å sammenligne subjektive opplevelser av belastning med blodparametere ble polfarerens dagbok sammenlignet med blodvariabler. Under gjennomgangen av dagboken ble det vektlagt utsagn relatert til mental og fysisk belastning samt distanse og høydemetre tilbakelagt.



Figur 1 viser tilbakelagte høydemetere i de ulike fasene av ekspedisjonen.

Basert på dagboknotater ble seks faser indentifisert. Baseline er representert med måling gjennomført dagen før start av ekspedisjonen. En annen fase ble definert der polfareren jobbet seg opp mot et 3300 meter høyt høyfjellsplatå. En tredje fase er representert ved kryssing av platået, fulgt av en fase med nedkjøring fra platået mot Priestleybreen. En sentral fase er kryssingen av Priestleybreen og blodprøver tatt like før kryssing av breen inngår i målingene i denne fasen. Recovery-målinger er indentifisert som siste fase der målingene ble foretatt over en fire ukers periode etter avsluttet skimarsj. Dagboken dokumenterte at oppstigningen fra havnivå til 3330 meter var svært fysisk belastende (180 kilogram opp-pakning fordelt på pulk og sekk) og kryssingen av Priestleybreen (170 kilometer) var beskrevet som ekstremt psykisk belastende. Breen er beskrevet som enormt krevende å krysse med store mengder sprekker og sterke fallvinder. Mange av sprekkenes var dekket med snøbroer, noe som økte vanskene med å oppdage sprekkenes samt ved krysning av disse. Denne breen har ikke tidligere vært krysset av mennesker, noe som indikerer vanskelighetsgraden og trusselen i situasjonen. Beskrivelsene

fra dagboken ble tolket som at krysning av høyfjellsplatåer og nedfart fra platået til breen var betydelig mindre belastende sammenlignet med oppstiging og krysning av breen. Gjennomgang av dagbok, definering og rangering av fasene ble gjennomført før blodparameterne ble vurdert. Rangering av fasene ble verifisert av polfareren. Resultatene av DBS-analysene er presentert som gjennomsnitt av målingene i de ulike fasene, samt prosentvis endring fra en fase til neste.

Totalt ble 27 blodprøver samlet inn. Av praktiske grunner ble disse gjennomført etter avsluttet dagsetappe (mellom kl. 1600 og 2000), men noen avvik forekom (se tabellene 2-5 for en oversikt). For å beskrive nivå av fysiologiske reaksjoner er polfarerens responser sammenlignet med normgruppedata. Kortisol er i normgruppen målt klokken 0800 (Phillips, 2001).

Tabell 1 viser en oversikt over belastning i de ulike fasene av ekspedisjonen samt eksempler på markører for type belastning hentet fra dagboken. Tabellen viser også antall blodprøver som ble tatt i de ulike fasene.

Faser	Type belastning	Markører	Antall målinger
Baseline	Psykologisk belastning	- Forventningspress - Spenning - Gruer seg	1
Oppstiging til høyfjellsplatå	Ekstrem fysisk belastning	- Muskulært trykk - Fysisk sliten - Infeksjon	5
Kryssing av platå	Fysisk belastning	- Statisk lavintensitet fysisk trykk - Kulde	10
Nedstigning	Psykologisk belastning	- Trussel fra snøbroer og sprekker	5
Priestleybreen	Ekstrem psykologisk belastning	- Ekstrem trussel - Frykt - Sprekker - Snøbroer - Sterk vind	3
Recovery	Psykologisk belastning	- Savn - Venting - Lettelse	3

Resultater

Alle planlagte parameterne ble analysert med suksess på alle måletidspunktene. Tabell 2 viser en oversikt over pro-inflammatoriske cytokiner som ble trukket ut av prøvene og Tabell 3 viser anti-inflammatoriske cytokiner. Tabell 4 viser verdiene av de ekstraherte neuropeptidene og Tabell 5 viser de ekstraherte hormonverdier fra polfarerens DBS.

Tabell 2 viser verdiene for alle pro-inflammatoriske cytokiner samt tidspunkt for målingene.

DATO	TID	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-12	TNF α
04.11.05	10:00	185,3	88,6	65,9	20,6	19,3	101,4
06.11.05	09:00	35,9	371,6	281	52,9	68,4	511,9
09.11.05	16:30	331,7	35,4	16,4	20,2	8,2	31,7
13.11.05	16:00	160,4	167,9	139,2	23,9	37,6	182,3
18.11.05	16:00	261,6	55,2	63,8	28,7	30,5	39,9
21.11.05	18:00	104,5	202,9	219,6	70,5	77,2	251,4
25.11.05	17:00	309,1	44,3	20,4	10,3	18,2	50,7
29.11.05	19:15	228,4	21,8	13,8	8,2	10,6	32,8
04.12.05	16:00	312,7	30,6	21,7	12,6	13,5	27,4
07.12.05	17:15	300,2	35,5	19,5	10,1	13,2	40,5
11.12.05	17:45	188,4	147,9	134,9	20,4	33,1	190,6
12.12.05		347,5	20,6	11,6	9,6	9,6	25,5
19.12.05	16:00	289,6	45,4	35,2	10,8	14,3	51,3
24.12.05	15:00	311,4	20,4	17,3	11,6	10,2	36,6
29.12.05	14:00	306,9	16,3	10,1	8,2	8,7	20,5
03.01.06		245,4	32,5	26,8	13,5	18,3	46,7
07.01.06	18:00	33,8	622,4	604,4	115,9	62,5	709,5
11.01.06		297,5	26,5	19,8	43,1	6,4	47,2
12.01.06	16:00	388,1	16,1	10,3	22,2	8,3	22,6
17.01.06	20:00	26,1	389,5	408,2	109,7	44,9	431,3
18.01.06	15:30	10,9	611,7	577,1	165,4	61,7	750,9
20.01.06	22:30	175,2	169,4	135,9	88,3	40,5	206,1
25.01.06	00:30	100,5	229,3	199,7	100,2	45,9	255,8
28.01.06		27,4	360,2	372,8	113,6	72,8	472,2
07.02.06		159,8	33,5	21,5	25,1	11,6	45,7
20.02.06		24,1	15,4	10,2	9,2	9,5	18,6
08.03.06		27,2	10,8	7,3	3,1	11,2	11,2
Normal range per mg extracted protein*		1-30 pg*	1-14 pg/mL	1-14 pg/mL	1-10 pg/mL	1-14 pg/mL	1-20 pg/mL

Tabell 3 viser verdiene for alle ekstraherte anti-inflammatoriske cytokiner samt tidspunkt for målingene.

DATO	TID	IL-2	IL-4	IL-10	IL-13	IFNg
04.11.05	10:00	26,9	32,7	32,8	52,2	44,7
06.11.05	09:00	79,8	65,3	1,5	77,6	79,3
09.11.05	16:30	12,7	20,5	5,9	8,4	20,4
13.11.05	16:00	45,5	16,4	16,3	60,3	70,8
18.11.05	16:00	28,2	21,3	13,5	48,2	31,5
21.11.05	18:00	60,8	14,6	26,4	73,9	113,2
25.11.05	17:00	20,3	10,5	10,3	10,3	22,3
29.11.05	19:15	14,2	10,3	11,8	9,9	10,7
04.12.05	16:00	19,6	9,8	9,6	8,5	20,5
07.12.05	17:15	21,2	13,5	10,5	10,2	22,6
11.12.05	17:45	48,3	16,6	8,3	57,1	61,3
12.12.05		13,5	21,1	11,1	6,6	13,4
19.12.05	16:00	26,4	23,4	10,4	13,2	10,6
24.12.05	15:00	11,5	19,7	8,8	7,4	9,4
29.12.05	14:00	8,2	22,3	16,5	10,1	11,1
03.01.06		17,3	14,5	18,3	9,8	21,4
07.01.06	18:00	104,9	20,2	1,2	38,9	167,5
11.01.06		10,8	16,8	6,9	10,1	13,1
12.01.06	16:00	11,6	21,3	8,7	11,4	10,2
17.01.06	20:00	88,5	15,4	2,2	23,3	100,1
18.01.06	15:30	136,7	22,7	1,8	30,7	190,2
20.01.06	22:30	62,4	13,5	2,6	16,5	85,1
25.01.06	00:30	60,3	10,7	3,2	19,3	169,3
28.01.06		141,8	22,2	1,1	45,5	185,2
07.02.06		20,7	14,5	10,4	6,2	21,6
20.02.06		10,6	12,7	13,6	8,1	9,8
08.03.06		5,8	10,9	11,2	8,5	5,7
Normal range		1-14 pg/mL	1-14 pg/mL	1-14 pg/mL	1-14 pg/mL	1-20 pg/mL

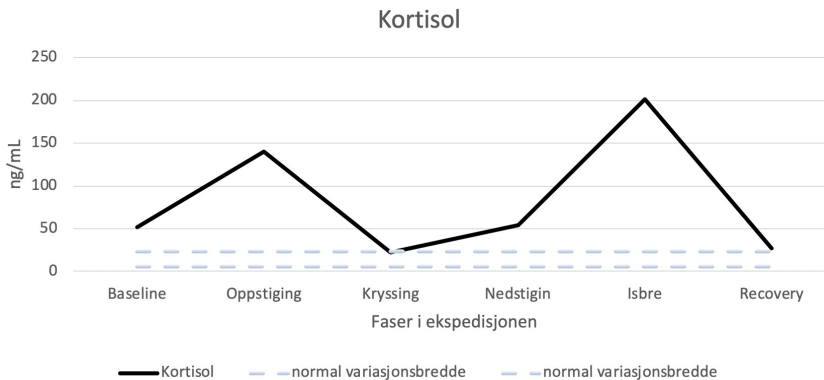
Tabell 4 viser verdiene av alle ekstraherte neuropeptider samt tidspunkt for målingene.

DATO	TID	SP	CGRP	NY	VIP
04.11.05	10:00	40,6	36,6	56,2	13,7
06.11.05	09:00	297,3	231,5	83,6	49,6
09.11.05	16:30	32,5	22,7	44,7	10,8
13.11.05	16:00	129,2	105,8	36,5	11,6
18.11.05	16:00	51,3	44,6	30,6	15,9
21.11.05	18:00	60,2	66,3	35,9	28,2
25.11.05	17:00	30,1	22,5	28,7	16,1
29.11.05	19:15	36,2	24,9	37,1	18,5
04.12.05	16:00	45,1	30,7	29,4	22,3
07.12.05	17:15	50,7	39,9	33,6	14,5
11.12.05	17:45	220,6	187,8	69,1	39,6
12.12.05		26,5	33,3	24,7	10,5
19.12.05	16:00	73,7	61,5	26,6	13,1
24.12.05	15:00	28,4	31,9	20,4	20,7
29.12.05	14:00	25,1	20,4	23,7	21,8
03.01.06		40,2	28,8	21,5	12,5
07.01.06	18:00	855,3	760,9	118,9	40,6
11.01.06		36,9	29,8	22,2	8,2
12.01.06	16:00	24,2	17,3	10,7	9,4
17.01.06	20:00	481,7	446,4	108,4	61,8
18.01.06	15:30	960,5	819,6	136,2	69,3
20.01.06	22:30	231,6	200,3	75,1	44,6
25.01.06	00:30	271,8	261,2	82,6	23,7
28.01.06		472,4	443,8	113,4	20,4
07.02.06		45,7	32,7	16,1	8,6
20.02.06		20,9	17,2	9,5	5,2
08.03.06		13,2	10,8	14,7	3,9
Normal range		1-12 pg/mL	1-12 pg/mL	1-12 pg/mL	1-12 pg/mL

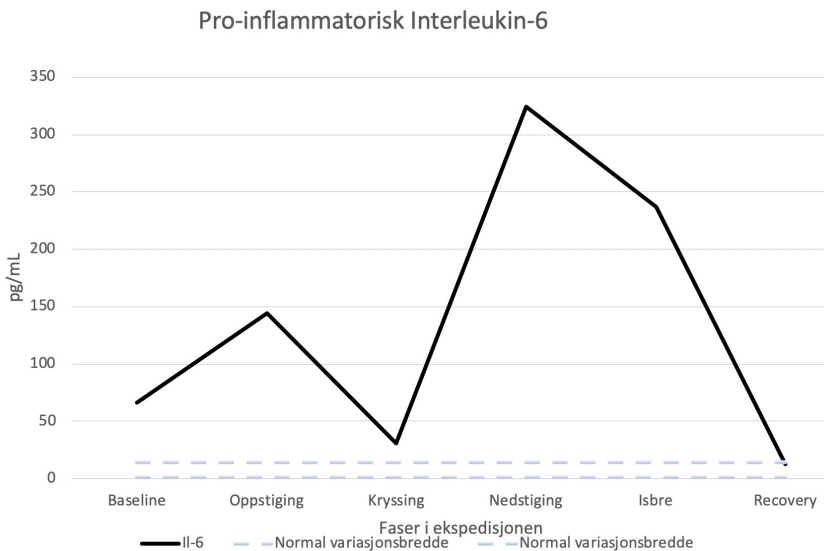
Tabell 5 viser verdiene av alle ekstraherte hormoner fra blodprøvene samt tidspunkt for målingene.

DATO	TID	B-ENDROPHIN	KORTISOL	NOR-ADRENALIN	ADRENALIN	ACTH
04.11.05	10:00	5,8	51,3	69,8	116,2	61,4
06.11.05	09:00	2,6	216,4	396,2	319,7	416,5
09.11.05	16:30	6,3	21,8	51,3	60,4	30,4
13.11.05	16:00	2,2	77,3	192,5	245,8	115,9
18.11.05	16:00	2,6	180,2	360,1	429,8	250,1
21.11.05	18:00	1,7	202,4	388,5	365,7	449,2
25.11.05	17:00	7,7	30,4	42,2	32,6	26,4
29.11.05	19:15	10,8	16,5	30,6	25,4	15,5
04.12.05	16:00	26,9	21,4	28,5	21,7	23,9
07.12.05	17:15	19,8	10,7	24,6	19,6	11,6
11.12.05	17:45	3,2	60,8	132,8	200,3	85,2
12.12.05		4,1	13,4	29,4	36,8	29,9
19.12.05	16:00	3,8	16,3	30,1	41,4	27,3
24.12.05	15:00	19,5	20,1	27,6	56,7	28,5
29.12.05	14:00	61,9	9,8	21,3	30,5	21,7
03.01.06		5,5	19,3	19,7	24,8	22,8
07.01.06	18:00	3,6	82,5	185,7	335,9	116,4
11.01.06		2,6	13,2	44,2	72,5	20,6
12.01.06	16:00	2,3	19,4	46,9	70,6	21,2
17.01.06	20:00	1,9	66,2	116,5	182,1	100,5
18.01.06	15:30	2,3	89,6	204,3	177,3	162,8
20.01.06	22:30	1,5	184,6	404,6	516,6	244,3
25.01.06	00:30	1,8	203,7	459,2	511,8	369,1
28.01.06		1,4	213,8	460,1	562,4	300,4
07.02.06		4,9	36,5	28,1	40,1	40,6
20.02.06		5,1	26,4	17,6	13,4	32,2
08.03.06		8,3	18,5	22,5	10,7	25,9
Normal range 8:00 am in normals**		1-3.1 pg/mL	6-23 ng/mL**	5-60 pg/mL	5-25 pg/mL	10-55 pg/mL

Figur 2 viser gjennomsnittlig kortisol-nivå fordelt på de seks fasene i ekspedisjonen. Resultatene viste en markant økning på 172 prosent i kortisolnivå fra baseline til oppstiging til høyfjellsplatået. Kryssingen av platået viste en reduksjon på 84 prosent i forhold til oppstigningen. Endring i kortisolnivå fra kryssing til nedfart fra platået viste en økning (136%). Den høyeste målingen av kortisol ble funnet ved kryssing av Priestleybreen, representert med en økning på 270 prosent fra nivået under nedfart. En recovery-effekt ble funnet med en reduksjon i kortisolnivå med 89 prosent.



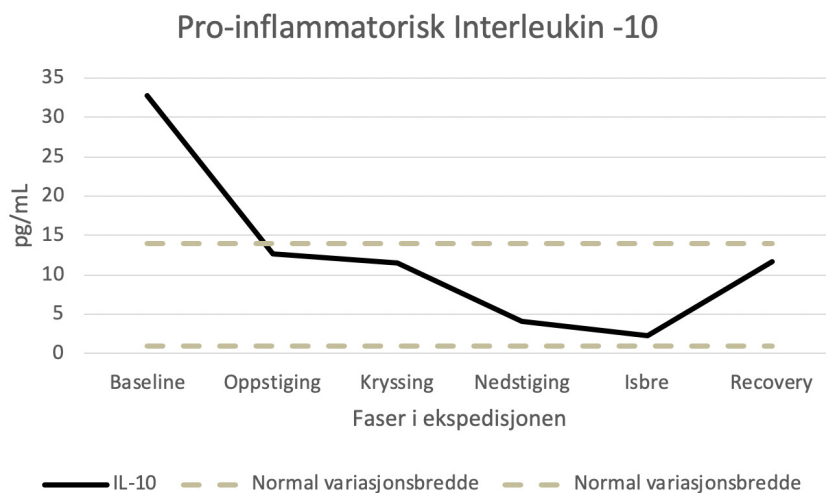
Figur 2 viser gjennomsnittlig kortisolnivå målt som nanogram/milliliter. Figuren viser kortisolnivå separert for de enkelte fasene identifisert basert på analyse av dagboken.



Figur 3 viser pro-inflammatoriske responser representert med gjennomsnittlig interleukin-6 (IL-6). Variabelen er målt som pikogram/milliliter (pg/mL). Figuren viser IL-6 separert for de enkelte fasene identifisert basert på analyse av dagboken.

Analysene av immunresponser viste en økning av IL-6 på 98 prosent fra baseline til oppstiging mot plataet, for så å vise en nedgang på 78 prosent. Resultatene viste en økning i IL-6 responser på 945 prosent fra kryssing av plataet til nedstiging og en reduksjon fra nedstiging til kryssing av breen på 27%. En recovery-effekt ble funnet ved at analysene viste en nedgang på 94 prosent fra kryssingen av isbreen til målinger foretatt etter avsluttet marsj og disse verdiene var innenfor normalområdet (Se Figur 3).

IL-10 ble benyttet som mål på anti-inflammatorisk respons. Analysene viste en nedgang fra baseline til oppstiging på 61 prosent, noe som resulterte i at IL-10 nivået befant seg innen området for normalvariasjon. Alle resterende målinger av IL-10 var innenfor normalområdet (Se Figur 4).



Figur 4 viser anti-inflammatoriske responser representert med gjennomsnittlig interleukin-10 (IL-10). Variabelen er målt som pikogram/milliliter (pg/mL). Figuren viser IL-10 separert for de enkelte fasene identifisert basert på analyse av dagboken.

Diskusjon

Resultatene viste at alle 16 parametere som var planlagt undersøkt lot seg ekstrahere. Videre viste analysene en konvergent validitet av DBS ved en samvariasjon mellom subjektive vurderinger av belastning rapportert i dagboken og sentrale parametere målt ved DBS. I tillegg viste resultatene ekstreme endringer i nivåene på sentrale blodparametere i kritiske faser av ekspedisjonen.

Det første formålet med case-studien var å undersøke om DBS som metode var effektiv under ekstreme vinterfelt betingelser. Spesielt ville en undersøke om forfall av prøvene oppsto ved ekstrem variasjon i temperatur (variasjonsbredde: – 40 Celsius midtveis i ekspedisjonen til + 40 Celsius i Washington), mekaniske og kontaminasjons utfordringer som et resultat av feltmessig håndtering over en lang tidsperiode (90 dager) og nedbryting av molekylene over tid ved totalt ni måneders lagring i svært varierende omgivelsestemperatur.

Resultatene viste at alle biomarkører som ble undersøkt lot seg analysere for alle innsamlede DBS. Dette til tross for at parametere som ble valgt for analyser representerer biomarkører på et vidt spekter relevante funksjoner innen militærpsykologisk/ medisinsk forskning. Markørene omfatter biologiske mål på belastning (kortisol, ACTH, adrenerge variabler), adaptive stressresponser (Neuropeptid-Y) og immunparametere (pro- og anti-inflammatoriske cytokiner). Det ble også ekstrahert peptider relatert til veksthormon (CGRP og VIP), smerte (substans P) og kognitive variabler som spenning og belønning (Beta-endorfin). Et viktig moment i denne sammenhengen er ikke bare status på selve blodprøven, men også valg av analysemetode. Bruken av «recycling immunoaffinity chromatography» (Phillips, 2001) for å analysere blodprøvene gjorde det mulig å detektere proteiner ned til pikogram per milliliter væske. Dette gir en betydelig sensitivitet i analysene og bidrar til relevans for bruk av metoden for feltmessige studier. Differanser i størrelse og form, samt molekylenes hydrofilisitet bidrar til å detektere de i ettertid. Som vist i denne studien ble store og komplekse rekker av aminosyrer (f.eks. alle interleukinene, samt TNF, INF og CGRP), mellomstore substanser som steraner (kortisol) og svært små molekyler som katekolaminene adrenalin og nor-adrenalin, ekstrahert med suksess. En fordel med metoden er at væske fjernes fra prøvene og noe som gir tørre prøver som har vist seg å være mer resistente mot ytre påvirkning sammenlignet med prøver i væske.

Det andre formålet med studien var å undersøke samvariasjonen mellom subjektiv opplevelse av belastning, rapportert i dagbok, og nevroendokrine mål på belastning. De seks fasene identifisert basert på dagboknotater, kan rangeres etter intensiteten og type belastning. Fasen med høyest grad av stress ble identifisert og være kryssing av Priestleybreen. Kryssingen innebærer stor mental belastning der trussel for liv og helse var overhengende. I tillegg er en slik kryssing med ski og pulk fysisk belastende. Vurderingen av denne fasen som mest belastende er også i tråd med nettbasert rapportering fra ekspedisjonen (Gjeldnes, 2006b; Dag 81 til dag 89). Oppstigningen i starten av ekspedisjonen ble rangert under kryssingen av breen og innebar en betydelig fysisk belastning med tung pulk og ryggsekk (160 kilogram i pulk og 20 kilogram i ryggsekk) samt mange tilbakelagte høydemetre (3300 meter). Belastningen ved nedstiging til Priestleybreen skyldtes store mengder sprekker som måtte passeres eller unngås. Selve kryssingen av plataet ble regnet som den minst utfordrende fasen av selve skimarsjen. I denne fasen ble skiseil ofte benyttet, og det var lite høydeforskjeller som skulle tilbakelegges. Gjennomsnittsverdiene på stresshormonet kortisol følger denne rangeringen. Tilsvarende resultat ser en også for prosentvis endring fra de ulike fasene. Til tross for at IL-6 viste ekstremt høye verdier under kryssing av Priestleybreen var den høyeste verdien målt etter nedfart mot breen. Det kan komme av inflammatoriske responser etter langvarig akkumulert statisk belastning. Som en sammenfatning støtter resultatene, og da spesielt kortisol, bruken av DBS som metode for studier av belastning i felt og representerer høy grad av sammenfallende (konvergent) validitet i metoden. Både for kortisol og IL-6 var nivåene for recovery fasen lavere enn for baseline fasen. Tidligere studier av kardiovaskulære responser har rapportert lignende funn (Hansen & Johnsen, 2013). Dette har blitt tolket som at recovery kan fungere som en bedre baseline sammenlignet med målinger foretatt før en undersøkelse starter. Årsaken til dette er at ukontrollerte variabler som forventingsangst kan skape aktivering i organismen og påvirke målingene (Hansen & Johnsen, 2013).

IL-10 fulgte ikke forventet forløp over fasene. Vi forventet en forsinket Anti-inflammatorisk homeostatisk respons over ekspedisjonen. Resultatene viste en suppresjon av IL-10 fra baseline til de resterende fasene og responsen ble liggende stabilt innenfor normalvariasjonsområdet. Grunnen til de høye verdiene initialt i ekspedisjonen kan være en kompenserende respons som følge av inflammasjon etter tannbehandling før avreise fra Norge. Dette styrkes av at baseline-registreringen viste den høyeste verdien som ble målt av IL-10.

Mestring av ekstremisituasjoner innebærer en kraftig mobiliserende respons i organismen. En 90 dagers soloekspedisjon uten etterforsyninger i polare strøk er av de mest ekstreme situasjoner som kan oppleves. Kartlegging av individets mekanismer for tilpasning til slike situasjoner er derfor av interesse. Under den mest belastende fasen, kryssing av Priestleybreen, ble høyeste kortisolverdi målt (213,8 pg/mL; se Tabell 1). Normalverdier ligger mellom seks og 23 pg/mL. Polfarerens gjennomsnittsverdi var 830 prosent høyere en øvre grense innen normalområdet. Lignende resultat ble funnet for IL-6. Den høyeste registrert verdien ble målt til 604,4 pg/mL (se Tabell 2) og ble funnet i begynnelsen av nedstigningen mot Priestleybreen. Normalområdet for denne variabelen er en til 14 pg/mL. Denne responsen er 2788 prosent høyere sammenlignet med øvre grense i normalområdet. Polfarere som gjennomfører slike ekspedisjoner, kan beskrives som resiliente personer som tåler ekstrem belastning. Sandvik et al. (2013) viste at resiliente personer, målt ved «Personality Hardiness» (se Johnsen, Bartone & Hystad, 2015; Hystad & Johnsen, 2019, for en beskrivelse av Hardiness-begrepet), framviste adaptive endokrine og immune stressresponser under feltmessig belastning.

Undersøkelser av ekstreme ekspedisjoner i polare strøk, der biomarkører og spesielt blodparametere benyttes, har tidligere kun benyttet seg av pre-post design. Kern et al., (2019) viste en moderat heving av kortisol nivå som resultat av en ekstrem solo-ekspedisjon i Antarktisk. Det samsvarer med våre recovery-data der kortisol nivået ble registrert i øvre grense av normalvariasjon. Imidlertid vil designet benyttet av Kern et al., (2019) kunne resultere i feilslutninger om biologiske konsekvenser av slike ekspedisjoner da designet ikke fanger opp de ekstreme utslagene polfareren viste under selve gjennomføringen. Denne case-studien utvider dermed tidligere kunnskap ved å beskrive økningen av slike responser under selve skimarsjen, altså radikal fysiologisk tilpasning, til ekstremt endret kontekst.

Begrensinger i studien

Noen begrensinger med studiet må nevnes. Normgruppedata for kortisol er presentert som morgen-nivå (målt klokken 0800). Kortisolnivåene er sirkadiske og fluktuerer som en funksjon av tid på døgnet, men med høyeste verdier målt om morgenen og kvelds-verdier rundt det halve av kortisolnivå målt om morgenen. Under ekspedisjonen ble DBS registrert ved ulike tidspunkt. Årsaken til dette var praktiske. Blant annet snudde polfareren døgnet mot slutten av ekspedisjonen samt at prøvetaking måtte passe inn i pågående aktiviteter. Til tross for dette er nivået på kortisol så høye at døgnvariasjoner ikke kan forklare forskjellene som ble funnet.

En av fordelene med studier av solo-ekspedisjoner i polare strøk er at sannsynligheten for smittebårne infeksjoner er eliminert. Imidlertid kan en ikke eliminere infeksjoner påført før start. Dette var også tilfelle med denne ekspedisjon.

Imidlertid er det tvilsomt at dette forklarer resultatene, med unntak av IL-10, da immunparameteren IL-6 ble målt over en periode på fire måneder, samt at målingene samvarierer med fasene definert basert på subjektive vurderinger beskrevet i dagboken.

Denne studien er en case-studie, noe som legger begrensninger på slutninger om generaliserbarhet. Det bør påpekes at studier av ekstreme prestasjoner under ekstreme forhold er fenomener som er svært vanskelig tilgjengelig. Case-studier er derfor en relevant måte å tilnærme seg slike forhold for å utvide eksisterende kunnskap.

Konklusjon

Denne case-studien har vist at DBS analysert ved bruk av «recycling immunoaffinity chromatography», er en metode med stort potensiale for studier under polare feltmessige forhold. Videre viste metoden en klar konvergent validitet ved at endokrine og immunparametere, spesielt kortisol og IL-6, fulgte subjektive vurderinger av belastning. Resultatene viste også ekstreme utslag av enkelte parametere, noe som indikerer ekstreme adaptive responser i individer med massivt mestringspotensial. Ved å vise at sentrale biomarkører, relatert til prestasjoner og subjektive vurderinger, med suksess ble analysert etter ekstreme miljøpåvirkning og lang lagringstid, kan en fastslå at denne metoden har et stort potensial i militærpsykologisk/medisinsk forskning under arktisk feltmessige forhold. Anvendeligheten styrkes ytterligere ved at verdier av molekyler med varierende form og størrelse ble ekstrahert med suksess. Behovet for enkle og robuste metoder som registrerer fysiologiske endringer, og relasjonen mellom fysiologi og mentale forhold under ekstreme feltmessige forhold, er viktig med hensyn til kunnskap for å bedre styrkebeskyttelse og avdelingens kampkraft. DBS kan være et viktig bidrag for å generere kunnskap om slike forhold.

Referanser

- Bartone, P. T., Roland, R. R., Bartone, J. V., Krueger, G. P., Sciarretta, A. A., & Johnsen, B.H. (2019). Human adaptability for deep space exploration mission: An exploratory study. *Journal of Human Performance in Extreme Environments*, 15, iss 1, Article 5. DOI: 10.7771/2327-2937.1124.
- Bradburne, C., Graham, D. H.M., Brenner, R., Pamuku, M. & Carruth, C. (2015). Overview of 'Omics Technologies for Military Occupational Health Surveillance and Medicine. *Military Medicine*, 180, 34-48. doi: 10.7205/MILMED-D-15-00050.
- De Felipe, C., Herrero, J.F., O'Brien, J.A., Palmer, J.A., Doyle, C.A., Smith, A.J., Laird, J.M., Belmonte, C., Cervero, F. & Hunt, S.P. (1998). "Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P". *Nature*, 392, 394–397. doi:10.1038/32904.
- Elenkov, I.J., & Chrousos, G.P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. *Neuroendocrine Immune Basis of the Rheumatic Diseases II, Proceedings*, 966, 290–303.
- Elosua, R., Bartali, B., Ordovas, J.M., Corsi, A.M., Lauretani, F. & Ferrucci, L.

- (2005). Association Between - Physical Activity, Physical Performance, and Inflammatory Biomarkers in an Elderly Population: The InCHIANTI Study. *Journal of Gerontology*, 60A, 760–767.
- Farzadegan, H., Quinn, T. & Polk B. (1987). Detecting antibodies to human immunodeficiency virus in dried blood on filter papers. *Infectious Diseases*, 155,1073-74.
 - Gjeldens, R. (2006a). På nåde over Antarktisk. Hell, Rune Gjeldnes AS. ISBN-10: 82-995661.
 - Gjeldnes, R. (2006b). The longest march. Lastet ned fra: <https://gjeldnes.com/the-longest-march/>. Lastet ned 24.12.2019.
 - Hansen, A.L., & Johnsen, B.H. (2013). Relationship between Neuroticism. Threat of shock and heart rate variability reactivity, *International Maritime Health*, 64, 54-60.
 - Johnsen, B.H., Bartone, P. & Hystad, S.W. (2015). Personlighetspsykologi og Operativ Psykolog: Hardførhet som relevant personlighetsdimensjon. I *Personlighetspsykolog* L.E. Ottesen Kennair og R. Hagen (Red.). Fagbokforlaget.
 - Johnsen, B.H., Hansen, A.L., Murison, R., Eid, J., & Thayer, J.F. (2012). Heart rate variability and cortisol responses during attentional and working memory tasks in naval cadets. *International Maritime Health*, 63, 181-187.
 - Hystad, S.W., & Johnsen. B.H. (2019). Resiliens: En sentral egenskap hos operatøren. I B.H. Johnsen og J. Eid (Red.). *Operativ Psykologi II – Anvendte aspekter*. Fagbokforlaget. Bergen, ISBN: 978-82-450-2547-7.
 - Kasapis, C. & Thompson, P.D., (2005). The Effects of Physical Activity on Serum C-Reactive Protein and Inflammatory Markers A Systematic Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 45, 1563-1569. doi: 10.1016/j.jacc.2004.12.077.
 - Kern, C., Polley, K., Hamrock, M., Bussler, W., James, K., Varadharaj, S. & Troup, J. (2019) Antarctica Crossing World Record: A Case Study on the Use of Functional Nutrition and its Effect on Nutrient Demand, Body Composition and Selected Biomarkers of Performance. *Current Developments in Nutrition*, 3, (P12-052-19), <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz035.P12-052-19>
 - McDade T.W., Williams, S. & Snodgrass, J.J. (2007). What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 44, 899-925. doi.org/10.1353/dem.2007.0038.
 - Morgan, C.A., Rasmusson, A.M., Wang, S., Hoyt, G., Hauger, R.L., & Hazlett, G. (2002). Neuropeptide- Y, cortisol, and subjective distress in humans exposed to acute stress: Replication and extension of previous report. *Biological Psychiatry*, 52, 136–142. doi: 10.1016/S0006-3223 (02)01319-7.
 - Nakamura, Y., Shimatsu, A., Murabe, H., Mizuta, H., Hara, C. & Nakao, K. (1998). Calcitonin gene-related peptide as a GH secretagogue in human and rat pituitary somatotrophs. *Brain Research*, 807, 203-207.
 - Nindl, B.C (2004). Insulin-Like Growth Factor-I as a Candidate Metabolic Biomarker: Military Relevance and Future Directions for Measurement. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3, 371-376.
 - Padgett, D.A., & Glaser, R. (2003). How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 24, 444–448. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00173-X.
 - Padgett, D.A., Marucha, P.T., & Sheridan, J.F. (1998). Restraint stress slows

- cutaneous wound healing in mice. *Brain Behavior and Immunity*, 12, 64–73. doi: 10.1006/brbi.1997.0512.
- Parker, S.P. & Cubbit, W.D. (1999). The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *Journal of clinical pathology*, 52, 633-639.
 - Phillips, T.M. (2001). Multi-analyte analysis of biological fluids with a recycling immunoaffinity column array. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 253–262. doi: 10.1016/S0165-022X (01)00202-0.
 - Phillips, T.M. & Krum, J.M. (1998). Recycling immunoaffinity chromatography for multiplex analyte analyses in biological samples. *Journal of Chromatography Bilogical and Biomedical Sciences, Appl.* 715, 55-63.
 - Rubio, J.M., Post, R.J., Docters van Leeuwen, W.M., Henry, M.C., Lindergard, G. & Hommel, M. (2002). Alternative polymerase chain reaction method to identify Plasmodium species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR) *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 199–S204, doi. 10.1016/S0035-9203(02)90077-5.
 - Sandvik, A.M., Bartone, P.T., Hystad, S.W., Phillips, T.M., Thayer, J.F., & Johnsen, B.H. (2013). Psychological hardiness predicts neuroimmunological responses to stress. *Psychology, Health & Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1080/13548506.2013.772304>.
 - Steyn, F.J., Tolle, V., Chen, C. & Epelbaum, J. (2016). Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Comprehensive Physiology*. 6. 687–735. doi:10.1002/cphy.c150002.
 - Taberner, J.L., Bruguera, M., Rodriguez, M.C., Mayor, A. & Batallia, J. (2002). Seroepidemiological survey of hepatitis B infection in a cohort of military recruits. *European Journal of Epidemiology*, 8, 117-119.
 - Yehuda, R., Brand, S., & Yang, R.-K. (2006). Plasma neuropeptide Y concentrations in combat exposed veterans: Relationship to trauma exposure, recovery from PTSD, and coping. *Biological Psychiatry*, 59, 660–663. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.08.027.
 - Žáková, A. & Zezulová, O. (2019). Changes in haematological parameters during a summer expedition in Antarctica. *Czech Polar Reports*, 9, 107-113.