



H. Gabriel¹, G. Valet²,
A. Urhausen¹, W. Kindermann¹

Selbstlernende Klassifizierung durchflußzytometrischer Listendaten von immunphänotypisierten Lymphozyten bei akuter körperlicher Arbeit

Self learning classification of flow cytometric list mode data from immune phenotyped lymphocytes following acute physical work

¹Institut für Sport und Leistungsmedizin, Universität des Saarlandes, Saarbrücken. ²Max-Planck-Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Zellbiochemie, Marinsried

Zusammenfassung

Vor, während und 60min nach intensiven, erschöpfenden Ausdauerbelastungen auf dem Fahrradergometer mit 110% der individuellen anaeroben Schwelle (n=22; Dauer: 20±7 min) wurden Immunphänotypisierungen der Leukozyten vorgenommen. Die Auswertung der Methoden erfolgte mit dem selbstlernenden Klassifizierungsprogrammssystem CLASSIF1. Die Belastungs- und Ruhezeitpunkte der Einzelpersonen wurden vom Programm zu >92% hauptsächlich aufgrund prozentualer Veränderungen einzelner Zellpopulationen infolge der Zunahme der NK-Zellen richtig erkannt. Nennenswerte Änderungen der Packungsdichte der Antigene auf der Zellmembran der Lymphozyten wurden dagegen nicht beobachtet. Die selbstlernende Klassifizierung durchflußzytometrisch bestimmter Immunphänotypen kann demnach in standardisierter Weise zwischen Ruhe- und Belastungszustand differenzieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen beispielhaft neue Möglichkeiten für eine klinikgerechte durchflußzytometrische Diagnostik.

Schlüsselwörter: Leukozyten, Lymphozyten, Immunphänotypisierung, NK-Zellen, Körperarbeit

Summary

Blood leukocytes were immunophenotyped before, during and 60 min after intensive endurance exercises on a cycle ergometer to exhaustion at 110% of the individual anaerobic threshold (n=22; time: 20±7min). The flow cytometric list mode data were evaluated by the self learning classification program system CLASSIF1. Blood samples taken during exercise and at rest could be identified in >92% of the cases by quantitative changes of cell concentrations, mainly by an increase of NK-cells. Surface antigen packing densities were not significantly altered during acute exercise. Flow cytometric classification of immunophenotypes can distinguish in a standardized way between physical rest and exercise. The present results are an example for new potential of clinical flow cytometric diagnostics.

Keywords: Leucocytes, Rymphocytes immune phenotyping, NK-cells, Physical work

Einleitung

Die Messung zellulärer Immunparameter mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist eine fach- und disziplinübergreifende Aufgabe in der Biologie und Medizin. Die Methodenprotokolle sind hierbei überaus vielfältig (11) und Vergleiche

der Resultate verschiedener Arbeitsgruppen u.a. aufgrund verschiedener Auswertemethoden gegenwärtig nur bedingt möglich. Clusteranalysen (2), neurale Netzwerke (9), Expertensysteme (1, 10) und andere Auswerteverfahren (6, 14) brachten keinen entscheidenden Fortschritt bei der allgemein und routinemäßig anwendbaren sowie standardisierten Auswertung durchflußzytometrischer Listendaten. Darüber hinaus wurden bisher nur Bruchteile der gemessenen Informationen in die Auswertungen einbezogen. Erste Auswertungen mit dem neuentwickelten selbstlernenden Klassifizierungsprogramm CLASSIF1 haben in verschiedenen klinischen Bereichen gezeigt, daß durchflußzytometrisch erfaßte Thrombozytenfunktionsparameter bei der Differenzierung in Myokardinfarktrisikogruppen, Granulozytenfunktionsparameter bei der Prognosedagnostik von Sepsispatienten und die Lymphozytenphänotypisierung bei der Übertrainingsdiagnostik sehr hilfreich sein können (15).

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob auf diese Weise eine Klassifizierung der bekannten quantitativen Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen (3) durch akute Körperarbeit anhand durchflußzytometrischer Listendaten möglich ist, und welche Rolle Zellzahländerungen bzw. Antigenichteunterschiede auf den Zelloberflächen dabei spielen.

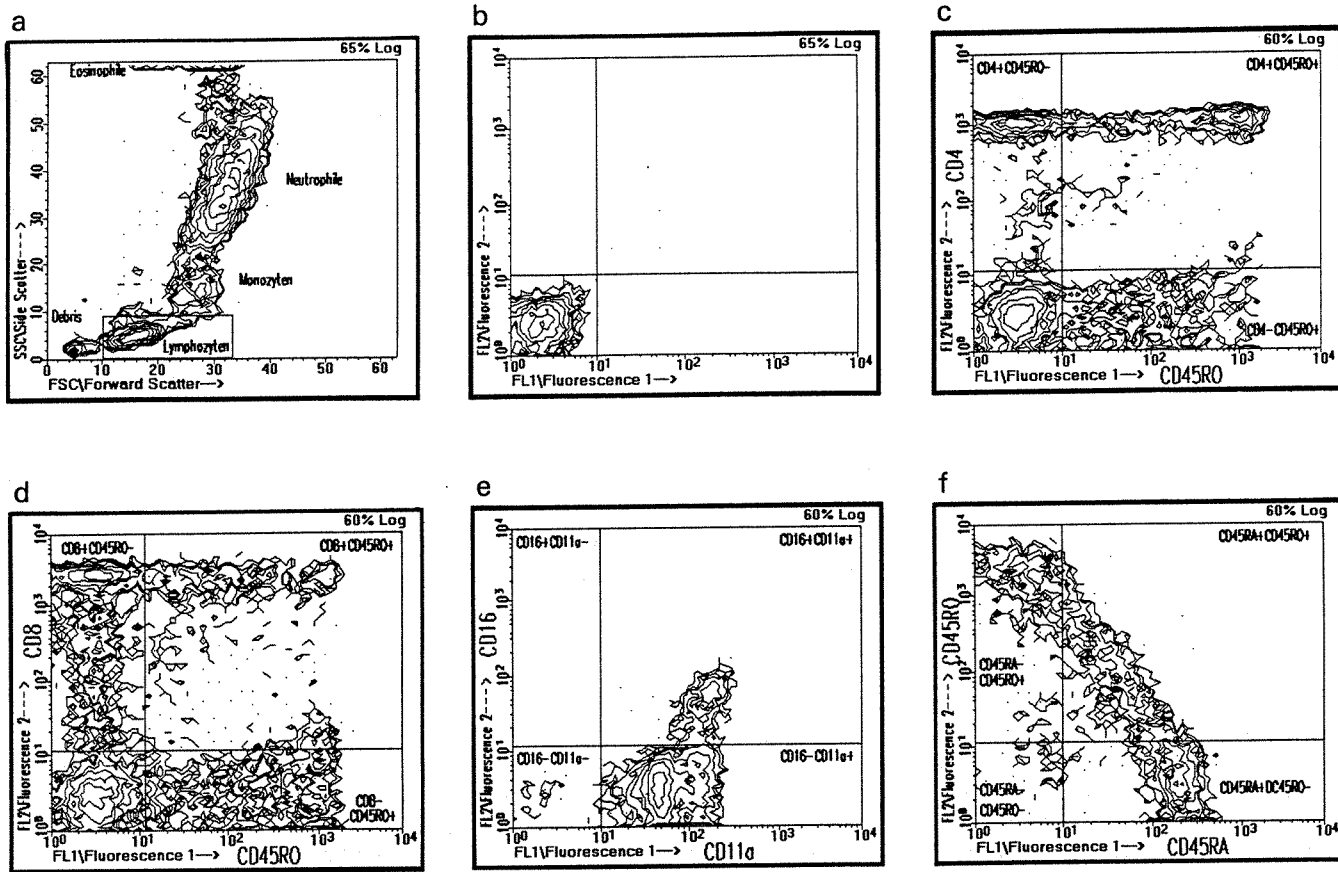


Abbildung 1: Dargestellt sind die Zweiparameterauftragungen als Contourplots für a) die Streulichteigenschaften mit Lymphozytengate, b) Negativkontrolle mit Isotypantikörpern, c) CD45RO-FITC versus CD4- PE, d) CD45RO-FITC versus CD8-PE, e) CD11a-FITC versus CD16-PE und f) CD45RA-FITC versus CD45RO-PE.

Material und Methoden

11 Radsportler (Alter: 41 ± 12 Jahre, Körperhöhe: 180 ± 12 cm, Körpermasse: 76 ± 12 kg, VO_{2max} : 58 ± 7 $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$) führten je 2 intensive, erschöpfende Ausdauerbelastungen auf einem drehzahlunabhängigen Fahrradergometer (Dynavit, Keiper, Kaiserlautern) mit 110% der individuellen anaeroben Schwelle (3, 13) in etwa 4-wöchigem Abstand (Leistung: 252 ± 45 W, $n=22$) durch. Signifikante Unterschiede bezüglich Dauer (21 ± 7 min versus 18 ± 6 min; je $n=11$) und maximaler Laktatkonzentration ($9,7 \pm 2,5$ $mmol \cdot l^{-1}$ versus $9,6 \pm 2,5$ $mmol \cdot l^{-1}$; je $n=11$) bestanden zwischen den Belastungen nicht.

Nach mindestens 15-minütiger Ruhe im Liegen, in der 10. und während der letzten beiden Belastungsminuten (sitzend) sowie in der 60. min nach Belastung (liegend) erfolgten venöse Blut-

entnahmen aus einer Ellenbeugenverweilkanüle zur Immunphänotypisierung der Lymphozyten. Mittels Doppelmärkierung der Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern (direkte Immunfluoreszenz) im lysierten Vollblut (Protokoll Becton-Dickinson [BD], Heidelberg) wurden durchflußzytometrisch (FAC Scan; FAC Scan research software, Version 2.1; BD) Listendaten aufgenommen und mit dem selbstlernenden Klassifizierungsprogramm CLASSIF1 (Fa. Partec, Münster) ausgewertet.

Die ausführliche Methodenbeschreibung des CLASSIF1-Programmsystems wurde in (15) vorgenommen. Die wesentlichen Auswerteschritte seien hier vereinfacht dargestellt. Zweiparameterhistogramme (Abb.1) wurden zunächst mit dem Programm CALC hinsichtlich der Mittelwerte der Abszissen und Ordinatenwerte sowie der Mittelwerte des

Abszissen/Ordinaten- bzw. des Ordinaten/Abszissenverhältnisses der Zellen ausgewertet. Da die gemessenen Fluoreszenzintensitäten die Rezeptordichten für das jeweilig erkannte Oberflächenantigen semiquantitativ widerspiegeln, wurden sie in arbiträren Einheiten angegeben. Gleichzeitig erfolgte der Übertrag dieser mittleren Fluoreszenzintensitäten und der prozentualen Variationskoeffizienten der Histogramme in sog. Ergebnisdateien, die wiederum in eine Meßdatenbank im Binärformat übertragen wurden. Danach erfolgte ein Lernprozeß des CLASSIF1 Programmsystems mit Hilfe des Programms LEARN. Durch den Eintrag der klinischen Diagnose (hier: Belastungszeitpunkte) in die Identifizierungszeile der Datenbank entstand die sog. Lerndatenbank. Es erfolgte die Berechnung der Datenbankkolonnen, die die höchste Spezifität zur Erkennung der 'abnormen' Proben (Belastungszeitpunkte)



Tabelle 1: Aufgeführt sind die 8 wesentlichen von 34 aus den 136 Datenbankkolonnen vorausgewählten Lymphozytenparameter, die zur Differenzierung zwischen den Zeitpunkten beitragen (Diagnosehilfe). Die Übereinstimmung mit 5 der 8 Kriterien in der zum jeweiligen Zeitpunkt gehörigen Klassifizierungsmaske zeigte die Richtigkeit der durchflußzytometrischen Diagnose mit dem tatsächlichen Belastungszeitpunkt an. Die Übereinstimmung von 4 der 8 Kriterien führte zu einer Doppeldiagnose und bei weniger als 4 Übereinstimmungen lag eine falsche Diagnose vor.

Parameter	Klassifikationsmasken				Anzahl der Diagnosehilfen
	Vor	10. min	Ende	+ 60 min	
Lymphozyten	0	0	0	-	1
CD 16 ⁻	0	-	-	0	11
CD 16 ⁺	0	+	+	0	15
CD 16 ⁺ CD 11 a ⁺	0	+	+	0	31
CD 4 ⁻ CD 45 RO ⁻	0	+	+	0	19
CD 8 ⁺ CD 45 RO ⁻	0	+	0	0	23
CD 8 ⁻ CD 45 RO ⁺	0	-	-	0	27
CD 45 RA ⁺ CD 45 RO ⁻	0	+	+	0	27

0: 10.-90. Perzentile, -: < 10. Perzentile, +: > 90. Perzentile der Werte „vor“.

aufwiesen und alle Werte aus diesen Datenbankkolonnen wurden in eine Multifaktorendatenbank übertragen. Diese Multifaktorendatenbank stellte die Berechnungsgrundlage für Spezifität zur Erkennung der Ruhezeitpunkte und Sensitivität zur Erkennung der Belastungszeitpunkte dar.

Abbildung 1 zeigt das Lymphozytenauswertefenster (a), das CD-Antikörperpanel (b-f) sowie die Quadrantensetzungen zur Berechnung der prozentualen Anteile der Lymphozyten-subpopulationen und deren Fluoreszenzintensitäten (FI; Darstellung in Abb.1 mit PC-LYSYS software, BD). Die Statistik für

die Einzelparametervergleiche in Tab. 2 wurde mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test bei einem α -Fehler-Niveau von 1% (CSS-software, Stat Soft, Oklahoma, U.S.A.) durchgeführt.

Ergebnisse

Aus den in Abbildung 1 gezeigten Subpopulationen wurden die Prozentwerte, die Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)- bzw. Phycoerythrin (PE)- FI, die FITC/PE-Verhältnisse und die FITC/FSC (Forwardscatter)- bzw. PE/FSC-Quotienten berechnet. Die entstandene Datenbank umfaßte 34 Parameter je FITC/PE Antikörperkombination. Aus den 4 Datenbanken mit ihren 136 Datenbankkolonnen wurden vom Klassifizierungsprogramm die 8 in Tab.1 für die durchflußzytometrischen Diagnosen entscheidenden Parameter herausgefiltert. Die Einzelwerte der FI und der relativen Zellzahlen sind in Tab.2 für beide Belastungen gemeinsam dargestellt, da signifikante Mittelwertunterschiede zwischen den beiden Belastungen nicht bestanden. Bei den Zellzahlen ergaben sich bei allen, bis auf die CD4-CD45RO⁻ Zellen, signifikante Unterschiede im Zeitverlauf. Bei den FI ergab sich lediglich für CD8-PE eine

	% der Lymphozyten				FITC-Fluoreszenzintensität *				PE-Fluoreszenzintensität *			
	Vor	10. min	Ende	+ 60 min	Vor	10. min	Ende	+ 60 min	Vor	10. min	Ende	+ 60 min
CD16 ⁺	17,2 (12,6)	32,0+ (12,0)	33,0+ (12,3)	11,6 (12,6)	1,80 (0,70)	1,80 (0,29)	1,75 (0,35)	1,55 (0,50)	4,11 (2,20)	4,53 (2,25)	4,65 (2,80)	3,00 (1,89)
CD16 ⁻	73,5 (18,3)	81,4 (8,1)	78,3 (11,0)	67,5 (18,3)	1,13 (0,51)	1,10 (0,37)	1,37 (0,34)	0,90 (0,38)	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)
CD16 ⁺ CD11 a ⁺	14,0 (8,9)	29,6+ (11,7)	28,8+ (13,1)	7,2+ (5,3)	1,77 (0,70)	1,77 (0,30)	1,72 (0,59)	1,49 (0,50)	4,19 (2,39)	4,87 (2,57)	4,67 (2,81)	3,27 (2,19)
CD4 ⁻ CD45RO ⁻	44,6 (10,8)	57,8+ (7,9)	56,5+ (14,7)	40,4 (9,8)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,03 (0,01)	0,03 (0,01)	0,03 (0,01)	0,03 (0,01)
CD8 ⁺ CD45RO ⁻	21,9 (7,4)	31,5+ (7,4)	30,4+ (8,7)	17,0+ (7,8)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	10,26 (3,20)	7,00+ (3,21)	6,74+ (3,00)	11,00 (3,20)
CD8 ⁻ CD45RO ⁺	24,8 (7,1)	18,8+ (8,0)	17,9+ (7,9)	26,9 (7,0)	2,77 (1,39)	2,89 (1,30)	2,70 (1,25)	2,40 (1,20)	0,04 (0,02)	0,04 (0,02)	0,04 (0,02)	0,04 (0,02)
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	40,1 (13,1)	54,1+ (9,7)	52,4+ (12,7)	38,0 (13,6)	1,70 (0,69)	2,11 (0,77)	1,93 (0,79)	1,48 (0,60)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)	0,05 (0,01)

* Arbiträre Fluoreszenzeinheiten; +: < 0,01 im Vergleich zu „Vor“ (Wilcoxon-Test); Mittelwerte (Standardabweichungen).

Tabelle 2: Aufgeführt sind Zellzahlen in Prozent der Lymphozyten und die Fluoreszenzintensitäten (FI) für die entweder mit FITC oder PE konjugierten monoklonalen Antikörper auf der Zelloberfläche, (relatives Maß für die Rezeptordichte; n = 22). Die FITC-FI bzw. PE-FI Konjugationen entsprechen den in Abb. 1 c-f aufgeführten Doppelmarkierungen.

WISSENSCHAFT



Tabelle 3: Vergleich des tatsächlichen Belastungszeitpunktes mit der durchflußzytometrischen Klassifikation; Angaben in Prozent, 12 durchflußzytometrische Zuordnungen ergaben Doppeldiagnosen, die Liniensummen über 100 % erklären.

Belastungszeitpunkt	Durchflußzytometrische Klassifikation				
	n	Vor	10. min	Ende	+ 60 min
Vor	22	90,9	0	4,5	13,6
10. min	20	40,0	30,0	45,0	5,0
Ende	21	28,6	23,8	66,7	4,8
+ 60 min	22	36,4	4,5	4,5	59,1

signifikante Reduktion während der Belastung. Die niedrigeren FI für CD16-PE 60 min nach Belastung verfehlten das Signifikanzniveau nur knapp ($p=0,026$). Die aufgrund der Klassifikationsmasken (Tab.1) ermittelten Richtigkeiten der durchflußzytometrischen Diagnosen zeigt Tab.3 für die Einzelzeitpunkte. Differenziert man lediglich in die zwei Zustände der körperlichen Ruhe (vor und 60 min nach der Belastung) bzw. der körperlichen Arbeit (10. Belastungsminute und Ende), so ergeben sich Erkennungsrichtigkeiten von 93,2% für den Ruhezustand und 92,7% für den Belastungszustand (Tab.4). Die Erkennungsrichtigkeiten, separat bezogen auf die beiden Belastungen mit je $n=11$, betragen für die erste bzw. zweite Belastung 90,9/97,7% für den Ruhe und 97,6/95,1% für den Belastungszustand. Die zusätzliche Verwendung der Parameterkonstellation CD16-PE versus CD69-FITC (frühes Lymphozytenaktivierungsantigen) brachte keine zusätzliche Aussage.

Diskussion

Es wurde gezeigt, daß die auf den Einzelfall bezogene Differenzierung,

Tabelle 4: Vergleich des tatsächlichen Belastungszeitpunktes mit der durchflußzytometrischen Klassifikation; Angaben in Prozent, 2 durchflußzytometrische Zuordnungen ergaben Doppeldiagnosen.

Belastungszeitpunkt	Durchflußzytometr. Klassifikation	
	n	Ruhe Belastung
Ruhe	44	93,2 11,4
Belastung	41	7,3 92,7

d.h. die Erkennung von körperlichem Ruhe- und Belastungszustand durch die gewählten Immunphänotypenmessungen der Lymphozyten mit Hilfe des selbstlernenden Klassifizierungssystems möglich ist. Eine Differenzierung zwischen den einzelnen Ruhe- bzw. Belastungszeitpunkten ist dagegen im Einzelfall nicht in allen Fällen möglich (Tab. 3), obwohl bei der statistischen Auswertung der Einzelparameter beispielsweise zwischen vor und 60 min nach der Belastung im Mittelwert durchaus signifikante Unterschiede auftraten. Allerdings erlauben Mittelwertunterschiede keinerlei Einzelfallklassifizierung. Betrachtet man die die Einzelfallklassifizierung ausschlaggebenden Parameter, erkennt man die Zunahme der NK-Zellen (CD16+) als entscheidendes Faktum (Tab.1, Tab.2).

Die für die Klassifizierung ebenfalls wichtigen Zellzahländerungen der CD4+CD45RO- Zellen sind wesentlich durch die Zunahme der NK-Zellen bedingt, ebenso auch wie die der CD8+CD45RO- und der CD45RA+ CD45RO- Zellen (8). Interessant ist die Abnahme der Oberflächendichte von CD8 unter Belastung. Sie entsteht durch die NK-Zellzunahme, da 30- 50% der NK-Zellen CD8+ sind und im Gegensatz zu den CD3+ T-Zellen nur eine geringe Oberflächendichte für CD8 aufweisen. Außerdem sind NK-Zellen CD45RO- (8, eigene unveröffentlichte Befunde). Der Beitrag der CD8-CD45RO+ Zellzahlverminderung zur durchflußzytometrischen Klassifikation ist durch CD45RO+CD4+ T_{Helfer/Inducer} Zellen verursacht, da NK- Zellen nicht und nur wenige B-Zellen CD45RO+ sind (8).

Geringe Reduktionen der Oberflächenantigendichten für CD3, CD4, CD8 und

CD19 während Belastung zeigten *Shinkai et al.* (12). Bezüglich CD4 waren die Änderungen während und nach Belastung bei den eigenen Versuchen ebenfalls gering (nicht dargestellt), jedoch für CD8 aufgrund der oben beschriebenen Mobilisierung von NK-Zellen für CD8 etwas deutlicher. Diese Veränderungen im Mittelwert um etwa 33% reichen jedoch aufgrund der großen individuellen Streubreite der Meßwerte nicht zur Verbesserung der Einzelfallklassifizierung aus. Die ebenfalls beobachtete tendenzielle Verminderung des FC-Rezeptors III (CD16+; Tab.2) könnte Ausdruck der 'Negativselektion' in der Zirkulation von weniger zytotoxischen NK-Zellen in der Nachbelastungsphase sein (12).

Der Einsatz selbstlernender Klassifikationsprogramme für die durchflußzytometrische Datenauswertung stellt ein vollkommen neues Hilfsmittel dar. Der Vorteil gegenüber bisher angewandten Verfahren (1, 2, 6, 9, 10, 14) besteht vor allem in der manuell nicht zu bewältigenden Bewertung einer weit höheren Anzahl zellulärer Meßeigenschaften (34 Meßwerte anstatt der bisher 6) sowie in der selbstoptimierten Auswahl der Zelleigenschaften, deren Veränderungen am besten mit den klinischen Veränderungen einhergehen (15). Die hier durchgeführte Klassifikation zeigt, daß das Erkennen des akuten Belastungszustandes im Einzelfall am besten an der relativen Zunahme der NK-Zellen möglich ist. Die weitgehend konstanten bzw. sich nur geringfügig verändernden Antigengehalte auf den Zelloberflächen während und in der unmittelbaren Zeit nach der Belastung weisen auf die nur geringe funktionelle Beeinflussung der Immunzellen durch einmalige akute Körperarbeit hin (hier vorgestellte Ergebnisse, 15).

Chronische Körperarbeit in Form von Ausdauertraining führt zu Reduktionen der T_{Helfer/Inducer} und NK-Zellen im peripheren Blut (4, 7). Außerdem tritt ein Anstieg der Oberflächendichte des CD45RO+ Rezeptors als Ausdruck einer Regulationsänderung der T-Zellen auf (15). Letzteres erlaubte eine durchflußzytometrische Klassifizierung des Übertrainingszustandes.

Der wesentliche Vorteil dieser Klassifizierungsstrategie besteht im Aufbau von



Datenbanken und labor bzw. instrumentunabhängigen, standardisierten Klassifizierungsmasken für normale und pathologische Zustände. Bislang liegen lediglich Erfahrungen bei der Differenzierung des Myokardinfarkt-risikos bei KHK- und Diabetespatienten, bei der Sepsisdiagnostik und beim Übertraining vor. Als weitere Anwendungsbereiche bieten sich nahezu alle mit immunologischen Veränderungen einhergehenden Erkrankungen an, in-zwischen liegen auch Erfahrungen mit HIV-Patienten bei der Zuordnung in Erkrankungsstadien vor. In der Sportmedizin werden sich beispielsweise bei der Frage nach den Trainings- und Wettkampfphasen mit relevanter immunologischer Beeinflussung neue Beurteilungsmöglichkeiten ergeben.

Literatur

- (1) Bagwell C.W.: New horizons: Expert systems for flow cytometry. *Cytometry* 9 suppl.3 (1988) 89-93.
- (2) Demers S., Kim J., Legendre P.: Analyzing multivariate flow cytometric data in aquatic sciences. *Cytometry* 13 (1992) 291-298.
- (3) Gabriel H., Urhausen A., Kindermann W.: Circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion. *Eur. J. Appl. Physiol.* 63 (1991) 449-457.
- (4) Gabriel H., Schwarz L., Urhausen A., Kindermann W.: Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Sportlerinnen und Sportlern unter Ruhebedingungen. *Dtsch. Z. Sportmed.* 43 (1992) 196-210.
- (5) Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I., Loken M.R., Phillips J.H.: The relationship of CD16 (Leu11) and Leu19 (NKH1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 136 (1986) 4480-4486, 1986.
- (6) Leary J.F., McLaughlin S.R., Corio M.A., Remle L., Gram J.G., Burde S.: High speed principal component/biplot sorting of rare cells. *Cytometry* 11 suppl. 4 (1990) 19.
- (7) Liesen H., Riedel H., Order U., Mücke S., Widenmayer W.: Zelluläre Immunität bei Hochleistungssportlern. *Dtsch. Z. Sportmed.* 40 (1989), Sonderheft 'Sport und Immunsystem', 4-14
- (8) Prince H.E., York J., Jensen E.R.: Phenotypic comparison of the three populations of human lymphocytes defined by CD45RO and CD45RA expression. *Cell. Immunol.* 145 (1992) 254-262.
- (9) Redelman D.: Neural network analysis of flow cytometric data. *Cytometry* 12 suppl.5 (1991) 63.
- (10) Robinson J.P., Ragheb K., Lawler G., Kelley S., Durack G.: Rapid multivariate analysis and display of crossreacting antibodies on human leukocytes. *Cytometry* 13 (1992) 75-82.
- (11) Schmitz G., Rothe G., Nebe C.T.: Methodenprotokolle bei der Durchflußzytometrie, Schattauer München (1993) im Druck.
- (12) Shinkai S., Shore S., Shek P.N., Shephard R.J.: Acute exercise and immune function: Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. *Int. J. Sports Med.* 13 (1992) 452-461.
- (13) Stegmann H., Kindermann W., Schnabel A.: Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int. J. Sports Med.* 2 (1981) 160-165.
- (14) Valet G.: Graphical representation of three parameter flow cytometer histograms by a newly developed FORTRAN IV computer program. In: *Flow Cytometry IV*. Eds.: O.D. Laerum, J.F. Lindmo, E. Thorud, Universitetsforlaget, Oslo (1990) 125-129.
- (15) 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 CLASSIF1 program system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1993) 677:233-251.

Dieses Projekt wurde mit Forschungsmitteln des Bundesinstitutes für Sportwissenschaft unter den Geschäftszeichen VF 0407/01/10/91, VF 0407/01/08/92 und VF 0407/01/18/93 gefördert.

Danksagungen:

Herr Benno Weiler und Frau Heidemarie Haas leisteten exzellente technische Assistenz.

Anschrift für die Autoren:

Dr. med. Holger Gabriel
Institut für Sport und Leistungsmedizin
Universität des Saarlandes
Im Stadtwald
66041 Saarbrücken

NaturMed aktuell

T.C.M.

PRJ bringt frische Zellenergie

PRJ verkürzt die Erholungszeit

PRJ stärkt das Immunsystem

Peking Royal Jelly
... die Aufbau-KUR



Peking Royal Jelly® Wirksame Bestandteile: Eine Trinkampulle enthält: Gelée Royale 250 mg, Codonopsis Pilosulae Wurzel Extrakt entsprechend Codonopsis Pilosulae Wurzel 60 mg, Lycii Früchte Extrakt entsprechend Lycii Früchten 40 mg, mit Honig in wässriger Lösung. Enthält 2 Vol.-% Alkohol. **Anwendungsgebiete:** Zur Stärkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, bei allgemeiner Körperschwäche, während der Rekonvaleszenz zur Revitalisierung. **Gegenanzeigen, Nebenwirkungen, Wechselwirkungen mit anderen Mitteln:** Keine bekannt. (Stand 2/92)

Peking Royal Jelly® Deutschland · BOELL® HandelsKontor
Am Kirchberg 3 · 86666 Burgheim · Tel. (08432) 1246 · Fax 1248

10 Trinkamp. à 10 ml (10-Tage-Packg.) PZN 3715679 · DM 50,34 unverbindliche
30 Trinkamp. à 10 ml (30-Tage-Packg.) PZN 3715685 · DM 150,31 Preisempfehlung