

Inhalt

Einführung des Herausgebers — V

Autorenverzeichnis — XVII

Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen — XXI

Anne Gompf

1 Grundlagen der Durchflusszytometrie — 1

- 1.1 Einleitung — 1
- 1.2 Durchflusszytometer — 1
 - 1.2.1 Das Flüssigkeitssystem — 1
 - 1.2.2 Optik — 4
 - 1.2.3 Elektronik — 8
 - 1.2.4 Computer — 9
- 1.3 Fluoreszenz und Anwendungsoptik — 14
- 1.4 Zusammenfassung — 26
- 1.5 Literatur — 27

Alexandra Dorn-Beineke und Ulrich Sack

2 Qualitätskontrolle und Validierung in der diagnostischen Durchflusszytometrie — 29

- 2.1 Die Probe im hämatologischen und immunologischen Speziallabor — 29
- 2.2 Angewandte Qualitätssicherung im durchflusszytometrischen Labor — 30
 - 2.2.1 Regelwerke für diagnostische Laboratorien — 31
 - 2.2.2 Anforderungen an die medizinische Diagnostik — 32
- 2.3 Akkreditierung im durchflusszytometrischen Labor – die DIN EN ISO 15189 und ihre Anforderungen — 37
- 2.4 Faktoren mit Einfluss auf durchflusszytometrische Analysen — 38
- 2.5 Standardisierung und Harmonisierung in der Durchflusszytometrie — 41
- 2.6 Verifizierung und Validierung im durchflusszytometrischen Labor — 42
- 2.7 Schlüsselfaktoren für valide Durchflusszytometriedaten — 44
- 2.8 Der analytische Prozess im durchflusszytometrischen Labor — 44
- 2.9 Externe Qualitätskontrollen und Laborvergleiche — 45
- 2.10 Häufige Qualitätsprobleme — 47
- 2.11 Literatur — 50

Oliver Frey

- 3 Testkits und Fertigreagenzien in der Durchflusszytometrie — 52**
 - 3.1 Einführung — 52
 - 3.2 CE-IVD-markierte Test-Kits — 53
 - 3.2.1 Quantifizierung von Lymphozyten-Subpopulationen — 53
 - 3.2.2 Quantifizierung von Stammzellen — 55
 - 3.2.3 Weitere Testsysteme — 56
 - 3.3 Sonstige Kits und Materialien — 60
 - 3.4 Etablierung eigener Assays aus Einzelreagenzien — 62
 - 3.4.1 Auswahl der optimalen Reagenzien — 62
 - 3.4.2 Geräteoptimierung — 64
 - 3.4.3 Praktisches Vorgehen — 66
 - 3.4.4 Titration und Vitalitätsfarbstoffe — 67
 - 3.4.5 Kontrollen — 69
 - 3.5 Literatur — 70

Mariam Klouche und Ulrich Sack

- 4 Leukozytenfunktionstests — 73**
 - 4.1 Read-out-Parameter — 73
 - 4.2 Analysemethoden — 75
 - 4.3 Zellpopulationen — 75
 - 4.3.1 T-Zellen — 75
 - 4.3.2 Zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen — 75
 - 4.3.3 B-Zellen — 76
 - 4.3.4 Basophile — 76
 - 4.3.5 Phagozyten — 76
 - 4.3.6 Zytometrischer Nachweis löslicher Faktoren — 77
 - 4.4 Applikationen — 77
 - 4.4.1 Immundefektscreening — 78
 - 4.4.2 Wirksamkeit immunmodulatorischer Therapien — 78
 - 4.4.3 Nachweis von immuntoxischen Eigenschaften — 78
 - 4.4.4 Wirksamkeit und Verträglichkeit zellulärer Therapien — 78
 - 4.4.5 Lymphocyte Crossmatching — 78
 - 4.5 Routineeinsatz von Lymphozytenfunktionstests — 79
 - 4.6 Literatur — 79

Alexander Scheffold, Petra Bacher und Florian Kern

- 5 Durchflusszytometrische Analysen zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen — 82**
 - 5.1 Zusammenfassung — 82
 - 5.2 Einführung/Hintergrund — 83
 - 5.2.1 Die Bedeutung der antigenspezifischen T-Zellen — 83
 - 5.3 Literatur — 95

Bernd Giebel und Clemens Helmbrecht

6	Mikrovesikel, Exosomen und andere extrazelluläre Vesikel — 100
6.1	Einleitung — 100
6.1.1	Definition — 100
6.1.2	Funktion — 102
6.2	Aufreinigung extrazellulärer Vesikel (EV) — 103
6.3	Analysemethoden Extrazellulärer Vesikel — 105
6.3.1	Elektronenmikroskopie — 105
6.3.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS) — 106
6.3.3	Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) — 108
6.3.4	Resistive pulse sensing (RPS) — 111
6.3.5	Durchflusszytometrie — 112
6.3.6	Weitere Techniken — 114
6.4	Resümee — 117
6.5	Literatur — 119

Carl Thomas Nebe

7	Hämatologische Diagnostik — 125
7.1	Einführung — 125
7.2	Die Zellsysteme der Hämatopoese — 131
7.2.1	Erythrozyten — 135
7.2.2	Thrombozyten — 166
7.3	Leukozyten — 180
7.3.1	Vorläuferzellen — 181
7.3.2	Neutrophile Granulozyten — 184
7.3.3	Eosinophile Granulozyten — 186
7.3.4	Basophile Granulozyten — 187
7.3.5	Lymphozyten — 188
7.3.6	Lymphomdiagnostik — 193
7.3.7	Diagnostik akuter Leukämien — 212
7.4	Präanalytik — 218
7.4.1	Antikoagulantien — 218
7.4.2	Entnahmezeitpunkt und Infusionssysteme — 219
7.4.3	Aufmischen der Blutprobe — 220
7.4.4	Probentransport — 220
7.5	Bestimmungsmethoden — 221
7.5.1	Hb-Bestimmung — 221
7.5.2	Zellzählsysteme für das kleine Blutbild — 221
7.5.3	Maschinelles Differentialblutbild — 222
7.5.4	Mikroskopische Betrachtung der Blutzellen — 223
7.5.5	Knochenmarkzytologie und -histologie — 229
7.5.6	Punktatzytologie — 235

7.5.7	Immunphänotypisierung und Durchflusszytometrie —	236
7.5.8	Zytogenetik —	259
7.5.9	Molekularbiologische Diagnostik —	260
7.5.10	Messgrößen im Serum —	265
7.5.11	Synoptische Betrachtung der Blutzell Diagnostik —	266
7.6	Literatur —	271

Harald Renz

8	Immundefizienz und Immunmonitoring —	279
	Zusammenfassung —	279
8.1	Immundefekte —	279
8.2	T-Zell-Defekte —	281
8.3	B-Zell-Defekte —	283
8.4	Immunmonitoring bei chronischen Entzündungen —	285
8.4.1	Allergien und Asthma —	285
8.5	Neue Biomarker für allergisches und nicht-allergisches Asthma —	286
8.6	Periostin als neuer Biomarker? —	288
8.7	Literatur —	289

Ursula Anderer und Vuc Savkovic

9	Zelltherapien in der Regenerativen Medizin —	291
9.1	Grundlegendes und Anwendungsfelder —	291
9.2	Knorpelgewebe – ein Spezialfall in der zellbasierten Regeneration von Gewebeschäden —	293
9.3	Strategien zellbasierter Verfahrensmethoden – exemplarisch dargestellt an Möglichkeiten zur Regeneration von Gelenkknorpel —	294
9.4	Mesenchymale Stammzellen in der Regenerativen Medizin, eine Erweiterung des Therapiepotentials – mit besonderer Berücksichtigung der Regeneration von Knorpel und Knochen —	300
9.4.1	hMSCs – Parakrine Wirkung und trophische Effekte —	302
9.4.2	hMSCs – Differenzierung zu spezialisierten Zelltypen —	303
9.4.3	MSCs – Möglichkeiten für Zelltherapien bei Knochenerkrankungen —	305
9.5	Biomaterialien – Strukturgeber und physiologischer Impulsgeber —	308
9.6	Regenerative Zelltherapien für die Haut —	309
9.6.1	Stammzell-Nischen der Haut mit therapeutischem Potenzial —	310
9.6.2	Mesenchymale Stammzellen in der Hautregeneration —	312
9.6.3	Therapeutische Strategien für die Hautregeneration —	313
9.6.4	Herausforderungen und Perspektiven —	319

- 9.7 Regenerative Zelltherapien für das Nervensystem — 320
- 9.7.1 Periphere Nervenschäden — 320
- 9.7.2 Rückenmark — 322
- 9.7.3 Schlaganfall (Hirnfarkt) — 324
- 9.7.4 Parkinsonerkrankung — 325
- 9.7.5 Multiple Sklerose — 326
- 9.8 Schlussbemerkung — 326
- 9.9 Literatur — 327

Ronald Weiß

- 10 **Zelluläre Immuntherapien bei Tumoren — 342**
- 10.1 Zelluläre Tumorthherapie mit Dendritischen Zellen (DCs) — 343
- 10.2 Zelluläre Tumorthherapie mit T-Lymphozyten — 347
- 10.3 Zelluläre Tumorthherapie mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) — 350
- 10.4 Zelluläre Tumorthherapie mit Zytokin induzierten Killerzellen (ZIK-Zellen) — 352
- 10.5 Schlussfolgerung — 352
- 10.6 Literatur — 353

Doris Schmid und Eva Rohde

- 11 **Zelluläre Analyse mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen — 356**
- 11.1 Einleitung — 356
- 11.2 MSC-Kriterien und Terminologie — 356
- 11.3 Gewebeherkunft von MSC — 357
- 11.4 Die durchflusszytometrische Analyse von MSC — 358
- 11.4.1 Durchflusszytometrische Analysen im Vergleich zur Mikroskopie: Die Rolle von Zellgröße und Autofluoreszenz — 358
- 11.4.2 Phänotyp-Profil von MSC: Nachweis oder Fehlen typischer Oberflächenmoleküle — 361
- 11.4.3 Artefakte durch *In-vitro*-MSC-Expansion — 364
- 11.5 Konzepte für die klinische Anwendung von MSC — 364
- 11.6 Zusammenfassung — 365
- 11.7 Literatur — 366

Matthias Schiemann, Stefan Dreher, Christian Stemberger, Martin Hildebrandt und Dirk H. Busch

- 12 **Multimere und reversible Reagenzien — 370**
- Zusammenfassung — 370
- 12.1 Einleitung — 370
- 12.2 Hintergrund — 371
- 12.3 Detektion von antigenspezifischen T-Zellen mit MHC-Multimeren — 372

- 12.4 Färbung und Analyse mit MHC-Multimeren — **375**
- 12.5 Reversible Multimer-Reagenzien — **376**
- 12.5.1 MHC-Streptamere — **376**
- 12.5.2 Fab-Streptamere — **377**
- 12.5.3 T-CATCH-Technologie — **378**
- 12.6 Klinische Anwendungen in der Zelltherapie — **379**
- 12.7 Internetadressen und weiterführende Literatur — **380**

Krasimira Aleksandrova, Stephan Klöß, Lubomir Arseniev und Ulrike Köhl

- 13 Quantifizierung von Leukozyten-Untergruppen in manipulierten Stammzell- und Immunzellpräparaten — 384**
- 13.1 Immunomagnetische Aufreinigung von Stammzellpräparaten — **384**
- 13.2 Quantitative Bestimmung von Immunzellen in manipulierten Zellpräparaten — **385**
- 13.2.1 Bestimmung von T-Lymphozyten — **391**
- 13.2.2 Bestimmung von B-Lymphozyten — **392**
- 13.2.3 Bestimmung von Monozyten — **393**
- 13.2.4 Bestimmung CD34-positiver oder CD133-positiver Stammzellen — **393**
- 13.2.5 Bestimmung von TCR α / β -positiven und TCR γ / δ -positiven T-Zellen — **395**
- 13.3 Vitalitätsbestimmung — **397**
- 13.4 Anzahl der zu akquirierende Ereignisse und Bestimmung der Zellzahl — **398**
- 13.5 Qualifizierung des Durchflusszytometers und der Methodenvalidierung — **399**
- 13.6 Literatur — **400**

Marcus Odendahl, Sarah Matko, Julia Riewaldt und Torsten Tonn

- 14 Qualitätskontrolle von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen — 403**
- 14.1 Einleitung — **403**
- 14.2 Präanalytik — **404**
- 14.2.1 Blutentnahme und Lagerung — **404**
- 14.2.2 Probenvorbereitung — **404**
- 14.2.3 Probenverdünnung — **405**
- 14.2.4 Klassifizierung anti-CD34 spezifischer monoklonalen Antikörper — **405**
- 14.3 Analytik — **406**
- 14.3.1 Durchflusszytometrische Analyse — **406**
- 14.3.2 Berechnung der Zellzahl CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen — **414**

14.4	Qualitätssicherung — 415
14.4.1	Interne/Externe Qualitätskontrollen — 415
14.4.2	Gebrauch von Isotyp-/Isoklonischen Kontrollen — 415
14.4.3	Qualitätskontrollen Durchflusszytometer — 416
14.5	Phänotypisierung CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen — 416
14.5.1	Zusammenfassung: Qualitätskontrolle CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen — 417
14.5.2	Zusammenfassung: Analytik, Färbeprotokolle und Qualitätssicherung — 417
14.6	Literatur — 419
15	Sach-Register — 422