

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	Entnahmepunkt 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	Punktzytologie — 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 Blutzelldiagnostik — 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 (Hirninfarkt) — 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 Tumortherapie mit Dendritischen Zellen (DCs) — 343
10.2	Zelluläre Tumortherapie mit T-Lymphozyten — 347
10.3	Zelluläre Tumortherapie mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) — 350
10.4	Zelluläre Tumortherapie 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 <i>In-vitro</i> -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