



(10) **DE 10 2013 216 938 B3** 2015.01.08

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2013 216 938.8**

(22) Anmeldetag: **26.08.2013**

(43) Offenlegungstag: –

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **08.01.2015**

(51) Int Cl.: **G01N 33/48 (2006.01)**
G02B 21/00 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

**Leica Microsystems CMS GmbH, 35578 Wetzlar,
DE**

(74) Vertreter:

**Kudlek & Grunert Patentanwälte, 80331 München,
DE**

(72) Erfinder:

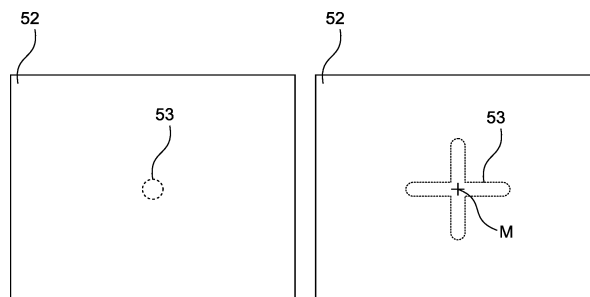
**Schlaudraff, Falk, Dr., 35510 Butzbach, DE; Tang,
Qing, The Woodlands, Tex., US**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE 10 2007 016 301	A1
DE 10 2007 046 267	A1
WO 99/ 28 725	A1
WO 01/ 73 398	A1
WO 2012/ 126 961	A1

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung eines Lasermikrodissektionssystems und Lasermikrodissektionssystem**

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung in einer Auflichteinrichtung eines Mikroskops eines Lasermikrodissektionssystems, durch die ein mittels einer Lasereinheit des Lasermikrodissektionssystems erzeugter und mittels der Auflichteinrichtung durch ein Mikroskopobjektiv des Mikroskops geführter Laserstrahl auf eine durch Ansteuersignale an die Laserablenkeinrichtung definierte Position in einer Objektebene des Mikroskopobjektivs gelenkt wird, vorgeschlagen, wobei das Lasermikrodissektionssystem ferner eine digitale Bilderfassungseinheit mit einem Bildauswertungsmodul aufweist. Das Verfahren umfasst, ein Kalibrationsobjekt (52) in die Objektebene des Mikroskopobjektivs einzubringen, die Laserablenkeinrichtung mit ersten Ansteuersignalen, die auf Grundlage von Positionsvorgabewerten und unter Verwendung von ersten Kalibrationswerten berechnet werden, anzusteuern, und mittels des Laserstrahls zumindest eine Kalibrationsmarkierung (53) auf dem Kalibrationsobjekt (52) zu erzeugen, wobei das Kalibrationsobjekt (52) anschließend mittels der digitalen Bilderfassungseinheit erfasst wird, mittels des Bildauswertungsmoduls Positionswerte der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung ermittelt werden, und auf Grundlage einer Beziehung der Positionsvorgabewerte und der Positionswerte zweite Kalibrationswerte bestimmt werden. Ein entsprechendes Lasermikrodissektionssystem ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung eines Lasermikrodissektionssystems und ein Lasermikrodissektionssystem gemäß den Oberbegriffen der unabhängigen Patentansprüche.

Stand der Technik

[0002] Verfahren zur Bearbeitung biologischer Proben durch Lasermikrodissektion existieren bereits seit Mitte der 1970er Jahre (siehe z.B. Isenberg, G. et al.: Cell surgery by laser micro-dissection: a preparative method. Journal of Microscopy, Band 107, 1976, Seiten 19–24) und wurden seitdem kontinuierlich weiterentwickelt.

[0003] Bei der Lasermikrodissektion können Zellen, Geweberegionen usw. aus einem Objekt („Probe“, „Präparat“) isoliert und als sogenannte Dissektate gewonnen werden. Ein besonderer Vorteil der Lasermikrodissektion ist der kurze Kontakt des Objekts mit dem Laserstrahl, durch den dieses kaum verändert wird. Die spezifische Gewinnung der Dissektate kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (siehe z.B. Bancroft, J. D. und Gamble, M.: Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier Science, 2008, Seite 575, Kapitel „Laser Microdissection“).

[0004] Beispielsweise kann in bekannten Verfahren aus einem Objekt mittels eines Infrarot- oder Ultraviolett-Laserstrahls ein Dissektat isoliert werden, das unter dem Einfluss der Schwerkraft in einen geeigneten Dissektatauffangbehälter fällt. Das Dissektat kann dabei aus dem Objekt auch zusammen mit einer anhaftenden Membran ausgeschnitten werden. Bei der sogenannten Laser Capture Microdissection wird hingegen eine thermoplastische Membran mittels eines entsprechenden Laserstrahls erwärmt. Dabei verschmilzt die Membran mit dem gewünschten Bereich des Objekts und kann in einem darauffolgenden Schritt durch Reißen entfernt werden. Eine weitere Alternative besteht darin, das Dissektat mittels des Laserstrahls an einen Deckel eines Dissektatauffangbehälters anzuheften. Bei bekannten inversen Mikroskopsystemen zur Lasermikrodissektion können nach oben katapultierte Dissektate auch an den Boden eines Dissektatauffangbehälters, der mit einer adhäsiven Beschichtung versehen ist, angeheftet werden.

[0005] Die vorliegende Erfindung kommt hierbei insbesondere bei den Verfahren zum Einsatz, bei denen ein Dissektat aus einem Objekt herausgetrennt und in einem darunter angeordneten Dissektatauffangbehälter aufgefangen wird. Insbesondere ist die Erfindung für kontaktfreie Auffangsysteme für Dissektate geeignet.

[0006] Bekannte Mikroskopsysteme zur Lasermikrodissektion, wie sie beispielsweise aus der WO 98/14816 A1 bekannt sind, weisen eine Auflichteinrichtung auf, in deren Strahlengang ein Laserstrahl eingekoppelt wird. Der Laserstrahl wird durch das jeweils verwendete Mikroskopobjektiv auf das Objekt fokussiert, das auf einem motorisch-automatisch verfahrbaren Mikroskoptisch aufliegt. Eine Schnittlinie wird dadurch erzeugt, dass der Mikroskoptisch beim Schneiden verfahren wird, um das Objekt relativ zu dem feststehenden Laserstrahl zu bewegen. Dies hat jedoch unter anderem den Nachteil, dass das Objekt während des Erzeugens der Schnittlinie nicht ohne weiteres betrachtet werden kann, da dieses sich im Gesichtsfeld bewegt und dessen Bild ggf. verschwommen erscheint.

[0007] Vorteilhafter sind daher Lasermikrodissektionssysteme, die Laserablenk- bzw. Laserscaneinrichtungen aufweisen, die dazu eingerichtet sind, den Laserstrahl bzw. dessen Auftreffpunkt über ein feststehendes Objekt zu lenken. Derartige Lasermikrodissektionssysteme, die auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung besondere Vorteile bieten, werden unten im Detail erläutert. Ein besonders vorteilhaftes Lasermikrodissektionssystem, das eine Laserablenkeinrichtung mit gegeneinander verstellbaren Glaskeilen im Laserstrahlengang aufweist, ist beispielsweise in der EP 1 276 586 B1 beschrieben.

[0008] In beiden Fällen, also sowohl in Lasermikrodissektionssystemen, in denen der Mikroskoptisch verfahren wird, als auch in Lasermikrodissektionssystemen, die eine Laserablenkeinrichtung aufweisen, wird in der Regel mit gepulsten Lasern gearbeitet, wobei durch jeden Laserpuls ein Loch bzw. eine Vertiefung in dem Objekt erzeugt wird. Eine Schnittlinie entsteht durch eine Aneinanderreihung derartiger Löcher bzw. Vertiefungen, gegebenenfalls mit Überlappung.

[0009] Die Lasermikrodissektion kann zur Gewinnung von Einzelzellen oder definierten Gewebebereichen verwendet werden, die anschließend beispielsweise unterschiedlichen diagnostischen Analyseverfahren unterworfen werden. In der Onkologie kann die Lasermikrodissektion beispielsweise dafür eingesetzt werden, um spezifisch Tumorzellen aus einem mikroskopischen Schnitt zu isolieren und auf spezifische Metaboliten oder Proteine zu untersuchen. Hierbei muss sichergestellt sein, dass kein oder möglichst wenig Material aus unerwünschten und ggf. störenden Bereichen des untersuchten Objekts in ein Untersuchungsgefäß gelangt und damit eine entsprechende Analyse stört. Dies gilt auch für Lasermikrodissektionssysteme, die für molekularbiologische Untersuchungen verwendet werden, beispielsweise für bekannte COMET-Assays.

[0010] Entscheidend für erfolgreiche und kontaminationsfreie Lasermikrodissektionsexperimente ist daher die Genauigkeit des verwendeten Lasers. Je genauer der Laser beispielsweise anhand vorgegebener Schnittlinien schneiden oder punktgenau über einen interessierenden Bereich geführt werden kann, desto sauberer kann entsprechendes Material gewonnen werden.

[0011] Der Laser eines Lasermikrodissektionssystems bzw. eine entsprechende Laserablenkeinrichtung muss daher möglichst genau kalibriert werden, damit Positionsvorgabewerte, die Sollpositionen für die Auftreffpunkte des Lasers auf der Probe angeben, und die sich ergebenden Positionswerte, also die tatsächlichen Auftreffpunkte, möglichst wenig voneinander abweichen.

[0012] Aus der WO 01/73398 A1 ist ein Verfahren zum Kalibrieren eines Lasermikrodissektionssystems bekannt. Das Verfahren hat das Ziel, eine Bildschirmene und eine Trägertischebene zur Deckung zu bringen, so dass eine Übereinstimmung des auf dem Bildschirm dargestellten Videobilds mit der realen Trägertischposition hergestellt werden kann. Dabei werden spezielle Positionen definiert und abgespeichert, die insbesondere auf die Lage des Laserstrahls bezogen sind.

[0013] Die WO 99/28725 A1 und die DE 10 2007 046 267 A1 betreffen die Mikrodissektion mit mechanischen Werkzeugen. Diese sind während des gesamten Dissektiervorgangs sichtbar. Die WO 99/28725 A1 schlägt dabei vor, eine Ausgangsposition und eine Bewegung eines ersten Mikrodissektionswerkzeugs zu erfassen. Anschließend wird eine Ausgangsposition eines zweiten Mikrodissektionswerkzeugs erfasst und ein Unterschied zu der Ausgangsposition des ersten Mikrodissektionswerkzeugs ermittelt. Das zweite Mikrodissektionswerkzeug wird zunächst im gleichen Umfang bewegt wie das erste Mikrodissektionswerkzeug und danach um den ermittelten Abstand der Ausgangspositionen des ersten und zweiten Mikrodissektionswerkzeugs korrigiert. In der DE 10 2007 046 267 A1 wird ein Mikrodissektionswerkzeug über eine Zielposition verfahren. Anschließend wird die vertikale Distanz zwischen dem Mikrodissektionswerkzeug und der Oberfläche des Objekts ermittelt und das Mikrodissektionswerkzeug entsprechend abgesenkt.

[0014] Gemäß der DE 10 2007 016 301 A1 werden in einem Lasermikrodissektionssystem Probeschnittlinien erzeugt und diese erfasst. Auf dieser Grundlage können Laserparameter angepasst werden. Bei den Laserparametern handelt es sich beispielsweise um Laserenergie und Laserfokus.

[0015] Die WO2012/126961 A1 offenbart ein Verfahren zur Lasermikrodissektion, umfassend das Ein-

stellen mindestens eines ersten Systemparameters eines Lasermikrodissektionssystems und das automatische Einstellen mindestens eines zweiten Systemparameters des Lasermikrodissektionssystems in Abhängigkeit von dem mindestens einen ersten Systemparameter derart, dass ein gewünschter Wert eines eine Schnittlinie des Lasermikrodissektionssystems beschreibenden Schnittlinienparameters vorliegt, und ein entsprechendes Lasermikrodissektionssystem.

[0016] Gängige Kalibrationsverfahren sind jedoch häufig nicht ausreichend zuverlässig bzw. exakt und/oder für einen Benutzer sehr aufwendig durchzuführen.

Offenbarung der Erfindung

[0017] Vor diesem Hintergrund schlägt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung eines Lasermikrodissektionssystems und ein Lasermikrodissektionssystem mit den Merkmalen der unabhängigen Patentansprüche vor. Bevorzugte Ausgestaltungen sind Gegenstand der abhängigen Patentansprüche sowie der nachfolgenden Beschreibung.

Vorteile der Erfindung

[0018] Die Erfindung geht von einem an sich bekannten Verfahren zur Kalibrierung einer in einer Auflichteinrichtung eines Mikroskops eines Lasermikrodissektionssystems angeordneten Laserablenkeinrichtung aus. Mittels der Laserablenkeinrichtung wird ein mittels einer Lasereinheit des Lasermikrodissektionssystems erzeugter und mittels der Auflichteinrichtung durch ein Mikroskopobjektiv des Mikroskops geführter Laserstrahl auf eine mittels Ansteuersignalen an die Laserablenkeinrichtung definierte Position in einer Objektebene des Mikroskopobjektivs gelenkt. Ein entsprechendes Lasermikrodissektionssystem weist ferner eine digitale Bilderfassungseinheit mit einem Bildauswertungsmodul auf.

[0019] Erfindungsgemäß ist vorgesehen, ein Kalibrationsobjekt in die Objektebene des Mikroskopobjektivs einzubringen. Anschließend wird die Laserablenkeinrichtung mit ersten, auf Grundlage von Positionsvorgabewerten unter Verwendung von ersten Kalibrationswerten berechneten Ansteuersignalen angesteuert. Durch Aktivieren des Laserstrahls wird bei oder jeweils nach der Ansteuerung mit den Ansteuersignalen, die insbesondere auch zu Signalfolgen zusammengefasst werden können, zumindest eine Kalibrationsmarkierung auf dem Kalibrationsobjekt erzeugt. Das Kalibrationsobjekt wird anschließend mittels der digitalen Bilderfassungseinheit erfasst und es werden mittels des Bildauswertungsmoduls Positionswerte der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung ermittelt. Auf Grundlage einer Bezie-

hung der Positionsvorgabewerte und der Positionswerte zueinander werden zweite Kalibrationswerte bestimmt. Die zweiten Kalibrationswerte werden zur Berechnung von Ansteuersignalen für die Laserablenkeinrichtung auf Grundlage von Positionsvorgabewerten in einem Nachkalibrationsbetrieb des Lasermikrodissektionssystems verwendet.

[0020] Positionsvorgabewerte gibt ein Benutzer an, beispielsweise mittels einer Computermaus oder einer anderen geeigneten Eingabeeinrichtung auf einem Computerbildschirm. Es handelt sich i.d.R. um Positionswerte, die Positionen angeben, an denen der Laserstrahl bzw. ein durch ein Mikroskopobjektiv erzeugter Fokuspunkt des Laserstrahls auf einem Objekt auftreffen soll. Aus diesen Positionsvorgabewerten werden auch in herkömmlichen Lasermikrodissektionssystemen die Ansteuersignale für die Laserablenkeinrichtung berechnet. Die Laserablenkeinrichtung wird mit entsprechenden Ansteuersignalen beaufschlagt.

[0021] Unter Ansteuersignalen werden hier sämtliche Signale verstanden, die eine Ablenkung eines Laserstrahls mittels der erläuterten Laserablenkeinrichtung in beliebigen Richtungen gegenüber einer Achse des Mikroskopobjektivs und damit auch in der Objektebene, bzw. auf diese bezogen, ermöglichen. Bewegungsumfang und Bewegungsgeschwindigkeit sind hier ggf. durch die technischen Grenzen eines entsprechenden Lasermikrodissektionssystems festgelegt. Ansteuersignale können beispielsweise numerische Ansteuerwerte für eine Steuereinheit, die der Laserablenkeinrichtung zugeordnet ist, und/oder analoge oder digitale Signale für die Aktoren einer entsprechenden Laserablenkeinrichtung, z.B. Schritt- oder Piezomotoren einer Keilplattenanordnung, umfassen.

[0022] Positionswerte geben die tatsächlichen Auftreffpunkte des Lasers an, die sich aus einer entsprechenden Ansteuerung ergeben, und die unvermeidlich zumindest in gewissem Umfang von den Positionsvorgabewerten abweichen. Ziel einer entsprechenden Kalibration ist es dabei, Kalibrationswerte bereitzustellen, die die Abweichungen zwischen den Positionsvorgabewerten und den sich ergebenden Positionswerten weitestgehend reduzieren. Die Kalibrationswerte gehen dabei in die Berechnung der Ansteuersignale ein.

[0023] Zur Kalibration wird eine Beziehung der Positionsvorgabewerte und der Positionswerte zueinander, beispielsweise eine Differenz der Elemente von Wertetupeln, die zur Positionsbeschreibung eingesetzt werden, verwendet. Die eigentliche Kalibration umfasst, aus einer derartigen Beziehung Werte (Kalibrationswerte) für eine Transformationsvorschrift zu ermitteln, mittels derer die Positionsvorgabewerte und die Positionswerte zur Deckung gebracht werden können. Die Kalibrationswerte können

dann an beliebiger Stelle in einem Berechnungsverfahren für die Berechnung der Ansteuersignale zum Einsatz kommen. Beispielsweise können diese (entsprechend bekannter Vorsteuerungsverfahren) bereits mit den Positionsvorgabewerten verrechnet werden, so dass die Berechnung der Ansteuersignale mit entsprechend angepassten Positionsvorgabewerten erfolgt. Ein Kalibrationsverfahren kompensiert also im Rahmen des hier vorgeschlagenen Verfahrens eine Abweichung zwischen Soll- und Istwerten durch eine geeignete Rechenvorschrift. Im einfachsten Fall kann es sich hierbei lediglich um eine Addition bzw. Subtraktion von Koordinatenwerten handeln, wodurch die entsprechenden Koordinaten einheitlich verschoben werden. In Fällen, in denen mehrere Kalibrationsmarkierungen auf einem Kalibrationsobjekt angebracht werden, und in denen sich unterschiedliche Abweichungen der Kalibrationsmarkierungen bzw. der anhand dieser ermittelten Positionswerte von den Positionsvorgabewerten ergeben, ist es hingegen ggf. erforderlich, über den gesamten betrachteten Bereich eine angepasste, ggf. interpolierende Rechenvorschrift anzuwenden, die eine möglichst exakte Transformation sämtlicher Werte ermöglicht.

[0024] Die Erfindung geht also von einem an sich bekannten Lasermikrodissektionssystem aus. Ein derartiges Lasermikrodissektionssystem umfasst ein Mikroskop, das eine Auflichteinrichtung, ein Mikroskopobjektiv und eine Lasereinheit aufweist, wobei ein Strahlengang eines Laserstrahls der Lasereinheit durch die Auflichteinrichtung und durch das Mikroskopobjektiv verläuft und eine Objektebene des Mikroskopobjektivs an einem einstellbaren Schnittpunkt schneidet, der mittels Ansteuersignalen an die Laserablenkeinrichtung vorgegeben wird.

[0025] Die Erfindung kommt dabei insbesondere in sogenannten kontaktfreien Lasermikrodissektionssystemen zum Einsatz. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass ein Dissektat nicht an Membranen und dergleichen angeheftet wird, sondern aufgrund der Schwerkraft aus dem Objekt nach unten fällt. Das Objekt ist dabei in Aufrechtssystemen an der Unterseite eines Objektträgers angeordnet und wird durch den Objektträger hindurch von dessen Oberseite aus bearbeitet.

[0026] Mittels der Auflichteinrichtung wird also ein Laserstrahl aus einer Laserlichtquelle in den Beobachtungsstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Der Laserstrahl wird durch das Mikroskopobjektiv, das auch zum Betrachten des Objekts verwendet wird, auf dieses fokussiert.

[0027] Zur Vermeidung von Missverständnissen sei an dieser Stelle betont, dass das im Rahmen der Erfindung eingesetzte Lasermikrodissektionssystem mit Objekten verwendet wird, die bereits mikrosko-

pietauglich vorbereitet sind. Hierbei kann es sich beispielsweise um Dünnschnitte handeln, die mittels eines Mikrotoms aus einem größeren Gewebeblock herausgetrennt werden. Bei einem solchen Gewebeblock kann es sich beispielsweise um ein fixiertes Organ oder eine Biopsie eines entsprechenden Organs handeln. Das erfindungsgemäße Lasermikrodissektionssystem dient daher nicht zur Gewinnung von Objekten sondern zu deren Bearbeitung sowie zur Isolation von bestimmten Bereichen hiervon. Es versteht sich, dass die Erfindung auch mit Objekten, die nicht mittels eines Mikrotoms gewonnen werden, zum Einsatz kommen kann, z.B. mit Ausstrichen, Mazeraten usw.

[0028] Mikrotome werden ausschließlich bei der Vorbereitung von mikroskopischen Objekten eingesetzt. Mikrotome können hierzu auch Laser aufweisen. Die mittels eines Mikrotoms erhaltenen Schnitte werden auf einen Objektträger, wie oben erwähnt, aufgebracht, ggf. dort befestigt, angefärbt usw. Erst dann stehen diese für einen Einsatz in dem Lasermikrodissektionssystem zur Verfügung. Ein Mikrotom unterscheidet sich in seinem Betrieb unter anderem dadurch fundamental von einem Lasermikrodissektionssystem, dass dort Schnitte mit möglichst homogener Schnittstärke gewonnen werden. Mikrotome sind daher dazu ausgebildet, eine große Anzahl an identischen Schnitten mit parallelen Schnittflächen zu erzeugen, wohingegen Lasermikrodissektionssysteme zum Heraustrennen von Dissektaten nach objektabhängigen Kriterien, beispielsweise nach visuellen Kriterien, eingerichtet sind. Der Fachmann würde daher bei Mikrotomen eingesetzte technische Lösungen nicht auf Lasermikrodissektionssysteme übertragen.

[0029] Mikrotome umfassen ferner keine Mikroskope, in deren Beobachtungsstrahlengang ein Laserstrahl eingekoppelt wird. Der Laserstrahl wird daher in Mikrotomen auch niemals durch ein Mikroskopobjektiv, das auch zur Betrachtung verwendet wird, auf ein Objekt, z.B. einen Gewebeblock, fokussiert.

[0030] Der Mikroskoptisch ist in Lasermikrodissektionssystemen mit einer Laserablenkeinrichtung, wie erfindungsgemäß eingesetzt, bezüglich der x-y-Richtung (also in den Richtungen senkrecht zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs) beim Heraustrennen des Dissektats, also während des Dissektiervorgangs, gegenüber dem Mikroskopobjektiv feststehend angeordnet.

[0031] Im Gegensatz zu Lasermikrodissektionssystemen mit einem während des Dissektiervorgangs motorisch verfahrenen Mikroskoptisch (Scanningtisch), der insbesondere bei stark vergrößernden Objektiven eine hohe Positioniergenauigkeit besitzen muss, um präzise Schnitte zu ermöglichen, erweisen sich Lasermikrodissektionssysteme mit einer Lasera-

blenkeinrichtung als einfacher und kostengünstiger in der Herstellung und besitzen Präzisionsvorteile.

[0032] Die Laserablenkeinrichtung weist in einer besonders vorteilhaften Ausführungsform zwei dicke, gegen eine optische Achse geneigte und unabhängig voneinander um eine optische Achse drehbare gläserne Keilplatten („Glaskeile“) auf, welche durch ihre Keilwinkel eine Strahlablenkung erzeugen. Durch die Drehung der gläsernen Keilplatten ist der resultierende Ablenkwinkel des Laserstrahls gegenüber der optischen Achse variabel. Am Ausgang der Laserablenkeinrichtung weist der Laserstrahl durch die Dicke und die Schrägstellung der gläsernen Keilplatten einen seitlichen Strahlversatz gegenüber der optischen Achse auf und trifft für alle Ablenkwinkel die Mitte der Objektivpupille des Mikroskopobjektivs. Der Schnittpunkt des Laserstrahls mit der Objektebene ist damit einstellbar.

[0033] Eine derartige Laserablenkeinrichtung ist insbesondere deshalb vorteilhaft gegenüber anderen Laserablenkeinrichtungen wie beispielsweise Spiegelscannern, Galvanometerscannern oder Schrittmotorscannern, weil diese nicht in einer zu der Objektivpupille konjugierten Ebene angeordnet werden muss. Damit ist auch keine sogenannte Pupillenabbildung erforderlich, um zu erreichen, dass der abgelenkte Strahl die Objektivpupille trifft. Bei der Mikrodissektion mit UV-Laserlicht wäre dabei beispielsweise eine UV-taugliche Pupillenabbildung erforderlich. Weitere Vorteile einer derartigen Laserablenkeinrichtung mit Keilplatten sind beispielsweise in der EP 1 276 586 B1 genannt.

[0034] Besonders vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wenn für die Positionsvorgabewerte, die Positionswerte und/oder die Kalibrationswerte Planar- und/oder Polarkoordinaten in einer Bezugsebene verwendet werden. Als Bezugsebene kann beispielsweise die Objektebene, eine Oberfläche eines Objekts, eine Oberfläche eines Objektstischs und/oder jede andere reale oder virtuelle Ebene des Lasermikrodissektionssystems verwendet werden. Entsprechende Planar- und/oder Polarkoordinaten beziehen sich jeweils auf einen Bezugspunkt, der fest in der Bezugsebene liegt oder in einer festen räumlichen Beziehung zu dieser steht. Unter Planarkoordinaten werden hier übliche x-y-Koordinaten („Rechts- und Hochwerte“ oder entsprechende Angaben) verstanden, die sich auf den jeweiligen Bezugspunkt beziehen. Polarkoordinaten definieren hingegen eine Position im Raum (bzw. hier in der Bezugsebene) über einen Winkel und einen Abstand zu dem jeweiligen Bezugspunkt. Dem Benutzer müssen die Planar- und Polarkoordinaten nicht notwendigerweise in Rohform präsentiert werden. Entsprechende Planar- und/oder Polarkoordinaten können vielmehr auch systemintern aus Benutzervorgaben, beispielsweise aus Linien, welche der Benutzer mittels einer

Computermaus um einen interessierenden Bereich eines digital dargestellten Objekts definiert, berechnet werden.

[0035] Die vorliegende Erfindung ermöglicht aufgrund der automatischen Erkennung mittels des Bildauswertungsmoduls der digitalen Bilderfassungseinheit und der Laserstrahlsteuerung mittels der Laserablenkeinheit eine automatische Kalibrierung des Laserstrahls ohne Benutzereingriff. Fehlbedienungen durch den Benutzer werden hierdurch unmöglich, die Kalibrierung des Laserstrahls wird aufgrund der objektiven und nachvollziehbaren Mustererkennung deutlich genauer als in herkömmlichen Verfahren bzw. Lasermikrodissektionssystemen, wie sie beispielsweise der EP 1 186 879 A1 zugrunde liegen.

[0036] In herkömmlichen Verfahren bzw. Lasermikrodissektionssystemen wird der Laser bzw. dessen Laserablenkeinrichtung manuell anhand von Referenzkreuzen kalibriert. Diese manuelle Kalibrierungsmethode umfasst, wie die vorliegende Erfindung, auf einem Kalibrierobjekt Kalibrationsmarkierungen zu erzeugen. Diese müssen jedoch anschließend manuell anhand eines digitalen Bildes mithilfe einer Computermaus markiert werden. Dieses Verfahren ist nicht absolut zuverlässig und hängt vom jeweiligen Anwender, dessen Erfahrung und dem genauen Ermitteln der Kalibrationsmarkierungen ab. Hierdurch ergeben sich unter Umständen stark abweichende Kalibrierungen, die insbesondere im Hinblick auf eine Reproduzierbarkeit und Zertifizierbarkeit eines entsprechenden Verfahrens, beispielsweise in der medizinischen Diagnostik, nachteilig sind. Zudem kosten Wiederholungen der Kalibrierung aufgrund fehlerhafter Kalibrierungen unnötig Zeit.

[0037] Die vorliegende Erfindung bietet besondere Vorteile, wenn zur Kalibrierung des Laserstrahls bzw. der Laserablenkeinrichtung zumindest zwei, jedoch insbesondere drei oder mehr Kalibrierpunkte in Form von Kalibrationsmarkierungen verwendet werden. In bekannten Kalibrationsverfahren werden typischerweise vier Kalibrierkreuze zur manuellen Kalibrierung der softwaregestützten Laserstrahlsteuerung durch eine entsprechende Laserablenkeinrichtung eingesetzt. Hierzu wird zunächst ein Kreuz an einer bestimmten Position, konventionsgemäß oben rechts im Sichtfeld, durch den Laser in ein geeignetes Objekt, das im Fokus des Lasers und damit des Mikroskopobjektivs liegt, geschnitten. Dieses Kreuz wird anschließend mittels der Maus oder eines Touchscreens manuell mittig markiert. Anschließend wird ein weiteres Kreuz mithilfe des Lasers an einer weiteren Position (oben links) in das Objekt geschnitten. Wiederum wird das zweite Kreuz manuell wie das erste markiert. Die genannten Schritte werden anschließend mit vom Laser geschnittenen Kreuzen an weiteren Positionen (unten rechts und unten links), jeweils mit entsprechender manueller Markierung, wie-

derholt. Ein derartiges Verfahren wird durch die vorliegende Erfindung vereinfacht und präzisiert.

[0038] Durch die Erfindung wird es möglich, die in dem Kalibrationsobjekt erzeugten Kalibrationsmarkierungen vollautomatisch zu erkennen und einen pixelgenauen Mittelpunkt zu berechnen. Dieser kann automatisch für die Kalibrierung gespeichert und weitergegeben werden. Das erläuterte Verfahren ist durch die automatische Berechnung und Weitergabe an eine Lasermikrodissektionssteuersoftware der Laserfokus- und/oder der Laserablenkeinheit sehr genau.

[0039] Eine Vereinfachung ergibt sich, wenn der Bereich für die jeweilige Erkennung der Kalibrationsmarkierungen (z.B. von Laserkreuzen oder Laserpunkten) vorab eingegrenzt wird. Hierbei kann, wie beispielsweise auch in **Fig. 4** veranschaulicht, nur die Mitte des Sichtfelds für einen festen Laser und/oder zunächst der obere rechte, dann der obere linke, anschließend der untere rechte und der untere linke Bereich des Sichtfelds für die Erkennung verwendet werden, wenn dort jeweils zuvor eine Kalibrationsmarkierung angebracht wurde. Dies reduziert Fehler.

[0040] Wie erwähnt, ergeben sich besonders gute Kalibrationsgenauigkeiten dann, wenn zumindest drei Kalibrationsmarkierungen auf dem Kalibrationsobjekt erzeugt und Positionswerte hiervon ermittelt werden.

[0041] Die Genauigkeit der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Kalibration kann nochmals gesteigert werden, wenn ein spezielles Kalibrationsobjekt mit einer durch den Laserstrahl bearbeitbaren, auf einem Objektträger aufgetragenen Beschichtung verwendet wird. Eine derartige Beschichtung kann beispielsweise – im Gegensatz zu einem später zu bearbeitenden Objekt – derart ausgewählt werden, dass mittels des Laserstrahls eine möglichst feine Linie, die gleichzeitig einen ausreichenden Kontrast bei Bestrahlung durch den Laserstrahl bereitstellt, erzeugt werden kann. Eine derartige Beschichtung kann auch mit geeigneten foto- und/oder thermoreaktiven Pigmenten versehen sein, die aufgrund einer Bestrahlung durch den Laser ihre Farbe wechseln. Dies ermöglicht die Erzeugung von farbigen Kalibrationsmarkierungen, die in einer entsprechenden Bilderfassungseinheit bzw. einem Bilderkennungsmodul einer derartigen Bilderfassungseinheit einfach, z.B. durch farbselektive Erkennungsvorschriften, erkannt werden können.

[0042] Bei hierbei verwendbaren Kalibrationsobjekten handelt es sich beispielsweise um einfarbige Kalibrationsslides. Hierbei kann beispielsweise ein ansonsten leerer Objektträger mit einer laserbearbeitbaren Membran zum Einsatz kommen. Die Membran ist vorteilhafterweise mit einer farbigen Beschich-

tung versehen, die durch die Laserbearbeitung entfernt oder entfärbt werden kann, um mehr Kontrast zu erhalten. Im einfachsten Fall kann eine entsprechende Membran beispielsweise von einem Benutzer mit einer geeigneten Farbschicht versehen werden. Auch andere, mit einer regelmäßigen oder einfarbigen Oberfläche versehene Proben bieten sich für eine schnelle automatische Kalibrierung an, da diese für die vorteilhafterweise vorgenommene automatische Musterauswertung am leichtesten zu verarbeitende Bildinformationen liefern.

[0043] Foto- und/oder thermoreaktive Pigmente können beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe sein, die sich mit Laserstrahlung im UV- oder IR-Bereich anregen lassen. Auf diese Weise ist beispielsweise eine Laserkalibrierung in unterschiedlichen Beleuchtungsarten (Hellfeld, Phasenkontrast, Fluoreszenz, vgl. EP 1 719 998 B1) möglich. Ferner können spezielle Objekte verwendet werden, die auf der Oberfläche farblich unterschiedlich beschaffen sind und mit schwarzer oder anderer Farbe (z.B. einer durch einen Benutzer angebrachten Farbschicht) überdeckt sind. Die farbliche Auswahl kann hier beispielsweise der Ausgangsposition des Mikroskoptischs bzw. des Objektträgers auf dem Tisch angepasst werden. Hierbei können beispielsweise unterschiedliche freigelegte Farben zur Identifizierung der Reihenfolge der Kalibrationsmarkierungen bzw. deren Formen verwendet werden, was wiederum Zeit spart.

[0044] Allgemein handelt es sich bei einem Kalibrationsobjekt um ein Objekt, auf dem entsprechende Kalibrationsmarkierungen erzeugt werden können. Hierbei kann es sich um später bearbeitete Objekte handeln, wobei die Kalibrationsmarkierungen insbesondere in Bereichen erzeugt werden, die in einer anschließenden Analyse nicht benötigt werden, oder um spezielle „KalibrationsSlides“.

[0045] In einem erfindungsgemäßen Verfahren können vorteilhafterweise punktförmige, kreisförmige und/oder (faden-)kreuzförmige Kalibrationsmarkierungen auf dem Kalibrationsobjekt erzeugt werden. Die Erzeugung punktförmiger Kalibrationsmarkierungen ist insbesondere bei feststehenden Lasern möglich und vorteilhaft.

[0046] Die Formen von Kalibrationsmarkierungen, beispielsweise kreisförmige, kreuz- und/oder fadenkreuzförmige Kalibrationsmarkierungen, können in ein entsprechendes Bildauswertungsmodul „eingelernt“ werden, was eine besonders zuverlässige und schnelle Erkennung erlaubt.

[0047] Wie bereits erwähnt, umfasst das erfindungsgemäße Verfahren, die zweiten Kalibrationswerte zur Berechnung von Ansteuersignalen auf Grundlage von Positionsvorgabewerten in einem Nachkalibrationsbetrieb des Lasermikrodissektionssystems

zu verwenden. Ein „Nachkalibrationsbetrieb“ ist der reguläre Betrieb eines solchen Lasermikrodissektionssystems, beispielsweise zur routinemäßigen Untersuchung bzw. Bearbeitung biologischer bzw. medizinischer Objekte. Ein derartiger Nachkalibrationsbetrieb kann solange durchgeführt werden, bis, beispielsweise aufgrund von sich verschlechternden Qualitätskriterien, eine erneute Kalibration erforderlich wird. In diesem Fall können die „zweiten“ Kalibrationswerte durch neu ermittelte („dritte“ usw.) Kalibrationswerte ersetzt werden.

[0048] Wie bereits erläutert, kann das Ermitteln der Positionswerte der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung mittels des Bildauswertungsmoduls die Verwendung wenigstens einer digitalen Mustererkennungsvorschrift umfassen. Entsprechende Mustererkennungsvorschriften sind grundsätzlich bekannt und beispielsweise in der US 2007/0066967 A1 offenbart.

[0049] Die erläuterten Bilderkennungsvorschriften, zu denen im Detail auf die erwähnte US 2007/0066967 A1 verwiesen wird, können beispielsweise auch eine Shadingkorrektur, eine Graubildverarbeitung, eine Umsetzung in ein Binärbild, eine Binärbildverarbeitung, eine Segmentierung und eine Bestimmung von Objektmerkmalen, beispielsweise der Kalibrationsmarkierungen und weitere aus dem Bereich der Bildverarbeitung bekannte Verfahren umfassen.

[0050] Insbesondere wird ein elektronisches Bild zumindest eines Bildausschnitts eines Objekts aufgenommen, und anschließend bildanalytisch untersucht. In der genannten US 2007/0066967 A1 wird zumindest ein auszuschneidendes Dissektat automatisch ermittelt und eine Sollschnittlinie um dieses automatisch bestimmt. Diese Technik wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf eine Kalibrationsmarkierung übertragen und zur Ermittlung der Positionswerte verwendet.

[0051] Bildanalytische Verfahren basieren gewöhnlich auf einer Merkmalsanalyse. Bei dieser Vorgehensweise nutzt man die Tatsache, dass jedes Bildelement, im vorliegenden Fall eine Kalibrationsmarkierung, über eine gewisse Anzahl individueller Merkmale erkannt und klassifiziert werden kann. Merkmale können z.B. Größen wie Fläche, Umfang und Durchmesser aber auch Masse, Textur, Farbe, Form etc. sein. Indem man einen geeigneten Satz von Merkmalen auswählt, kann man ein Bildelement klassifizieren und gegen andere Bildelemente abgrenzen.

[0052] Diesen geeigneten Satz von Merkmalen trägt man gewöhnlich in einem n -dimensionalen Merkmalsraum auf, wie im Detail in der genannten Druckschrift beschrieben. Beispielsweise kann ein Merkmalsraum mit den Merkmalen Farbe, Fläche und Durchmes-

ser gewählt werden. Die verwendeten Merkmalsräume können im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezielt an die Kalibrationsmarkierungen angepasst werden und umgekehrt. Bildelemente mit vergleichsweise wenig Farbe und einem kleinen Durchmesser und einer kleinen Fläche werden dann z.B. durch ein erstes Merkmalscluster klassifiziert. Hiervon werden Bildelemente, die durch ein anderes Merkmalscluster erfasst werden, unterschieden. Beispielsweise können letztere vergleichsweise viel Farbe und einen geringen Durchmesser sowie eine kleine Fläche aufweisen. Zusätzliche Bildelemente können durch ein nochmals anderes Merkmalscluster beschrieben werden und verfügen beispielsweise über weniger Farbe und einen großen Durchmesser sowie eine große Fläche usw. Die erläuterte Erzeugung der Kalibrationsmarkierungen, insbesondere unter Verwendung der erläuterten Formen, ggf. Farben und der Beschichtung des Kalibrationsobjekts, vereinfacht die Unterscheidung der Kalibrationsmarkierungen von anderen Bildelementen, die ebenfalls auf entsprechenden Kalibrationsobjekten vorhanden sind.

[0053] Zur Erkennung der Kalibrationsmarkierungen kann ferner auch ein Überlagerungs- und/oder Subtraktionsbild aus Einzelbildern vor und nach der Erzeugung der Kalibrationsmarkierungen verwendet werden, wodurch sich die Kalibrationsmarkierungen auch dann schnell auffinden lassen, wenn ihre Form nicht bekannt ist. Ferner kann ein entsprechendes Überlagerungs- und/oder Subtraktionsbild zur Berechnung eines exakten Mittelpunkts eines Laserfokus genutzt werden.

[0054] Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der vorliegenden Erfindung kann auch während der Kalibrierung anhand der Kalibrationsmarkierung und/oder deren Form der Laser automatisch eingestellt werden. Diese Einstellung umfasst sämtliche einstellbaren Laserparameter, zumindest jedoch Laserenergie, Schnittgeschwindigkeit, Apertur und/oder Frequenz. Je nach Auswertung von Form und Struktur der Kalibrationsmarkierungen können die einzelnen Parameter angepasst werden. Beispielsweise kann weniger Energie und eine kleine Apertur bei zu breiten Linien der Kalibrationsmarkierungen und eine langsame Geschwindigkeit bei „gekrümmten“ Linien, welche aufgrund zu hoher Laserführungsgeschwindigkeit auftreten können, verwendet werden. Die Einstellung der Apertur eines entsprechenden Lasers ist beispielsweise aus der DE 100 18 255 C2 bekannt.

[0055] Die zuvor erläuterten Merkmale und Vorteile betreffen in gleicher Weise ein erfindungsgemäß vorgeschlagenes Lasermikrodissektionssystem. Dieses weist ein Mikroskop mit einer Auflichteinrichtung zum Führen eines mittels einer Lasereinheit des Lasermikrodissektionssystems erzeugten Laserstrahls durch ein Mikroskopobjektiv des Mikroskops und eine Laserablenkeinrichtung zum Ablenken des Laserstrahls

in einem durch Ansteuersignale definierten Umfang auf. Das Lasermikrodissektionssystem weist ferner eine digitale Bilderfassungseinheit mit einem Bildauswertungsmodul auf.

[0056] Das Lasermikrodissektionssystem ist erfindungsgemäß mit einer Kalibrationsanordnung zur Kalibration der Laserablenkeinrichtung versehen. Diese ist dafür eingerichtet, die Laserablenkeinrichtung mit ersten Ansteuersignalen, welche auf Grundlage von Positionsvorgabewerten und unter Verwendung von ersten Kalibrationswerten berechnet werden, durch Erzeugen zumindest einer Kalibrationsmarkierung auf einem in einer Objektebene des Mikroskopobjektivs eingebrachten Kalibrationsobjekt mittels des Laserstrahls, durch anschließendes Erfassen der wenigstens einer Kalibrationsmarkierung mittels der digitalen Bilderfassungseinheit, durch Ermitteln von Positionswerten der wenigstens einer Kalibrationsmarkierung mittels des Bildauswertungsmoduls, und durch Bestimmen zweiter Kalibrationswerte auf Grundlage einer Beziehung der Positionsvorgabewerte und der ermittelten Positionswerte eingerichtet.

[0057] Insbesondere ist ein derartiges Lasermikrodissektionssystem zur Durchführung eines Verfahrens wie zuvor erläutert eingerichtet.

[0058] Mittels des erfindungsgemäßen Lasermikrodissektionssystems können im Gegensatz zum Stand der Technik sehr viel genauer gewünschte Einzelzellen oder Geweberegionen (Zellverbände) eines Objekts in ein Auffanggefäß überführt und gezielt untersucht werden. Die Einzelzellen oder Geweberegionen können eindeutig bestimmten Bereichen des Objekts zugeordnet werden, Kontaminationen sind aufgrund der deutlich erhöhten Schnittgenauigkeit des Lasers reduziert. Bei dem Objekt kann es sich beispielsweise um einen Schnitt eines festen Gewebes, um einen Aus- oder Abstrich, beispielsweise einen mikroskopischen Schnitt durch ein Organ, um adhärenente Zellkulturen und dergleichen handeln.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0059] Die Erfindung und Ausführungsformen der Erfindung werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen erläutert.

[0060] Fig. 1 zeigt schematisch ein Lasermikrodissektionssystem, das zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden kann.

[0061] Fig. 2 zeigt schematisch ein Verfahren zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung gemäß einer Ausführungsform der Erfindung.

[0062] Fig. 3 zeigt schematisch Kalibrationsmarkierungen zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung gemäß einer Ausführungsform der Erfindung.

[0063] Fig. 4 zeigt schematisch ein Verfahren zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung gemäß einer Ausführungsform der Erfindung.

[0064] In den Figuren sind einander entsprechende Elemente mit identischen Bezugszeichen angegeben und nicht wiederholt erläutert.

Ausführungsform(en) der Erfindung

[0065] In Fig. 1 ist ein Lasermikrodissektionssystem, das zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden kann, schematisch dargestellt und insgesamt mit **100** bezeichnet. Das Lasermikrodissektionssystem **100** entspricht in wesentlichen Teilen jenem, das in der EP 1 276 586 B1 offenbart ist, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird. Ein Koordinatensystem, anhand dessen die nachfolgend erwähnten Achsen bzw. Richtungen x, y und z veranschaulicht sind, ist in der Fig. 1 mit **110** bezeichnet.

[0066] Das Lasermikrodissektionssystem **100** umfasst ein Mikroskop **10**. In einem Mikroskopfuß **11** des Mikroskops **10** kann eine hier nur teilweise dargestellte Beleuchtungseinrichtung **12** vorgesehen sein. Diese kann beispielsweise eine (nicht dargestellte) Lichtquelle und geeignete Mittel zur Beeinflussung des durch die Lichtquelle bereitgestellten Beleuchtungslichts umfassen, beispielsweise Filter und/oder Blenden. Zur Durchlichtbeleuchtung und zur Einstellung geeigneter Kontrast- bzw. Beobachtungsverfahren kann eine Kondensoreinheit **90** vorgesehen sein.

[0067] Am Mikroskopfuß **11** kann beispielsweise auch eine Benutzereingabe- und/oder Benutzerinformationseinheit **13** angeordnet sein, die beispielsweise als Touchscreen ausgebildet sein kann, und über die der Benutzer beispielsweise Betrachtungs- und/oder Bearbeitungsparameter eingeben und/oder auslesen kann.

[0068] Ferner ist ein Triebknopf **14** vorgesehen. Dieser dient zur Bedienung eines Grob- und eines Feintriebs zur Einstellung einer Höhe eines Mikroskopoptischs **30**. Ein Objekt, das sich auf einem Objektträger (hier ohne Bezeichnung) auf einem Objekthalter **50** befindet, beispielsweise ein auf dem Objektträger aufgebracht Schnitt, kann hierdurch in eine Objektebene **51** eines Objektivs **41** gebracht werden. Das Objektiv **41** ist neben weiteren Objektiven **42** in einem Objektivrevolver **40** befestigt. Zum Schutz vor Laserstrahlung kann eine Schutzhaube **15** vorgesehen sein.

[0069] Von dem Objekt in der Objektebene **51** ausgehendes Beobachtungslicht verläuft entlang eines Beobachtungsstrahlengangs a. In einer Tubuseinheit **60** mit geeigneten Auskoppelinrichtungen **61** kann ein vorzugsweise variabler Anteil des Beobachtungslichts, beispielsweise um 60° , ausgekoppelt und mittels eines Okularpaars **62** einem Benutzer dargeboten werden. Ein weiterer Anteil des Beobachtungslichts kann in eine digitale Bilderfassungseinheit **63** eingekoppelt und bildgebend erfasst werden. Der Bilderfassungseinheit **63** kann, vor Ort, in einer Steuereinheit **82** oder einem Steuerrechner **81** (siehe unten) oder in anderer räumlicher Anordnung, ein Bildauswertungsmodul **64** zugeordnet sein.

[0070] Das Lasermikrodissektionssystem **100** weist eine Lasereinheit **70** mit einer Laserlichtquelle **75** auf. Ein durch die Laserlichtquelle **75**, bei der es sich beispielsweise um eine UV-Laserlichtquelle handeln kann, bereitgestellter Laserstrahl b wird in einer Auflichteinheit, die hier insgesamt mit **76** angegeben ist, an einem ersten Umlenkspiegel **71** und einem zweiten Umlenkspiegel **72** umgelenkt und durch das Objektiv **41** auf das Objekt in der Objektebene **51** fokussiert.

[0071] Bei dem Lasermikrodissektionssystem **100** kann der Ort, an dem der Laserstrahl b auf das Objekt in der Objektebene **51** auftrifft, grundsätzlich auf unterschiedliche Weise eingestellt werden. Einerseits kann eine manuelle Verstelleinrichtung **31** vorgesehen sein, mittels derer der als Kreuztisch ausgebildete Mikroskopoptisch **30** in x- und y-Richtung (also hier senkrecht bzw. parallel zur Papierebene) verstellt werden kann. Neben der Verstelleinrichtung **31** können auch elektromechanische Stellmittel vorgesehen sein, die beispielsweise durch eine Steuereinheit **82** angesteuert bzw. deren Position durch die Steuereinheit **82** erfasst werden kann.

[0072] Die Steuereinheit **82** kann auch beliebige weitere motorisierte Funktionen des Lasermikrodissektionssystems **100** steuern und insbesondere eine Schnittstelle zu einem externen Steuerrechner **81**, der über entsprechende Verbindungen **83** angebunden sein kann, bereitstellen.

[0073] Für die Lasermikrodissektion kann insbesondere eine Laserablenkeinrichtung **73** vorgesehen sein. Mittels der Laserablenkeinrichtung **73** kann der Laserstrahl b gegenüber einer zwischen dem ersten Umlenkspiegel **71** und dem zweiten Umlenkspiegel **72** verlaufenden optischen Achse c abgelenkt werden. Der Laserstrahl kann daher an unterschiedlichen Positionen auf den zweiten Umlenkspiegel **72** auftreffen, der beispielsweise als dichromatischer Teiler ausgebildet sein kann, und wird damit auch an unterschiedlichen Positionen auf das Objekt in der Objektebene **51** fokussiert. Eine Ablenkung mittels einer Laserablenkeinrichtung **73** ist im Detail

in der EP 1 276 586 B1 gezeigt. Es sei betont, dass hier unterschiedliche Möglichkeiten zur Ablenkung eines Laserstrahls **b** bzw. zur Positionierung des Objekts in der Objektebene **51** gegenüber dem Laserstrahl **b** zum Einsatz kommen können. Die Erfindung ist nicht auf das dargestellte Beispiel beschränkt.

[0074] Im dargestellten Beispiel weist die Laserablenkeinrichtung **73** zwei massive gläserne Keilplatten **731** auf, die gegen die optische Achse **c** geneigt und unabhängig voneinander um die optische Achse **c** drehbar sind. Hierzu sind die Keilplatten **731** mit Kugellagern **732** gelagert. Jede der Keilplatten ist mit einem Zahnrad **733** verbunden. Die Zahnräder **733** können jeweils mittels Aktoren **734** gedreht werden, die mit entsprechenden Ansteuersignalen beaufschlagt werden können und entsprechend die Zahnräder **733** antreiben. Die Aktoren **734** können über Positionsgeber **735** verfügen (hier nur am rechten Aktor **734** gezeigt). Eine durch die Positionsgeber **735** erfasste Position kann an die Steuereinheit **80** übermittelt werden.

[0075] In Fig. 2 ist ein Verfahren gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung in Form eines schematischen Ablaufplans dargestellt und insgesamt mit **200** bezeichnet. Das Verfahren **200** ist in einem hierfür eingerichteten Lasermikrodissektionssystem, beispielsweise dem in Fig. 1 gezeigten Lasermikrodissektionssystem **100**, implementiert.

[0076] Das Verfahren geht von einem Schritt **210** aus, in dem sich ein entsprechendes Lasermikrodissektionssystem in einem unkalibrierten Zustand befindet. In diesem unkalibrierten Zustand kann, wie mehrfach zuvor erläutert, nicht sichergestellt werden, dass die zuvor erläuterten Positionsvorgabewerte und Positionswerte einander im erforderlichen Umfang entsprechen. Um dies zu gewährleisten, wird das Kalibrationsverfahren **200** durchgeführt.

[0077] In einem Schritt **220** werden hierzu, beispielsweise mittels einer Steuereinheit **80**, die erwähnten Positionsvorgabewerte **21** vorgegeben. Es handelt sich hierbei um Sollwerte, die eine Wunschposition des Laserstrahls in der Objektebene **51** des Mikroskopobjektivs **41** angeben. In dem Schritt **220** werden auch die Positionsvorgabewerte **21** mit „ersten“ Kalibrationswerten **22**, die beispielsweise aus einem Kalibrationsdatenspeicher **20** abgerufen werden, verrechnet. Bei den in Schritt **220** verwendeten Kalibrationsdaten **22** kann es sich beispielsweise um standardmäßige Kalibrationsdaten handeln, wie sie typischerweise für ein entsprechendes Lasermikrodissektionssystem zum Einsatz kommen, oder um Kalibrationsdaten, die nach längerem Betrieb eines entsprechenden Lasermikrodissektionssystems **100** vorliegen. In Schritt **220** werden aus den Positionsvorgabewerten **21** und den Kalibrationswerten **22**

Ansteuersignale **23** berechnet und an eine Laserablenkeinrichtung, beispielsweise die Laserablenkeinrichtung **73** des in Fig. 1 gezeigten Lasermikrodissektionssystems ausgegeben. Hierbei kann es sich insbesondere auch um entsprechende Signalfolgen von Ansteuersignalen **23** handeln, die eine kontinuierliche und/oder schrittweise Ablenkung des Lasers in der Laserablenkeinrichtung **73** bewirken. Gleichzeitig (nicht dargestellt) wird ein entsprechender Laser kontinuierlich oder gepulst aktiviert, so dass mittels des Laserstrahls zumindest eine Kalibrationsmarkierung auf einem Kalibrationsobjekt, das in eine Objektebene **51** des Mikroskopobjektivs **41** eingebracht ist, erzeugt werden kann. Nach der erfolgreichen Abarbeitung des Schritts **220**, durch die eine Wunschanzahl entsprechender Kalibrationsmarkierungen auf dem Kalibrationsobjekt erzeugt wurde, wird das Verfahren in einem Schritt **230** fortgesetzt.

[0078] In dem Schritt **230** wird mittels einer digitalen Bilderfassungseinheit, beispielsweise der digitalen Bilderfassungseinheit **63** des in Fig. 1 gezeigten Lasermikrodissektionssystems **100**, das Kalibrationsobjekt **52**, das in die Objektebene **51** des Mikroskopobjektivs **41** eingebracht ist, digital erfasst. Mittels eines der digitalen Bilderfassungseinheit **63** zugeordneten Bildauswertungsmoduls **64** werden hierbei Positionswerte **24** der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung **53** ermittelt. Diese werden in Schritt **230** mit den Positionsvorgabewerten **21** in Beziehung gesetzt. Beispielsweise wird eine x- und y-Abweichung in der Objektebene zwischen den Positionsvorgabewerten **21** und den Positionswerten **24** bestimmt. Auf dieser Grundlage werden nunmehr neue („zweite“) Kalibrationswerte **25** ermittelt und in den Kalibrationsdatenspeicher **20** übertragen. Hierbei werden beispielsweise die ursprünglichen („ersten“) Kalibrationswerte **22** mit den neu ermittelten („zweiten“) Kalibrationswerten **25** überschrieben.

[0079] Das Lasermikrodissektionssystem **100** befindet sich damit in einem kalibrierten Zustand, der in Schritt **240** veranschaulicht ist. In diesem Schritt **240** werden zur Lasermikrodissektion ebenfalls entsprechende Positionsvorgabewerte **21**, beispielsweise mit der Steuereinheit **80**, vorgegeben, nunmehr jedoch mit den neu ermittelten Kalibrationswerten **25** verrechnet. Auf dieser Grundlage berechnete Ansteuersignale (hier ohne Bezeichnung) können an die Laserablenkeinrichtung **73** ausgegeben werden und bewirken eine verbesserte Übereinstimmung zwischen den Positionsvorgabewerten und den Positionswerten.

[0080] In Fig. 3 sind alternative Formen von Kalibrationsmarkierungen **53** auf Kalibrationsobjekten **52** stark vergrößert dargestellt. Fig. 3A zeigt dabei eine punktförmige Kalibrationsmarkierung **53**, die beispielsweise in der Mitte eines Kalibrationsobjekts **52** erzeugt wird, wenn, wie ebenfalls zuvor erläutert, ein

feststehender Laserstrahl eingesetzt wird. In **Fig. 3B** ist eine Kalibrationsmarkierung **53**, die mittels einer Laserablenkeinrichtung **73** erzeugbar ist, und die im dargestellten Beispiel eine Kreuzform aufweist, dargestellt. Eine beispielsweise in einer digitalen Bilderfassungseinheit **63** bzw. in einem Bildauswertungsmodul **64** einer derartigen digitalen Bilderfassungseinheit **63** implementierte Bildauswerterroutine, beispielsweise geeignete parametrisierte digitale Auswertemittel, können zur Erkennung entsprechender Formen von Kalibrationsmarkierungen **53** auf Kalibrationsobjekten **52** eingerichtet sein. Eine charakteristische Form, wie die Kreuzform, die in **Fig. 3B** dargestellt ist, erleichtert die Erkennung. Ferner kann mittels einer entsprechenden Form besonders einfach ein durch diese definierter Bezugspunkt, hier beispielsweise der Mittelpunkt **M**, definiert werden.

[0081] In **Fig. 4** sind in den Teilfiguren **Fig. 4A** bis **Fig. 4D** aufeinander folgende Teilschritte eines Verfahrens gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung schematisch dargestellt. In sämtlichen Teilfiguren **Fig. 4A** bis **Fig. 4D** sind, wie in den Teilfiguren **Fig. 3A** und **Fig. 3B** der **Fig. 3** mittels einer digitalen Bilderfassungseinheit **63** erfasste Kalibrationsobjekte **52** ausschnittsweise dargestellt.

[0082] In dem in **Fig. 4A** dargestellten ersten Teilschritt wird in einer oberen rechten Ecke des Kalibrationsobjekts **52** eine entsprechende Kalibrationsmarkierung **53** angebracht. Ein durch ein Bildauswertungsmodul **64** ausgewerteter Bereich ist hier mit **640** bezeichnet und gestrichelt umfasst. Innerhalb des Bereichs **640** wertet ein Bildauswertungsmodul die vorliegenden Bilddaten mit der darin enthaltenen Kalibrationsmarkierung **53** aus und bestimmt auf dieser Grundlage einen Positionswert. Der Positionswert kann beispielsweise in Form von x- und y-Bildkoordinaten, die bei einem entsprechend geeichten Bildauswertungsmodul definierten Koordinaten des Kalibrationsobjekts **52** entsprechen, angegeben werden. Ist der Teilschritt, der in **Fig. 4A** dargestellt ist, erfolgreich abgeschlossen, und sind Positionswerte **24** der Kalibrationsmarkierung **53** erfasst, kann das Verfahren mit entsprechenden Teilschritten an beliebigen Positionen des Kalibrationsobjekts **52** fortgesetzt werden.

[0083] Beispielsweise wird in dem in **Fig. 4B** dargestellten Teilschritt eine weitere Kalibrationsmarkierung **53** im linken oberen Bereich des Kalibrationsobjekts erzeugt und (vgl. Erfassungsbereich **640**) erfasst und ausgewertet. Entsprechendes gilt auch für die in den **Fig. 4C** und **Fig. 4D** dargestellten Teilschritte, die in entsprechender Weise durchgeführt werden. Durch die Vierfachkalibration werden besonders zuverlässige Kalibrationswerte erhalten, die beispielsweise in den in **Fig. 2** gezeigten Kalibrationsdatenspeicher **20** geschrieben werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren (**200**) zur Kalibrierung einer Laserablenkeinrichtung (**73**) in einer Auflichteinrichtung (**76**) eines Mikroskops (**10**) eines Lasermikrodissektionssystems (**100**), durch die ein mittels einer Lasereinheit (**70**) des Lasermikrodissektionssystems (**100**) erzeugter und mittels der Auflichteinrichtung (**76**) durch ein Mikroskopobjektiv (**41**) des Mikroskops (**10**) geführter Laserstrahl auf eine durch Ansteuersignale (**74**) an die Laserablenkeinrichtung (**73**) definierte Position in einer Objektebene (**51**) des Mikroskopobjektivs (**41**) gelenkt wird, wobei das Lasermikrodissektionssystem (**100**) ferner eine digitale Bilderfassungseinheit (**63**) mit einem Bildauswertungsmodul (**64**) aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren umfasst, ein Kalibrationsobjekt (**52**) in die Objektebene (**51**) des Mikroskopobjektivs (**41**) einzubringen, die Laserablenkeinrichtung (**73**) mit ersten Ansteuersignalen (**23**), die auf Grundlage von Positionsvorgabewerten (**21**) und unter Verwendung von ersten Kalibrationswerten (**22**) berechnet werden, anzusteuern, und mittels des Laserstrahls zumindest eine Kalibrationsmarkierung (**53**) auf dem Kalibrationsobjekt (**52**) zu erzeugen, wobei das Kalibrationsobjekt (**52**) anschließend mittels der digitalen Bilderfassungseinheit (**63**) erfasst wird, mittels des Bildauswertungsmoduls (**64**) Positionswerte (**24**) der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung (**53**) ermittelt werden, und auf Grundlage einer Beziehung der Positionsvorgabewerte (**21**) und der Positionswerte (**24**) zweite Kalibrationswerte (**25**) bestimmt werden, die zur Berechnung von Ansteuersignalen (**23**) für die Laserablenkeinrichtung (**73**) auf Grundlage von Positionsvorgabewerten (**21**) in einem Nachkalibrationsbetrieb des Lasermikrodissektionssystems (**100**) verwendet werden.
2. Verfahren (**200**) nach Anspruch 1, bei dem Planar- und/oder Polarkoordinaten für die Positionsvorgabewerte (**21**), die Positionswerte (**24**) und/oder die Kalibrationswerte (**22**, **25**) verwendet werden.
3. Verfahren (**200**) nach Anspruch 1 oder 2, bei dem zumindest drei Kalibrationsmarkierungen (**53**) auf dem Kalibrationsobjekt (**52**) erzeugt und jeweils Positionswerte hiervon ermittelt werden.
4. Verfahren (**200**) nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem ein Kalibrationsobjekt (**52**) mit einer durch den Laserstrahl bearbeitbaren, auf einen Objektträger aufgetragenen Beschichtung verwendet wird.
5. Verfahren (**200**) nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem wenigstens eine punktförmige, kreisförmige und/oder (faden-)kreuzförmige Kalibrationsmarkierung (**53**) auf dem Kalibrationsobjekt (**52**) erzeugt wird.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Ermitteln der Positionswerte (24) der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung (53) mittels des Bildauswertungsmoduls (64) die Verwendung wenigstens einer digitalen Mustererkennungsvorschrift umfasst.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Verfahren ferner umfasst, zumindest eine Energie, eine Schnittgeschwindigkeit und/oder eine Apertur des Laserstrahls auf Grundlage zumindest eines Merkmals der zumindest einen Kalibrationsmarkierung (53) einzustellen.

8. Lasermikrodissektionssystem (100) mit einem Mikroskop (10), das eine Auflichteinrichtung (76) zum Führen eines mittels einer Lasereinheit (70) des Lasermikrodissektionssystems (100) erzeugten Laserstrahls durch ein Mikroskopobjektiv (41) des Mikroskops (10) und eine Laserablenkeinrichtung (73) zum Ablenken des Laserstrahls auf eine durch Ansteuersignale (74) definierte Position in einer Objektebene (51) des Mikroskopobjektivs (41) aufweist, wobei das Lasermikrodissektionssystem (100) ferner eine digitale Bilderfassungseinheit (63) mit einem Bildauswertungsmodul (64) aufweist, gekennzeichnet durch eine Kalibrationsanordnung zur Kalibration der Laserablenkeinrichtung (73) durch Ansteuern der Laserablenkeinrichtung (73) mit ersten Ansteuersignalen (23), welche auf Grundlage von Positionsvorgabewerten (21) und unter Verwendung von ersten Kalibrationswerten (22) berechnet werden, Erzeugen zumindest einer Kalibrationsmarkierung (53) auf einem in die Objektebene (51) des Mikroskopobjektivs (41) eingebrachten Kalibrationsobjekt mittels des Laserstrahls, anschließendes Erfassen der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung (53) mittels der digitalen Bilderfassungseinheit (63), Ermitteln von Positionswerten (24) der wenigstens einen Kalibrationsmarkierung (53) mittels des Bildauswertungsmoduls (64), und Bestimmen zweiter Kalibrationswerte (25) auf Grundlage einer Beziehung der Positionsvorgabewerte (21) und der ermittelten Positionswerte (24) zur Berechnung von Ansteuersignalen (23) für die Laserablenkeinrichtung (73) auf Grundlage von Positionsvorgabewerten (21) in einem Nachkalibrationsbetrieb des Lasermikrodissektionssystems (100).

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

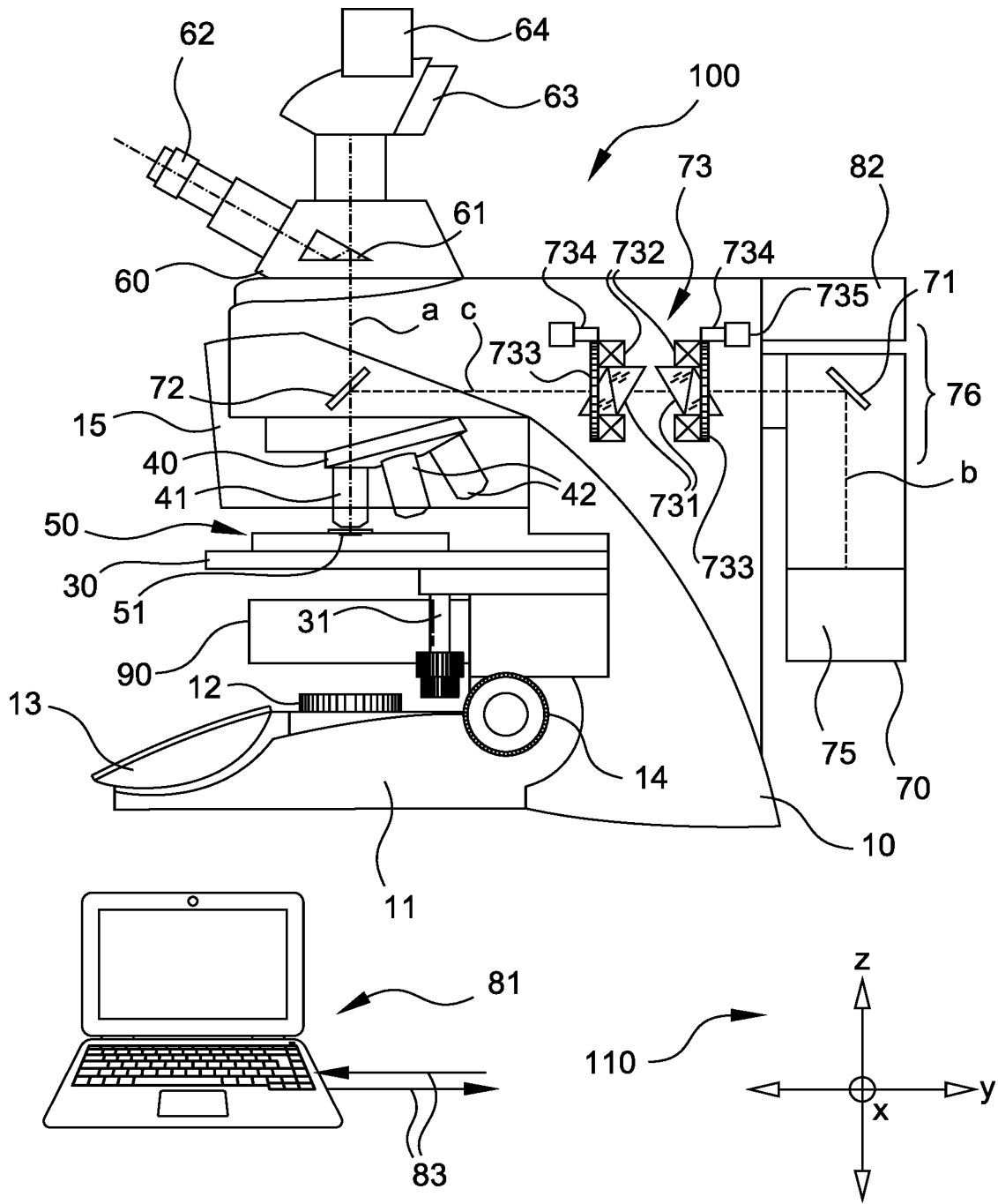


Fig. 1

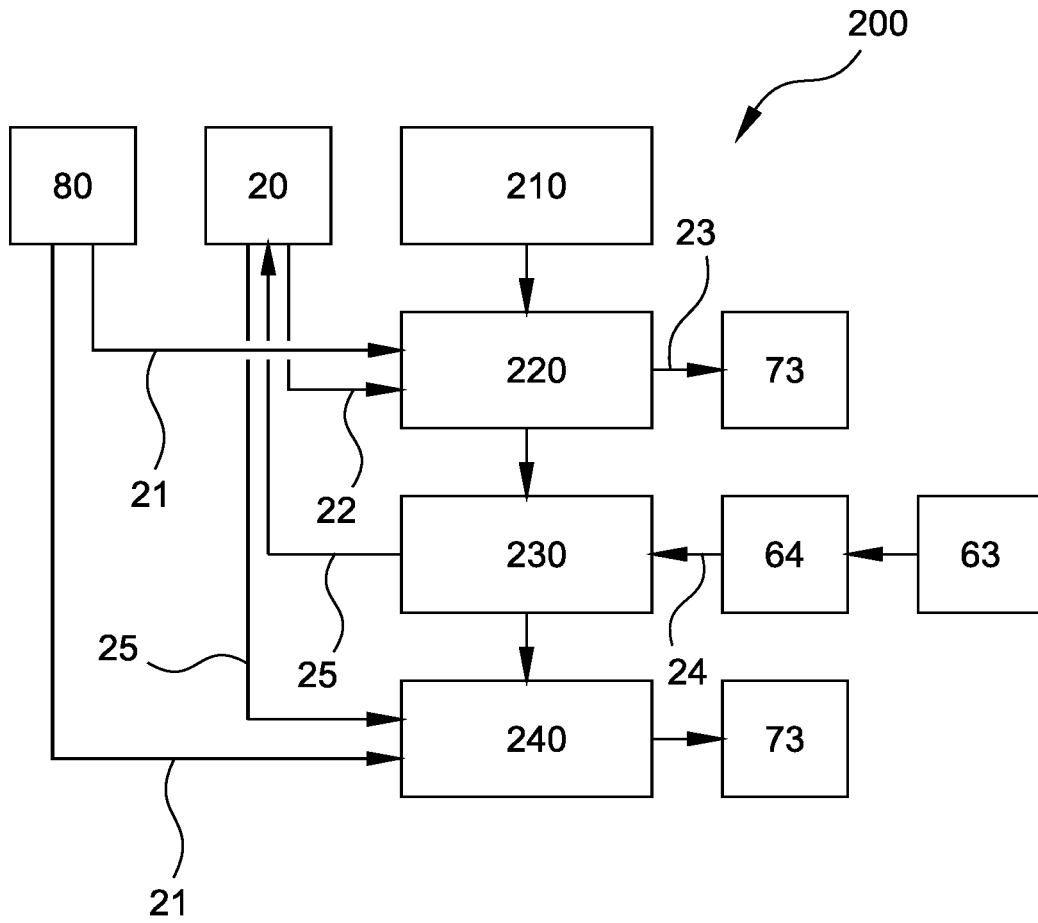


Fig. 2

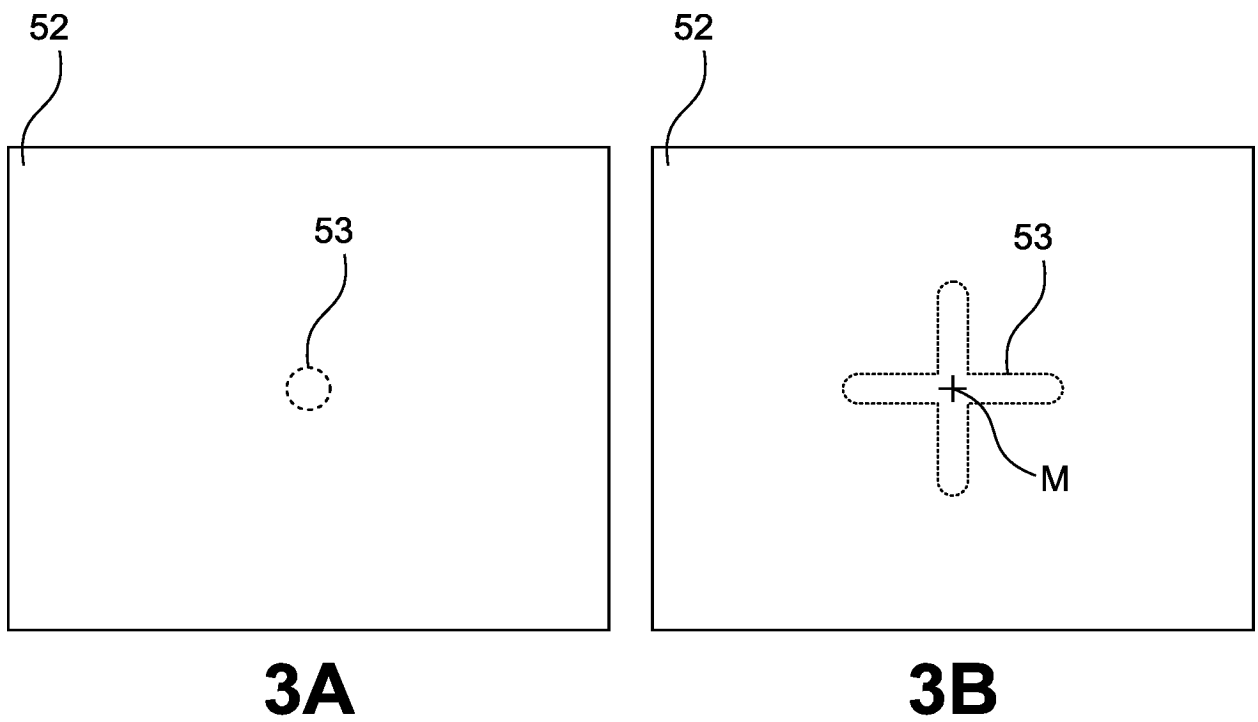


Fig. 3

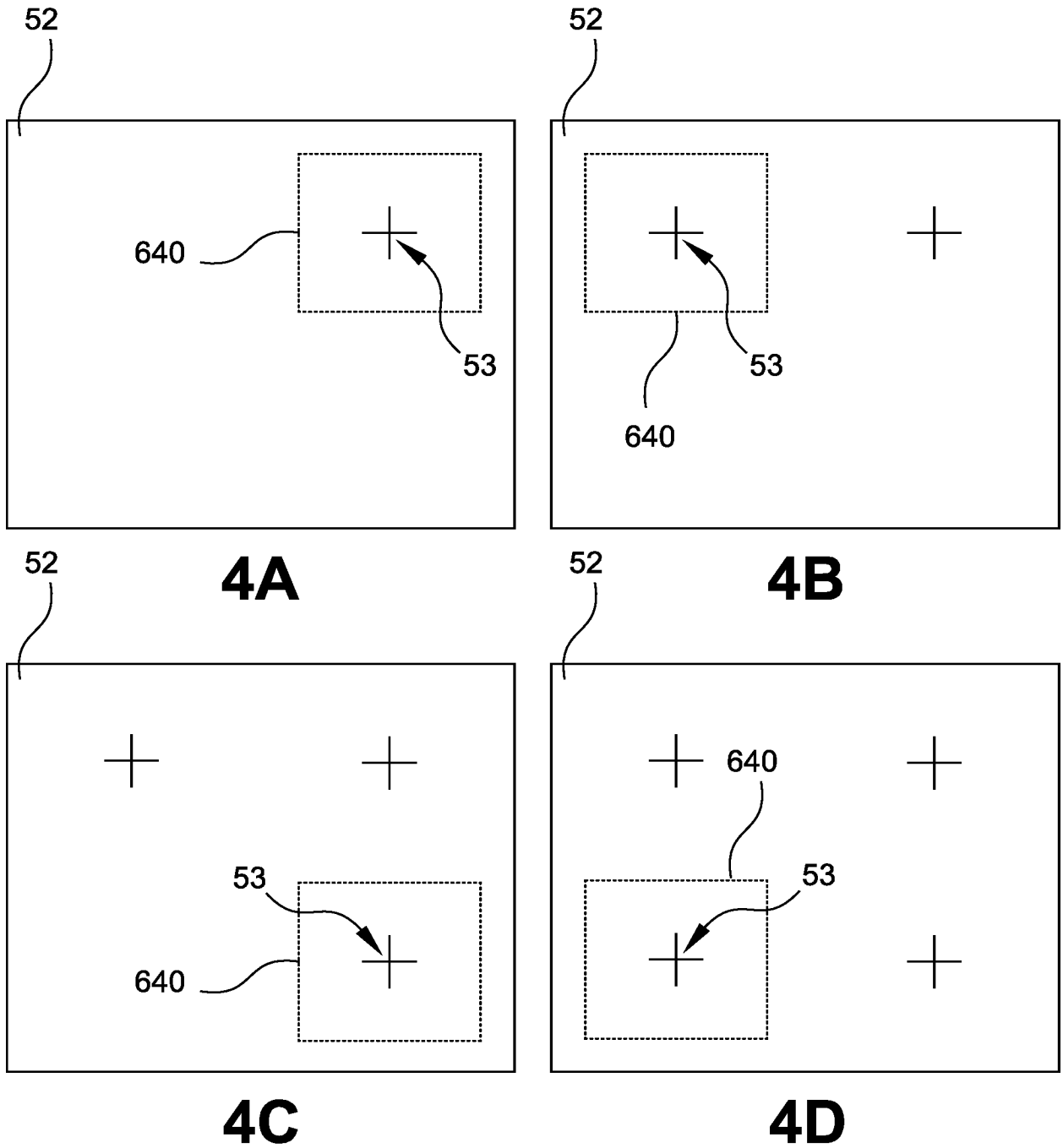


Fig. 4