



(10) **DE 10 2015 108 276 B4** 2017.03.09

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2015 108 276.4**
(22) Anmeldetag: **26.05.2015**
(43) Offenlegungstag: **01.12.2016**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **09.03.2017**

(51) Int Cl.: **G01N 33/48 (2006.01)**
G01N 1/04 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
G02B 21/34 (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

(72) Erfinder:
Schlaudraff, Falk, Dr., 35510 Butzbach, DE;
Woditschka, Christian, 35625 Hüttenberg, DE

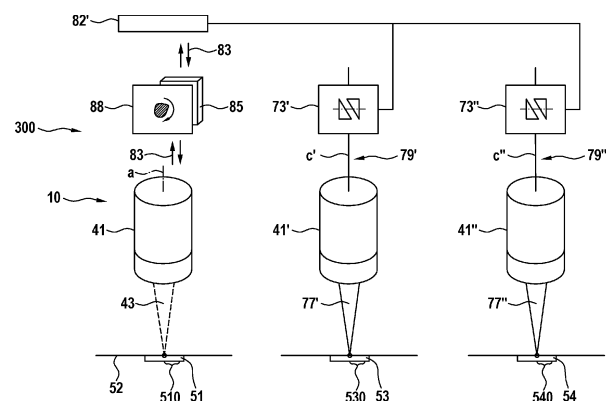
(74) Vertreter:
Bradl, Joachim, 35578 Wetzlar, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:
DE 10 2014 203 747 A1

(54) Bezeichnung: **System zur Lasermikrodissektion und Lasermikrodissektionsverfahren**

(57) Hauptanspruch: System (300) zur Lasermikrodissektion mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung (79') und mit einem mit dieser Lasermikrodissektionseinrichtung (79') über eine Steuereinheit (82') gekoppelten Mikroskop (10), wobei das Mikroskop (10) zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes zumindest eines Ausschnitts einer in das Mikroskop (10) eingebrachten ersten Probe (51) eingerichtet ist und eine Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) zum Markieren einer Soll-Schnittlinie (86) um einen interessierenden ersten Probenbereich (510) im mikroskopischen Bild der ersten Probe (51) aufweist,

die Lasermikrodissektionseinrichtung (79') eine Laserablenkeinrichtung (73') zum Verschieben eines Auftreffpunkts eines Laserstrahls auf einer zweiten Probe (53) zum Ausschneiden eines Probenbereichs (530) aus dieser zweiten Probe (53) aufweist, und wobei die Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) des Mikroskops (10) mit der Laserablenkeinrichtung der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') über die Steuereinheit (82') derart gekoppelt sind, dass bei einem Markieren der Soll-Schnittlinie (86) um den ersten Probenbereich (510) mittels der Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) des Mikroskops (10) die Laserablenkeinrichtung (73') der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') derart angesteuert wird, dass zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie der Auftreffpunkt des Laserstrahls auf der zweiten Probe (53) entlang einer Schnittlinie entsprechend der Soll-Schnittlinie automatisch verschoben wird, um einen dem ersten Probenbereich (510) entsprechenden zweiten Probenbereich (530) aus der zweiten Probe (53) auszuschnitten.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein System zur Lasermikrodissektion und ein Lasermikrodissektionsverfahren, bei dem eine erste Probe in ein Mikroskop eingebracht wird, um ein mikroskopisches Bild zumindest eines Ausschnitts dieser ersten Probe zu erzeugen und einen interessierenden ersten Probenbereich ("Region of Interest") auf dem Bild dieser ersten Probe zu bestimmen, und bei dem eine zweite Probe in eine Lasermikrodissektionseinrichtung eingebracht wird, um einen Probenbereich aus dieser zweiten Probe auszuschneiden.

Stand der Technik

[0002] Verfahren zur Bearbeitung biologischer Proben durch Lasermikrodissektion existieren bereits seit Mitte der 1970er Jahre und wurden seitdem kontinuierlich weiterentwickelt. Bei der Lasermikrodissektion können Zellen, Geweberegionen usw. aus einer biologischen Probe ("Objekt") isoliert und als sogenannte Dissektate gewonnen werden. Ein besonderer Vorteil der Lasermikrodissektion ist der kurze Kontakt der Probe mit dem Laserstrahl, durch den diese kaum verändert wird. Die Gewinnung der Dissektate kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

[0003] Beispielsweise kann in bekannten Verfahren aus einer Probe 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 der Probe auch zusammen mit einer an der Probe anheftenden 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 der Probe 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 transportierte Dissektate auch an den Boden eines Dissektatauffangbehälters, der mit einer adhäsiven Beschichtung versehen ist, angeheftet werden.

[0004] Bekannte Mikroskopsysteme zur Lasermikrodissektion weisen eine Auflichteinrichtung auf, in deren Strahlengang ein Laserstrahl eingekoppelt wird. Der Laserstrahl wird durch das jeweils verwendete Mikroskopobjektiv auf die Probe fokussiert, die auf einem motorisch-automatisch verfahrbaren Mikroskopisch aufliegt. Eine Schnittlinie kann dadurch erzeugt werden, dass der Mikroskopisch beim Schneiden verfahren wird, um die Probe relativ zu dem feststehenden Laserstrahl zu bewegen. Dies hat jedoch

unter Anderem den Nachteil, dass die Probe während des Erzeugens der Schnittlinie nicht ohne weiteres betrachtet werden kann, da sich die Probe im Gesichtsfeld bewegt und das Bild ohne weitere Kompensationsmaßnahmen verschwommen bzw. verschmiert erscheint.

[0005] Vorteilhafter sind daher Lasermikrodissektionssysteme, die Laserablenk- bzw. Laserscaneinrichtungen aufweisen, die dazu eingerichtet sind, den Laserstrahl bzw. dessen Auftreffpunkt auf der zu dissektierenden feststehenden Probe zu bewegen. Derartige Lasermikrodissektionssysteme, die auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung zum Einsatz kommen sollen und dort besondere Vorteile bieten, werden unten im Detail erläutert. Ein besonders vorteilhaftes derartiges Lasermikroskopsystem, das eine Laserablenkeinrichtung mit gegeneinander verstellbaren Glaskeilen im Laserstrahlengang aufweist, ist beispielsweise in der EP 1 276 586 B1 beschrieben.

[0006] In beiden Fällen, also in Systemen mit bewegter oder feststehender Probe, wird in der Regel mit gepulsten Lasern gearbeitet, wobei durch jeden Laserpuls ein Loch bzw. eine Vertiefung in der Probe erzeugt wird. Eine Schnittlinie entsteht durch eine Aneinanderreihung derartiger Löcher bzw. Vertiefungen, gegebenenfalls mit Überlappung.

[0007] Die Lasermikrodissektion kann zur Gewinnung von Einzelzellen oder definierten Gewebebereichen verwendet werden, die mit einem Laserstrahl vom umliegenden Gewebe separiert und 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 Nukleinsäuren, Metaboliten oder Proteine zu untersuchen.

[0008] Weiterhin kann die Lasermikrodissektion auch zur Manipulation von Einzelzellen oder definierten Gewebebereichen eingesetzt werden. Hier ist beispielsweise an eine Fluoreszenzanregung zu denken oder an die Verwendung als optische Pinzette.

[0009] Ein Problem bei den Lasermikrodissektionstechniken ist die Geschwindigkeitsbegrenzung beim Ausschneiden eines Dissektats oder beim Manipulieren einer Zielregion auf einer Probe mit mehreren auszuschneidenden bzw. zu manipulierenden Probenabschnitten. Solche Probenabschnitte werden sequentiell abgearbeitet.

[0010] Bei diesem sogenannten "Serial Section Cutting" (SSC) werden verschiedene Serienschnitte, die aus ein und demselben Präparat stammen, seriell bearbeitet. Ein solches Verfahren ist beispielsweise aus der US 2012/0045790 A1 bekannt.

[0011] Gemäß dieser US 2012/0045790 A1 werden aus einem Präparat zwei parallele, insbesondere benachbarte Probenschnitte entnommen und jeweils auf einen Objektträger aufgebracht. Der erste Probenschnitt befindet sich auf einem Standardobjektträger (mit Deckglas), der zweite Probenschnitt befindet sich auf einem sogenannten Dissektions-Objektträger (ohne Deckglas). Ein zweckmäßig gefärbter Probenbereich auf dem Standardobjektträger wird mikroskopisch untersucht, wobei ein interessierender Probenbereich festgelegt wird. Das Bild des interessierenden Probenbereichs des ersten Probenschnitts wird mittels geometrischer Transformation in das Bild des zweiten Probenschnitts eingefügt, so dass ein Bild des korrespondierenden interessierenden Probenbereichs in dem Bild des zweiten Probenschnitts entsteht. Anschließend wird dieser korrespondierende interessierende Probenbereich mittels Lasermikrodissektion aus dem zweiten Probenschnitt ausgeschnitten und einer weiteren Analyse zugeführt. Auch bei diesem Lasermikrodissektionsverfahren können mehrere interessierende Probenbereiche nur sequentiell bearbeitet werden. Insbesondere sind der Zeit- und Rechenaufwand der geometrischen Transformation des interessierenden Probenbereichs von der Referenzprobe auf die aktuell zu schneidende Probe erheblich und verzögern das Verfahren.

[0012] Aufgabe vorliegender Erfindung ist es daher, den Prozess der Lasermikrodissektion zu beschleunigen.

Offenbarung der Erfindung

[0013] Zur Lösung der genannten Aufgabe schlägt die vorliegende Erfindung ein System zur Lasermikrodissektion und ein Verfahren zur Lasermikrodissektion gemäß den unabhängigen Patentansprüchen vor. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind Gegenstand der jeweiligen Unteransprüche sowie der nachfolgenden Beschreibung.

[0014] Unter "Lasermikrodissektionseinrichtung" soll im Rahmen vorliegender Anmeldung eine Einrichtung verstanden werden, die einen Laserstrahl aus einer Laserlichtquelle über eine Laserfokussierlinse auf eine Probe fokussiert. Mittels einer vor der Laserfokussierlinse im Laserstrahl befindlichen Laserablenkeinrichtung wird der Laserstrahl definiert aus seiner Richtung gelenkt, um den Auftreffpunkt des fokussierten Laserstrahls auf der Probe zu verschieben. Solche Lasermikrodissektionseinrichtungen sind an sich bekannt und sollen daher vorliegend nicht näher erläutert werden.

[0015] Unter "Mikroskop" soll im Rahmen der vorliegenden Anmeldung eine optische Einrichtung zur mikroskopischen Visualisierung einer Probe verstanden werden. Ein solches Mikroskop besitzt somit zu

mindest ein Objektiv und eine nachgeschaltete Bilderzeugungseinrichtung zur visuellen Darstellung eines vergrößerten Bildes der Probe. Diese Bilderzeugungseinrichtung umfasst die gängigen, an sich bekannten Elemente, wie Zoomsystem, Tubus, Okular und/oder Kamera. Diese Elemente sind dem Fachmann wohl bekannt und sollen deshalb nicht näher erläutert werden.

[0016] Die vorliegende Erfindung schlägt eine Kombination aus Mikroskop und Lasermikrodissektionseinrichtung als System zur Lasermikrodissektion vor. Dieses System weist eine Steuereinheit zur Kopplung des Mikroskops und der Lasermikrodissektionseinrichtung auf. Das Mikroskop ist zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes zumindest eines Ausschnitts einer in das Mikroskop eingebrachten ersten Probe eingerichtet und weist eine Schnittlinienmarkiereinrichtung zum Markieren einer Soll-Schnittlinie um einen interessierenden ersten Probenbereich im mikroskopischen Bild der ersten Probe auf. Die Lasermikrodissektionseinrichtung weist eine Laserablenkeinrichtung zum Verschieben eines Auftreffpunkts eines Laserstrahls auf einer zweiten Probe zum Ausschneiden eines Probenbereichs aus dieser zweiten Probe auf. Bei diesem System sind die Schnittlinienmarkiereinrichtung des Mikroskops und die Laserablenkeinrichtung der Lasermikrodissektionseinrichtung über die genannte Steuereinheit derart gekoppelt, dass bei einem Markieren der Soll-Schnittlinie um den ersten Probenbereich mittels der genannten Schnittlinienmarkiereinrichtung am Mikroskop die Laserablenkeinrichtung der Lasermikrodissektionseinrichtung derart angesteuert wird, dass zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie der Auftreffpunkt des Laserstrahls auf der zweiten Probe entlang einer Schnittlinie entsprechend dieser Soll-Schnittlinie verschoben wird, um einen dem ersten Probenbereich entsprechenden zweiten Probenbereich aus der zweiten Probe auszuschneiden.

[0017] Unter "Soll-Schnittlinie" ist diejenige Linie zu verstehen, die den ersten Probenbereich umgibt und die zur Schnittlinie des fokussierten Laserstrahls korrespondiert. Eine solche Soll-Schnittlinie kann beispielsweise manuell vom Benutzer des Systems mit einem geeigneten Werkzeug (Computermaus oder Ähnliches) in dem Bild der ersten Probe um den interessierenden Probenbereich beschrieben, also gelegt oder gezeichnet werden. Es ist auch möglich, eine vorgefertigte Schnittkontur (beispielsweise einen Kreis, eine Ellipse oder Ähnliches), die den interessierenden Probenbereich umgibt, seitens des Systems vorzuschlagen. Bei Bestätigung einer solchen vorgeschlagenen Soll-Schnittlinie kann diese entweder vom Benutzer oder vom System nachgefahren werden, was unter den Begriff "Markieren" der Soll-Schnittlinie fallen soll. Zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie wird automatisch ein dem ersten Probenbereich entsprechender zweiter Pro-

benbereich aus der zweiten Probe mittels Lasermikrodissektion ausgeschnitten. Beide Vorgänge finden in Echtzeit statt. Für einen Benutzer des Systems ist die Verzögerung zwischen Beschreiben bzw. Markieren der Soll-Schnittlinie und Schneiden mittels Lasermikrodissektion nicht oder kaum zu bemerken, da beide Vorgänge unter geringstmöglicher Verzögerung durchgeführt werden. Derartige Verzögerungen sind lediglich durch die elektronische Kopplung bedingt. Die Schnittlinienmarkiereinrichtung einerseits und die Laserablenkeinrichtung andererseits stehen über eine Steuereinheit in Verbindung, die die Schnittkontursignale der Schnittlinienmarkiereinrichtung in entsprechende Laserablenksignale für die Laserablenkeinrichtung umsetzt. Eine solche Steuereinheit ist beispielsweise in Form eines Arbeitsplatzrechners bei herkömmlichen Lasermikrodissektionsgeräten bereits vorhanden. Der Arbeitsrechner dieses Geräts wandelt ebenfalls Schnittkontursignale der Schnittlinienmarkiereinrichtung in entsprechende Steuersignale für die Laserablenkeinrichtung um, um auf demselben Gerät bei derselben Probe die Lasermikrodissektion durchzuführen. Im Unterschied hierzu werden bei der Erfindung die entsprechenden Laserablenksignale jedoch an ein oder mehrere andere Lasermikrodissektionseinrichtungen übertragen, die mit dem Mikroskop gekoppelt sind. Auf diese Weise kann "zeitgleich" bzw. "in Echtzeit" (beide Begriffe sollen synonym verwendet werden) markiert und an mehreren Stationen geschnitten werden. Dies bedeutet eine enorme Zeitersparnis gegenüber dem aus dem Stand der Technik bekannten Seriell Section Cutting.

[0018] Die Schnittlinienmarkiereinrichtung stellt den räumlichen Koordinaten der Soll-Schnittstelle entsprechende Schnittkontursignale zur Verfügung. Mit anderen Worten besitzt die Schnittlinienmarkiereinrichtung einen Ausgang, an dem Schnittkontursignale abnehmbar sind, die einer Position auf der Soll-Schnittlinie entsprechen. Fährt das System oder ein Benutzer diese Soll-Schnittlinie ab, so werden sämtliche Positionen in räumlichen Koordinaten in Form von Ausgangssignalen an den Ausgang gelegt. Diese Ausgangssignale werden über die Steuereinheit in Laserablenksignale gewandelt, mit denen die Laserablenkeinrichtung der Lasermikrodissektionseinrichtung angesteuert wird. Diese Laserablenksignale führen dazu, dass der Auftreffpunkt des auf die zweite Probe fokussierten Laserstrahls automatisch entlang einer Schnittlinie verschoben wird, die der Soll-Schnittlinie in ihren räumlichen Koordinaten entspricht, so dass ein dem ersten Probenbereich entsprechender zweiter Probenbereich aus der zweiten Probe ausgeschnitten wird. Gleiches gilt in analoger Weise, wenn eine weitere Lasermikrodissektionseinrichtung mit einer weiteren, dritten Probe vorhanden ist, und so fort.

[0019] Zur Vermeidung von Missverständnissen sei an dieser Stelle betont, dass die im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzte Lasermikrodissektionseinrichtung mit Proben verwendet wird, die bereits mikroskopietauglich und laserdissizierbar (ohne Abdeckung wie Deckglas) vorbereitet sind. Hierbei kann es sich beispielsweise um Gewebe-Dünnschnitte handeln, die mittels eines Mikrotoms aus einem größeren Gewebeblock herausgetrennt wurden, im vorliegenden Fall jedoch auch um dickere Schnitte aus einem entsprechenden Gewebeblock. 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 Proben, sondern zu deren Bearbeitung sowie zur Isolation von bestimmten Bereichen hiervon. Es versteht sich, dass die vorliegende Erfindung auch mit Proben, die nicht mittels eines Mikrotoms gewonnen werden, zum Einsatz kommen kann, z. B. mit Ausstrichen, Mazeraten usw. Wie erwähnt, eignet sich die Erfindung jedoch auch zur Verarbeitung dickerer Proben, die nicht mittels eines Mikrotoms vorbereitet wurden.

[0020] Mikrotome werden ausschließlich bei der Vorbereitung von mikroskopischen Proben eingesetzt. Mikrotome können hierzu auch Laser aufweisen. Die mittels eines Mikrotoms erhaltenen Schnitte werden auf einen Objektträger, wie oben erwähnt, aufgebracht, gegebenenfalls 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 probenabhängigen Kriterien, beispielsweise nach visuellen morphologischen Kriterien, eingerichtet sind. Im vorliegenden Fall dient das Lasermikrodissektionssystem insbesondere zum Heraustrennen von Probenpartikeln, die anschließend in einem Suspendierfluid aufgenommen werden. Der Fachmann würde daher bei Mikrotomen eingesetzte technische Lösungen aufgrund der völlig unterschiedlichen Zielsetzung nicht auf derartige Lasermikrodissektionssysteme übertragen.

[0021] Zum Heraustrennen von Probenpartikeln bzw. Probenbereichen, also zur Gewinnung von Dissektaten, wird ein Probenbereich entlang einer Schnittlinie vollständig durchtrennt und somit von der umgebenden Probe abgelöst. Es ist beispielsweise nicht möglich, Material unterschiedlicher, übereinander liegender Gewebeschichten getrennt voneinander zu isolieren. Ein mittels Lasermikrodissektion ge-

wonnenes Dissektat stellt daher stets ein "Sammelprobenbereich" durch die gesamte Dicke der bearbeiteten Probe dar; eine Differenzierung in einzelne Gewebeschichten mittels Lasermikrodissektion ist nicht möglich bzw. kann nur indirekt über die Dicke des Probenbereichs geschehen.

[0022] Die Laserablenkeinrichtung weist beim erfindungsgemäßen System in einer besonders vorteilhaften Ausführungsform zwei dicke, gegen eine optische Achse geneigte und unabhängig voneinander um eine optische Achse drehbare gläserne Keilplatten („Glaskerle") auf, welche durch ihre Keilwinkel eine Strahlableitung 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 der Laserfokussierlinse. Der Schnittpunkt des Laserstrahls mit der Objektebene ist damit einstellbar.

[0023] Da Lasermikrodissektionseinrichtungen in der Regel auch ein mikroskopisches Bild der zu schneidenden Probe erzeugen, stellt die Laserfokussierlinse das entsprechende Mikroskopobjektiv, das zur Erzeugung des mikroskopischen Bildes verwendet wird, dar. Es sei jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die vorliegende Erfindung nicht voraussetzt, dass die eingesetzten Lasermikrodissektionseinrichtungen zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes ihrer jeweiligen Proben eingerichtet sind. Hierauf wird weiter unten noch gesondert eingegangen.

[0024] Eine oben skizzierte Laserablenkeinrichtung ist insbesondere deshalb vorteilhaft gegenüber anderen Laserablenkeinrichtungen wie beispielsweise Spiegelscannern, Galvanometerscannern oder Schrittmotorscannern, weil diese nicht in einer zu der Objektivpupille bzw. Pupille der Laserfokussierlinse konjugierten Ebene angeordnet werden muss. Damit ist auch keine sogenannte Pupillenabbildung erforderlich, um zu erreichen, dass der abgelenkte Strahl die Objektivpupille bzw. Pupille der Laserfokussierlinse trifft. Bei der Lasermikrodissektion 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.

Vorteile der Erfindung

[0025] Im Rahmen vorliegender Erfindung dient die erste Probe zur Bestimmung eines interessierenden Probenbereichs; sie kann somit auch als Referenzprobe verstanden werden. Diese Probe kann beispielsweise gefärbt sein und mit einem geeigne-

ten Mikroskopieverfahren, also beispielsweise unter Fluoreszenzbeleuchtung oder mittels eines geeigneten Kontrastverfahrens, untersucht werden.

[0026] Bei der "zweiten Probe" kann es sich um eine von mehreren Proben handeln, die jeweils in einer parallelen Lasermikrodissektionseinrichtung vorliegen. Mit besonderem Vorteil kann nämlich die Erfindung mit mehreren "zweiten Proben" in mehreren parallel geschalteten Lasermikrodissektionseinrichtungen ausgeführt werden. Allgemein wird hierzu eine weitere (dritte, vierte, ...) Probe in eine weitere (dritte, vierte, ...) Lasermikrodissektionseinrichtung eingebracht, um einen weiteren Probenbereich aus dieser weiteren Probe auszuschneiden, wobei zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie um den ersten Probenbereich der ersten Probe (Referenzprobe) der dem ersten Probenbereich entsprechende weitere Probenbereich aus jeder weiteren Probe herausgeschnitten wird. Die entsprechenden Schnittkontursignale werden bei dieser Ausführungsform der zweiten, dritten usw. Lasermikrodissektionseinrichtung in Form der genannten Laserablenksignale übertragen, so dass parallel und zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie korrespondierende zweite, dritte usw. Probenbereiche aus der zweiten, dritten usw. Probe ausgeschnitten werden. Diese Form des erfindungsgemäßen Paralleldissezierens ist besonders bevorzugt und besonders zeiteffektiv. Alle Ausführungen bezüglich der "zweiten Probe" gelten in gleicher Weise für jede weitere Probe, aus der ein entsprechender Probenbereich in der beschriebenen Weise ausgeschnitten wird.

[0027] Zweckmäßigerweise werden als erste und zweite Probe parallele, insbesondere unmittelbar benachbarte Probenschnitte, sogenannte Serienschnitte, eines Präparats verwendet. Werden also erste, zweite, dritte, vierte usw. Proben erfindungsgemäß behandelt, so ist es vorteilhaft, wenn diese Proben jeweils benachbarte Probenschnitte eines Präparats darstellen. Man kann dann davon ausgehen, dass sich die Eigenschaften zwischen benachbarten Proben nicht wesentlich unterscheiden, da sie benachbarte Probenschnitte ein und desselben Präparats darstellen. Dieses Anwendungsbeispiel ist auch typisch für das klassische sogenannte Serial Section Cutting.

[0028] Um möglichst übereinstimmende Probenbereiche aus der ersten und der zweiten Probe zu schneiden, ist es sinnvoll, wenn das System Mittel zum Abgleichen des Koordinatensystems eines Tisches des Mikroskops zum Tragen der ersten Probe mit dem Koordinatensystem eines Tisches der Lasermikrodissektionseinrichtung zum Tragen der zweiten Probe aufweist. Hierzu ist es vorteilhaft, wenn der Tisch der Lasermikrodissektionseinrichtung ein computergesteuerter Tisch ist, dessen Koordinatensystem zur Ansteuerung mit dem Koordinatensystem ei-

nes computergesteuerten Tisches des Mikroskops abgeglichen werden kann. Hierzu wird beispielsweise das räumliche Koordinatensystem der ersten Probe als Referenzsystem verwendet und das Koordinatensystem der zweiten Probe auf das der Referenzprobe kalibriert. Die Kalibrierung kann dabei beispielsweise mit Hilfe von einem Referenzpunkt und einer Richtungsangabe zur Festlegung der Orientierung der Proben erfolgen; die Verwendung von zwei oder mehr Referenzpunkten erhöht die Genauigkeit der Kalibrierung. Solche Referenzpunkte können beispielsweise in die parallelen Probenschnitte, beispielsweise durch Einstechen oder Ähnliches eingebracht werden. In einem auf das Referenzkoordinatensystem kalibrierten Koordinatensystem befinden sich die Referenzpunkte dann an derselben Stelle, sprich haben dieselben Koordinaten, wie im Referenzkoordinatensystem. Dieser Abgleich der Koordinatensysteme sollte vor dem Vorgang der Lasermikrodissektion erfolgen. Die Soll-Schnittlinien, die unter Visualisierung der Referenzprobe erstellt werden, können dann simultan und zeitgleich auf die zweite Probe bzw. auf die anderen Proben in den entsprechenden Lasermikrodissektionseinrichtungen in Form von Schnittlinien, die jeweils ein Laserstrahl beschreibt, übertragen werden.

[0029] Es ist vorteilhaft, wenn die Lasermikrodissektionseinrichtung zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes zumindest eines den zweiten Probenbereich umfassenden Ausschnitts der zweiten Probe eingerichtet ist. In diesem Fall entspricht die Laserfokussierlinse der Lasermikrodissektionseinrichtung einem Mikroskopobjektiv. Tatsächlich sind in der Regel Lasermikrodissektionsgeräte derart eingerichtet. Das mikroskopische Bild wird beispielsweise mit Hilfe einer Auflichtbeleuchtung erzeugt, wobei der Laserstrahl der Lasermikrodissektionseinrichtung zusammen mit dem Strahlengang der Auflichtbeleuchtung durch das Mikroskopobjektiv geführt wird. Die zweite Probe (gleiches gilt wiederum für die dritte, vierte usw. Probe) kann beispielsweise nur zum Koordinatenabgleich beleuchtet und mikroskopisch dargestellt werden, damit die Kalibrierung des Koordinatensystems der zweiten Probe anhand der Referenzpunkte erfolgen kann. Danach reicht es prinzipiell, nur die Referenzprobe zu beleuchten und die Beleuchtung der gekoppelten Lasermikrodissektionseinrichtungen abzuschalten. Selbstverständlich können die Beleuchtungen auch angeschaltet bleiben, um die Schneidprozesse zu visualisieren, das Schneidergebnis zu evaluieren oder auch um etwaige Schnittkorrekturen über eine Änderung der Soll-Schnittlinie vorzunehmen. In diesem Fall erfolgt also die Aufnahme eines mikroskopischen Bildes der zweiten Probe nicht nur zur Kalibrierung, sondern auch während der Lasermikrodissektion.

[0030] Es ist besonders vorteilhaft, wenn das zur Markierung der Soll-Schnittlinie eingesetzte Mikro-

skop mit der parallelen Lasermikrodissektionseinrichtung über eine optische Vergleichsbrücke verbunden ist. Solche optischen Vergleichsbrücken sind an sich aus dem Stand der Technik der forensischen Vergleichsmikroskope bekannt. Bezüglich Aufbau und Funktionsweise einer solchen optischen Vergleichsbrücke sei insbesondere auf EP 1 440 334 B1 hingewiesen.

[0031] Eine solche optische Vergleichsbrücke ist insbesondere zur Darstellung jeweils eines der beiden mikroskopischen Bilder der ersten und der zweiten Probe bzw. der betreffenden Ausschnitte, insbesondere zur abwechselnden Darstellung dieser Bilder und/oder zur Darstellung eines Überlagerungsbildes dieser beiden mikroskopischen Bilder und/oder zur Darstellung eines Ausschnitts des ersten mikroskopischen Bildes der ersten Probe neben einem Ausschnitt des zweiten mikroskopischen Bildes der zweiten Probe eingerichtet, wobei diese Darstellung bzw. diese Darstellungen über einen dem Mikroskop (für die Markierung der Soll-Schnittlinie) und der Lasermikrodissektionseinrichtung gemeinsamen Beobachtertubus und/oder über eine gemeinsame Kamera erfolgt bzw. erfolgen. Hierzu wird weiter unten noch näher eingegangen.

[0032] Mit Hilfe einer solchen optischen Vergleichsbrücke kann auch der oben beschriebene Abgleich der Koordinatensysteme erfolgen. Durch eine Nebeneinanderdarstellung der interessierenden Ausschnitte der ersten und zweiten Probe oder insbesondere durch ein entsprechendes Überlagerungsbild, können anhand der genannten Referenzpunkte die Koordinatensysteme durch entsprechende Tischbewegung optimal miteinander abgeglichen werden, beispielsweise indem der Probenbereich der Lasermikrodissektionseinrichtung entsprechend verstellt wird, bis die Referenzpunkte zur Deckung gelangen.

[0033] Weiterhin kann umgekehrt auch das Mikroskop zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes der ersten Probe (Referenzprobe) mit einer eigenen Lasermikrodissektionseinrichtung zum Ausschneiden eines Probenbereichs aus dieser ersten Probe ausgestattet sein. Oftmals verändert beispielsweise die Färbung der Referenzprobe Eigenschaften des ausgeschnittenen ersten Probenbereichs, also des Dissektats, so dass Dissektate der Referenzprobe nicht weiter analysiert werden. Sollte dies jedoch nicht der Fall sein, ist es sinnvoll, auch das Mikroskop der Referenzprobe mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung auszustatten, die beim Beschreiben der Soll-Schnittlinie um den ersten Probenbereich eine entsprechende Laserablenkung vornimmt, um eine der Soll-Schnittlinien entsprechende Schnittlinie mit dem Laserfokus zu beschreiben, wodurch der erste Probenbereich aus der Referenzprobe ausgeschnitten wird. Hierzu muss die Referenzprobe selbstverständlich in einer zur Lasermikrodissektion geeigneten

ten Form vorliegen, darf also kein Deckglas aufweisen und sollte beispielsweise auf einer Membranfolie aufgebracht sein.

[0034] Ein entsprechendes Mikroskopsystem, also Mikroskop mit integrierter Lasermikrodissektionseinrichtung, ist unten ausführlich unter Bezugnahme auf die **Fig. 1** erläutert. Mittels der Auflichteinrichtung wird in einem solchen Mikroskopsystem der Laserstrahl aus einer Laserlichtquelle in den Beobachtungsstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Der Laserstrahl wird durch das Mikroskopobjektiv, das auch zum Betrachten der Probe verwendet wird, auf diese fokussiert. Somit verläuft, mit anderen Worten, der Strahlengang des Laserstrahls durch die Auflichteinrichtung und durch das Mikroskopobjektiv und schneidet eine Objektebene des Mikroskopobjektivs an einem einstellbaren Schnittpunkt, der mittels der genannten Laserablenksignale an die Laserablenkeinrichtung vorgegeben wird.

[0035] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung lässt sich auf Grundlage eines an sich bekannten Vergleichsmikroskops schaffen. Ein besonders geeignetes Vergleichsmikroskop stellt beispielsweise das forensische Vergleichsmikroskop FS CB der Anmelderin dar. Ein solches Vergleichsmikroskop besteht aus einer motorisierten Vergleichsbrücke, die zwei Mikroskope miteinander verbindet. Diese Vergleichsbrücke verfügt über einen eingebauten ergonomischen Beobachtungstubus und stellt verschiedene Betrachtungsarten zur Verfügung. Im Folgenden soll von einer ersten und einer zweiten Probe ausgegangen werden, wobei jedes Mikroskop des Vergleichsmikroskops jeweils ein mikroskopisches Bild der ersten bzw. der zweiten Probe erzeugt. Zum einen kann genau eines der beiden Bilder im Beobachtungstubus und/oder über eine angeschlossene Kamera betrachtet werden. In einer zweiten Alternative kann ein Überlagerungsbild beider Bilder dargestellt werden (sogenanntes Mischbild). In einer dritten Alternative kann ein Ausschnitt des ersten Bildes neben einem Ausschnitt des zweiten Bildes dargestellt werden. Hierbei kann der Ausschnitt des zweiten Bildes den Ausschnitt des ersten Bildes ergänzen, d. h. es wird ein Probenbereich im sogenannten Schnittbild dargestellt, dessen einer (beispielsweise linker) Ausschnitt von der ersten Probe und dessen anderer (beispielsweise rechter) Ausschnitt von der anderen Probe stammt. Beispielsweise kann mittels einer Trennlinie der jeweilige Ausschnitt des ersten bzw. des zweiten Bildes im resultierenden Schnittbild in seiner Größe eingestellt werden.

[0036] Erfindungsgemäß wird ein derartiges Vergleichsmikroskop mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung ausgestattet, die an eines der beiden Mikroskope des Vergleichsmikroskops angeschlossen bzw. dort integriert wird. Selbstverständlich kann

auch, wenn zweckmäßig, das andere Mikroskop, wie bereits oben ausgeführt, mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung ausgestattet werden.

[0037] Es ist insbesondere vorteilhaft, die Soll-Schnittlinie in dem Überlagerungsbild der beiden genannten Bilder zu beschreiben. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass der entsprechende interessierende Probenbereich in der zweiten Probe insgesamt ausgeschnitten wird, wodurch auch etwaige Abgleichungenauigkeiten der Koordinatensysteme kompensiert werden können.

[0038] Insbesondere kann auch die Vergleichsbrücke des Vergleichsmikroskops derart ausgebildet sein, dass die Vergrößerung eines der beiden Bilder gegenüber der Vergrößerung des anderen Bildes um bis zu 6 Prozent, insbesondere um ± 6 bis ± 2 Prozent, insbesondere ± 5 oder ± 4 Prozent, verändert werden kann. Beispielsweise bietet das genannte Vergleichsmikroskop der Anmelderin die Möglichkeit, im Beobachtungsstrahlengang der zweiten Probe eine Vergrößerungskorrektur von ± 5 Prozent gegenüber dem Beobachtungsstrahlengang für die erste Probe einzustellen. Auf diese Weise können Stauungen und Verzerrungen, aber auch etwaige Kalibrierungsfehler kompensiert werden. Insbesondere können im überlagerten Bild die interessierenden Probenbereiche durch Veränderung der Vergrößerung weitgehend zur Deckung gebracht werden, um anschließend die Schnittkontur zu beschreiben.

[0039] Weitere Vorteile und Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung und der beiliegenden Zeichnung.

[0040] Es versteht sich, dass die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

[0041] Die Erfindung ist anhand eines Ausführungsbeispiels in der Zeichnung schematisch dargestellt und wird im Folgenden unter Bezugnahme auf die Zeichnung ausführlich beschrieben.

Figurenbeschreibung

[0042] **Fig. 1** zeigt ein Mikroskopsystem mit integrierter Lasermikrodissektionseinrichtung, das vorzugsweise den Ausgangspunkt der vorliegenden Erfindung darstellt, in schematischer Darstellung.

[0043] **Fig. 2** zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Lasermikrodissektionssystem zum zeitgleichen Sichten und Schneiden von Probenbereichen auf verschiedenen Proben.

[0044] Fig. 3 zeigt eine schematische Ansicht einer visualisierten Referenzprobe mit interessierendem Probenbereich und eines zeitgleich geschnittenen Probenbereichs auf einer anderen Probe.

[0045] Fig. 4 zeigt schematisch ein erfindungsgemäß mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung ausgestattetes Vergleichsmikroskop.

[0046] In den Figuren sind einander entsprechende Elemente mit identischen Bezugszeichen angegeben und werden nicht wiederholt erläutert.

[0047] In Fig. 1 ist ein mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung ausgestattetes Mikroskop, das als Mikroskopsystem bezeichnet werden soll, und das zur Durchführung der Erfindung verwendet werden kann, schematisch dargestellt und insgesamt mit **100** bezeichnet. Das Mikroskopsystem **100** bzw. die zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes einer Probe eingerichtete Lasermikrodissektionseinrichtung 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 **200** bezeichnet.

[0048] Das Mikroskopsystem **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.

[0049] Das Mikroskop **10** kann als Konfokal-, insbesondere als Spinning-Disk-Mikroskop ausgebildet sein und verfügt in diesem Fall über entsprechende weitere oder alternative Mittel (in Fig. 1 nicht dargestellt).

[0050] 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.

[0051] Ferner ist ein Triebknopf **14** vorgesehen. Dieser dient zur Bedienung eines Grob- und eines Feintriebs zur Einstellung einer Höhe eines Mikroskoptischs **30**. Eine Probe **51**, beispielsweise eine in einer entsprechenden Aufnahmeeinrichtung bzw. Halterung **52** angebrachte Gewebeprobe, kann hier-

durch in eine Objektebene 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.

[0052] Von der Probe **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. Die dazu notwendigen Verbindungen zum Steuerrechner **81** sind mit **83** bezeichnet.

[0053] Das Mikroskopsystem **100** weist eine Lasermikrodissektionseinrichtung **79** mit einer 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 **77** mit Laserstrahlachse 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** des Mikroskops **10**, das hier als Laserfokussierlinse dient, auf die Probe **51** fokussiert.

[0054] Bei dem Mikroskopsystem **100** kann der Ort, an dem der Laserstrahl **77** auf die Probe **51** in der Objektebene, und damit auch in den Probenbereich auftrifft, grundsätzlich auf unterschiedliche Weise eingestellt werden. Einerseits kann eine manuelle Verstelleinrichtung **31** vorgesehen sein, mittels derer der als Kreuztisch ausgebildete Mikroskoptisch **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.

[0055] Die Steuereinheit **82** kann auch beliebige weitere motorisierte Funktionen des Mikroskopsystems **100** steuern und insbesondere eine Schnittstelle zu einem externen Steuerrechner **81**, der über entsprechende Verbindungen **83** angebunden sein kann, bereitstellen. Die Steuereinheit **82** oder der Steuerrechner **81** kann auch beispielsweise mittels des Bildauswertungsmoduls **64** erhaltene Daten auswerten. Beispielsweise kann hierdurch eine Abfolge von Gewebeschichten oder anderer Strukturen, insbesondere ein interessierender Probenbereich der Probe **51** erkannt werden.

[0056] Für die Lasermikrodissektion kann insbesondere eine Laserablenkeinrichtung **73** vorgesehen sein. Mittels der Laserablenkeinrichtung **73** kann der Laserstrahl **77** 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 Teller ausgebildet sein kann, und wird damit auch an unterschiedlichen Positionen auf die Probe **51** in der Objektebene 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 **77** bzw. zur Positionierung der Probe **51** in der Objektebene gegenüber dem Laserstrahl **77** zum Einsatz kommen können. Die Erfindung ist nicht auf das dargestellte Beispiel beschränkt.

[0057] 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 Rotationseinrichtungen können über Positionsgeber **735** verfügen (hier nur an dem rechten Aktor **734** gezeigt). Eine durch die Positionsgeber **735** erfasste Position kann an die Steuereinheit **82** übermittelt werden.

[0058] Der Steuerrechner **81** enthält eine Schnittlinienmarkiereinrichtung **85**, mittels derer ein Benutzer beispielsweise über die gezeigte Computermaus **84** auf dem Bildschirm **88** des Steuerrechners **81** eine Soll-Schnittlinie **86** zeichnen kann. In diesem Beispiel ist die mikroskopisch visualisierte Probe **51** auf dem Bildschirm des Steuerrechners **81** dargestellt, wobei hier nur der ausgewählte interessierende Probenbereich **510** der Übersichtlichkeit halber zu sehen ist.

[0059] Ein Benutzer beschreibt eine Soll-Schnittlinie **86** um den interessierenden Probenbereich **510**. Die Schnittlinienmarkiereinrichtung stellt Schnittkontursignale zur Verfügung, die über die dargestellten Verbindungen **83** weitergeleitet werden können. Diese Schnittkontursignale enthalten die räumlichen Koordinaten der beschriebenen Soll-Schnittlinie **86**. Von der Steuereinheit **82** oder einer entsprechenden Steuereinheit **82'** einer parallelen Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** (vgl. **Fig. 2**) werden die Schnittkontursignale der Schnittlinienmarkiereinrichtung **85** in entsprechende Laserablenksignale für die Laserablenkeinrichtung **73** oder für andere Laserablenkeinrichtungen **79'**, **79''** **Fig. 2**) umgesetzt, mit denen

dann die jeweilige Laserablenkeinrichtung derart angesteuert wird, dass parallel zum Markieren der Soll-Schnittlinie **86** ein dem ersten Probenbereich **510** entsprechender Probenbereich ausgeschnitten wird. Werden die Schnittkontursignale an die Steuereinheit **82** des Mikroskopsystems **100** aus **Fig. 1** übertragen, würde parallel und zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie **86** der Laserstrahl **77** eine entsprechende Schnittlinie beschreiben und somit den interessierenden Probenbereich **510** aus der ersten Probe **51** ausschneiden. Das parallele Ausschneiden anderer Probenbereiche wird nunmehr in Verbindung mit **Fig. 2** erläutert.

[0060] **Fig. 2** zeigt eine Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Lasermikrodissektionssystems **300** mit einem Mikroskop **10** und einer Lasermikrodissektionseinrichtung **79'**. Eine weitere Lasermikrodissektionseinrichtung **79''** ist der Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** parallel geschaltet. Die Darstellung ist sehr schematisch; bezüglich näherer Details sei auf die Erläuterungen zu **Fig. 1** verwiesen.

[0061] Das Lasermikrodissektionssystem **300** weist zunächst ein Mikroskop **10** zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes (vgl. beispielsweise Bild auf Monitor **88** des Steuerrechners **81** gemäß **Fig. 1**) zumindest eines Ausschnitts einer in das Mikroskop eingebrachten ersten Probe **51** auf. Der Übersichtlichkeit halber ist von dem Mikroskop **10** im Wesentlichen nur das Mikroskopobjektiv **41** dargestellt. In der in **Fig. 2** dargestellten Ausführungsform hat das Mikroskop **10** keine eigene Lasermikrodissektionseinrichtung, wie sie in **Fig. 1** mit **79** bezeichnet ist. Des Weiteren ist der Monitor **88** des Steuerrechners **81** schematisch dargestellt. Anstelle des Monitors **88** kann hierbei beispielsweise auch die Bilderfassungseinheit **63** mit dem zugeordneten Bildauswertungsmodul **64** zum Einsatz kommen. Weiterhin kann alternativ oder zusätzlich das Bild auf der Benutzereingabe-/informationseinheit **13** angezeigt werden. Ist die Einheit als Touchscreen ausgebildet, so könnte die Schnittkontur **86** direkt mittels eines entsprechenden Stiftes auf dem Touchscreen beschrieben werden. Gleiches gilt selbstverständlich auch, wenn die Bilderfassungseinheit **63** oder der Monitor **88** über Touchscreens verfügen.

[0062] Weiterhin dargestellt ist in **Fig. 2** sehr schematisch die Schnittlinienmarkiereinrichtung **85**, die mit dem Monitor **88** hier wieder in Form des Steuerrechners **81** integriert ist (vgl. **Fig. 1**). Diese Schnittlinienmarkiereinrichtung **85** ermöglicht es, wie anhand von **Fig. 1** bereits erläutert, ein Benutzer, um einen interessierenden ersten Probenbereich **510** im mikroskopischen Bild der ersten Probe **51** eine Soll-Schnittlinie **86** zu beschreiben. Die Schnittlinienmarkiereinrichtung **85** stellt räumlichen Koordinaten der Soll-Schnittlinie **86** entsprechende Schnittkontursignale zur Verfügung. Diese Signale werden über die

Verbindungen **83** an eine Steuereinheit **82'** übertragen. Die Steuereinheit **82'** hat wie die anhand von **Fig. 1** erläuterte Steuereinheit **82** (auch) die Funktion, die Laserablenkeinrichtung **73'** in einer Weise anzu-steuern, dass der Fokus des zugeordneten durch die Laserfokussierlinse **41'** fokussierten Laserstrahls **77'** in der gewünschten Weise auf der Probe **53** verschoben wird, um einen entsprechenden Probenbereich **530** aus der Probe **53** auszuschneiden. Diese Funktion der Steuereinheit **82'** könnte auch von der Steuereinheit **82** übernommen werden, die dann entsprechend mit der Laserablenkeinrichtung **73'** verbunden sein könnte.

[0063] Die Laserablenkeinrichtung **73'** und die Schnittlinienmarkiereinrichtung **85** des Mikroskops **10** sind über die Steuereinheit **82'** zueinander parallel geschaltet und gekoppelt. Sobald ein Benutzer eine Soll-Schnittlinie **86** um einen interessierenden Probenbereich **510** zeichnet, werden die entsprechenden Positionssignale der Koordinaten dieser Soll-Schnittlinie **86** mit Hilfe der Steuereinheit **82'** in entsprechende Laserablenksignale für die Laserablenkeinrichtung **73'** umgesetzt, anhand derer der Laserstrahl **77'** in der anhand von **Fig. 1** erläuterten Art und Weise abgelenkt wird, um auf der Probe **53** eine Schnittlinie zu beschreiben, die zur Soll-Schnittlinie **86** korrespondiert. Auf diese Weise wird ein dem Referenzprobenbereich **510** entsprechender Probenbereich **530** ausgeschnitten.

[0064] In **Fig. 2** ist eine weitere Lasermikrodissektionseinrichtung **79''** mit Laserfokussierlinse **41''** dargestellt, die parallel zur Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** geschaltet ist und ebenfalls über die Steuereinheit **82'** mit dem Mikroskop **10** gekoppelt ist. Auf diese Weise kann parallel zur zweiten Probe **53** eine dritte Probe **54** geschnitten werden, wobei hier der zum Referenzprobenbereich **510** korrespondierende Probenbereich **540** ausgeschnitten wird.

[0065] In **Fig. 2** ist die Steuereinheit **82'** sowohl der Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** als auch der Einrichtung **79''** zugeordnet. Es ist selbstverständlich auch möglich, für jede Lasermikrodissektionseinrichtung eine eigene Steuereinheit vorzusehen, wobei dann die Schnittlinienmarkiereinrichtung **85** über die Verbindungen **83** mit den jeweiligen Steuereinheiten in Verbindung steht.

[0066] In **Fig. 3** ist die Referenzprobe oder erste Probe **51** und die zweite Probe **53** nochmals gesondert schematisch dargestellt. Die Referenzprobe **51** ist gefärbt und wird über das Mikroskop **10** geeignet beleuchtet und mikroskopisch visualisiert. Auf diese Weise lässt sich ein interessierender Probenbereich **510** (gestrichelt) vom Benutzer oder aber auch vom System (mittels geeigneter Bildverarbeitungssoftware) identifizieren. Die vom Benutzer oder vom System um den Probenbereich **510** zu beschreiben-

de Soll-Schnittlinie ist wieder mit **86** bezeichnet. Die zweite Probe **53** stammt insbesondere aus einem zur Probe **51** benachbarten Probenschnitt desselben Präparats. Die Proben **53** und **51** sind identisch ausgerichtet und die Koordinatensysteme sind untereinander abgeglichen. Der Probenbereich **530** entspricht im Wesentlichen dem interessierenden Probenbereich **510**, da er aus dem benachbarten Schnitt stammt. In der anhand von **Fig. 2** erläuterten Weise wird nun parallel und zeitgleich mit dem Markieren der Soll-Schnittlinie **86** der Probenbereich **530** mittels der vom Fokus des Laserstrahls **77'** erzeugten Schnittlinie **87** aus der Probe **53** geschnitten. Das so erzeugte Dissektat wird einer weiteren Analyse zugeführt. Zu beachten ist, dass die Probe **53** nicht gefärbt ist, so dass unverfälschte Analyseergebnisse erzielt werden können.

[0067] In **Fig. 3** sind außerdem drei Referenzpunkte **R1**, **R2** und **R3** zu sehen, anhand derer die Probe **51** im Koordinatensystem des Mikroskops justiert werden kann. Die entsprechenden Referenzpunkte auf der Probe **53** sind mit **R1'**, **R2'**, und **R3'** bezeichnet. Nach Abgleich der Koordinatensysteme haben die Referenzpunkte **R1'**, **R2'** und **R3'** die selben Koordinaten wie die Referenzpunkte **R1**, **R2** und **R3**.

[0068] Bevor auf eine besonders vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Lasermikrodissektionssystems gemäß **Fig. 4** eingegangen wird, sei betont, dass zunächst selbstverständlich das Mikroskop **10** gemäß **Fig. 2** auch mit einer eigenen Lasermikrodissektionseinrichtung **79** ausgestattet sein kann. Diese Ausführungsform ist in **Fig. 1** dargestellt. Zum Anderen sei betont, dass in die Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** (gleiches gilt für **79''**) ein eigenes Mikroskop **10'** integriert werden kann. Die Laserfokussierlinse **41'** stellt in diesem Fall das Mikroskopobjektiv des Mikroskops **10'** dar. Auch dieser Aufbau entspricht einer Ausführungsform der **Fig. 1**. Dieser Fall soll nun anhand von **Fig. 4** näher erläutert werden.

[0069] Das Lasermikrodissektionssystem **300** gemäß **Fig. 4** weist zwei Mikroskope **10**, **10'** auf. Beide Mikroskope **10**, **10'** sind über eine optische Vergleichsbrücke **310** nach Art eines an sich bekannten Vergleichsmikroskops verbunden. Über einen Beobachtertubus **320** kann ein Benutzer auf verschiedene Weise Einblick in die jeweiligen mikroskopischen Bilder nehmen. Zum Einen kann jeweils genau eines der beiden Bilder betrachtet werden, zum Anderen kann ein Überlagerungsbild beider Bilder (sogenanntes Mischbild) dargestellt werden. Schließlich kann in einer dritten Alternative ein Ausschnitt des ersten Bildes neben einem Ausschnitt des zweiten Bildes dargestellt werden. Hierbei kann der Ausschnitt des zweiten Bildes den Ausschnitt des ersten Bildes ergänzen, so dass beispielsweise ein Probenbereich als sogenanntes Schnittbild dargestellt wird, dessen

linker Ausschnitt von der ersten Probe und dessen rechter Ausschnitt von der zweiten Probe stammt. Die Trennlinie zwischen den Ausschnitten kann vom Benutzer eingestellt werden.

[0070] Mittels dieser optischen Vergleichsbrücke **310** kann insbesondere in einfacher Weise ein Abgleich der Koordinatensysteme der Mikroskoptische **30** und **30'** erfolgen. Hierzu wird beispielsweise der interessierende Probenbereich der ersten, vom Mikroskop **10** abgebildeten Probe und der entsprechende Probenbereich der zweiten, vom Mikroskop **10'** abgebildeten Probe in Form eines Mischbildes (Überlagerungsbildes) mittels des Beobachtertubus **320** dargestellt. Beispielsweise durch Eingabe an der Benutzereingabeeinheit **13'** lässt sich der Mikroskopisch **30'**, der den Tisch der Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** darstellt, computergesteuert räumlich derart verstellen, dass beide interessierenden Probenbereiche exakt gleich ausgerichtet sind. Hierzu dienen insbesondere die bereits anhand von **Fig. 3** besprochenen Referenzpunkte R1 bis R3 sowie R1' bis R3'.

[0071] Das Mikroskop **10'** ist mit einer eigenen Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** ausgestattet. Im Wesentlichen entspricht also das Mikroskopsystem aus Mikroskop **10'** und Lasermikrodissektionseinrichtung **79'** dem in **Fig. 1** dargestellten Mikroskopsystem **100**. Das Mikroskop **10** ist nicht mit einer eigenen Lasermikrodissektionseinrichtung ausgestattet.

[0072] Über die Benutzereingabe-/informationseinheiten **13, 13'**, die insbesondere als Touchscreen ausgebildet sein können, kann ein Benutzer Eingaben vornehmen und sich das mikroskopische Bild der jeweiligen Probe anzeigen lassen. Auf diese Weise kann beispielsweise ein Benutzer mit einem entsprechenden Stift auf der Einheit **13** in dem angezeigten Probenbild um einen interessierenden Probenbereich **510** herum eine Soll-Schnittlinie **86** beschreiben. Bezüglich des weiteren Ablaufs des parallelen Schneidens einer im Mikroskop **10'** befindlichen zweiten Probe sei auf die Erläuterungen zu **Fig. 2** verwiesen.

Bezugszeichenliste

10, 10'	Mikroskop
11, 11'	Mikroskopfuß
12	Beleuchtungseinrichtung
13, 13'	Benutzereingabe-/informationseinheit
14, 14'	Triebknopf
15, 15'	Schutzhaube
30, 30'	Mikroskoptisch
31	manuelle Verstelleinrichtung
40	Objektivrevolver
41	Objektiv
41', 41''	Laserfokussierlinse, Objektiv

42	Objektiv
43	Beobachtungsstrahlengang
51	Probe, Referenzprobe
52	Aufnahmeeinrichtung
53	Probe
54	Probe
510	Probenbereich, Referenzprobenbereich
530	Probenbereich
540	Probenbereich
60	Tubuseinheit
61	Auskoppeleinrichtungen
62	Okularpaar
63	Bilderfassungseinheit
64	Bildauswertungsmodul
70, 70'	Lasereinheit
71	Umlenkspiegel
72, 72'	Umlenkspiegel
73, 73', 73''	
74	Umlenkspiegel
75	Laserlichtquelle
76	Auflichteinheit
77, 77', 77''	
78, 78'	Strahlteileranordnung
79, 79', 79''	
731	Keilplatten
732	Kugellager
733	Zahnrad
734	Aktor
735	Positionsgeber
81	Steuerrechner
82, 82'	Steuereinheit
83	Verbindungen
84	Computermaus
85	Schnittlinienmarkiereinrichtung
86	Soll-Schnittlinie
87	Schnittlinie
88	Monitor
90	Kondensoreinheit
100	Mikroskopsystem
200	Koordinatensystem
300	System zur Lasermikrodissektion
310	optische Vergleichsbrücke
320	Beobachtertubus mit Okular
R1, R2, R3	Referenzpunkte
R1', R2', R3'	Referenzpunkte
a	Beobachtungsstrahlengangachse
b	Laserstrahlachse
c, c', c''	optische Achse

Patentansprüche

1. System (**300**) zur Lasermikrodissektion mit einer Lasermikrodissektionseinrichtung (**79'**) und mit einem mit dieser Lasermikrodissektionseinrichtung (**79'**) über eine Steuereinheit (**82'**) gekoppelten Mikroskop (**10**), wobei das Mikroskop (**10**) zur Erzeu-

gung eines mikroskopischen Bildes zumindest eines Ausschnitts einer in das Mikroskop (10) eingebrachten ersten Probe (51) eingerichtet ist und eine Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) zum Markieren einer Soll-Schnittlinie (86) um einen interessierenden ersten Probenbereich (510) im mikroskopischen Bild der ersten Probe (51) aufweist,

die Lasermikrodissektionseinrichtung (79') eine Laserablenkeinrichtung (73') zum Verschieben eines Auftreffpunkts eines Laserstrahls auf einer zweiten Probe (53) zum Ausschneiden eines Probenbereichs (530) aus dieser zweiten Probe (53) aufweist, und wobei

die Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) des Mikroskops (10) mit der Laserablenkeinrichtung der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') über die Steuereinheit (82') derart gekoppelt sind, dass bei einem Markieren der Soll-Schnittlinie (86) um den ersten Probenbereich (510) mittels der Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) des Mikroskops (10) die Laserablenkeinrichtung (73') der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') derart angesteuert wird, dass zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie der Auftreffpunkt des Laserstrahls auf der zweiten Probe (53) entlang einer Schnittlinie entsprechend der Soll-Schnittlinie automatisch verschoben wird, um einen dem ersten Probenbereich (510) entsprechenden zweiten Probenbereich (530) aus der zweiten Probe (53) auszuschneiden.

2. System (300) nach Anspruch 1, wobei das System (300) Mittel zum Abgleichen des Koordinatensystems eines Tisches (30) des Mikroskops (10) zum Tragen der ersten Probe (51) mit dem Koordinatensystem eines Tisches (30') der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') zum Tragen der zweiten Probe (53) aufweist.

3. System (300) nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Mikroskop (10) eine eigene weitere Lasermikrodissektionseinrichtung (79) aufweist, die derart eingerichtet ist, dass beim Markieren einer Soll-Schnittlinie um den ersten Probenbereich (510) dieser erste Probenbereich (510) aus der ersten Probe (51) ausgeschnitten wird.

4. System (300) nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Lasermikrodissektionseinrichtung (79') zur Erzeugung eines mikroskopischen Bildes zumindest eines den zweiten Probenbereich (530) umfassenden Ausschnitts der zweiten Probe (53) eingerichtet ist.

5. System (300) nach Anspruch 4, wobei das Mikroskop (10) und die Lasermikrodissektionseinrichtung (79') über eine optische Vergleichsbrücke (310) miteinander verbunden sind, wobei die optische Vergleichsbrücke (310) zur Darstellung der jeweiligen mikroskopischen Bilder der ersten Probe (51) und der zweiten Probe (53) eingerichtet ist.

6. System (300) nach Anspruch 5, wobei die optische Vergleichsbrücke (310) zur Darstellung

- jeweils eines der beiden mikroskopischen Bilder,
- eines Überlagerungsbildes beider Bilder und/oder
- eines Ausschnitts des ersten Bildes neben einem Ausschnitt des zweiten Bildes über einen dem Mikroskop (10) und der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') gemeinsamen Beobachtertubus (320) und/oder über eine gemeinsame Kamera eingerichtet ist.

7. System (300) nach Anspruch 5 oder 6, soweit auf Anspruch 2 zurückbezogen, wobei die Mittel zum Abgleichen der Koordinatensysteme die optische Vergleichsbrücke (310) umfassen.

8. System (300) nach Anspruch 6 oder 7, wobei die optische Vergleichsbrücke (310) derart ausgebildet ist, dass die Vergrößerung eines der beiden Bilder der ersten und der zweiten Probe (51, 53) gegenüber der Vergrößerung des anderen Bildes um bis zu 6% verändert werden kann.

9. Verfahren zur Lasermikrodissektion, bei dem eine erste Probe (51) in ein Mikroskop (10) eingebracht wird, um ein mikroskopisches Bild zumindest eines Ausschnitts dieser ersten Probe (51) zu erzeugen, eine zweite Probe (53) in eine Lasermikrodissektionseinrichtung (79') eingebracht wird, wobei eine Laserablenkeinrichtung (73') der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') derart angesteuert wird, dass durch Verschieben des Auftreffpunktes eines Laserstrahls auf der zweiten Probe (53) ein Probenbereich (530) aus dieser zweiten Probe (53) ausgeschnitten wird, eine Soll-Schnittlinie (86) um einen interessierenden ersten Probenbereich (510) auf dem Bild der ersten Probe (51) mittels einer Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) des Mikroskops (10) markiert wird, wobei die Schnittlinienmarkiereinrichtung (85) des Mikroskops (10) und die Laserablenkeinrichtung (73') der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') derart gekoppelt sind, dass bei einem Markieren der Soll-Schnittlinie (86) um den ersten Probenbereich (510) der ersten Probe (51) zeitgleich ein zweiter Probenbereich (530) entlang einer Schnittlinie, die der Soll-Schnittlinie (86) entspricht, aus der zweiten Probe (53) ausgeschnitten wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem als erste Probe (51) und als zweite Probe (53) parallele, insbesondere benachbarte Probenschnitte desselben Präparats verwendet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, bei dem die erste Probe (51) als Referenzprobe verwendet wird und das Koordinatensystem eines die zweite Probe (53) tragenden Tisches der Lasermikrodissektionseinrichtung (79') mit dem Koordinatensystem ei-

nes die erste Probe (**51**) tragenden Tisches des Mikroskops (**10**) abgeglichen wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, bei dem der Abgleich der Koordinatensysteme mittels mindestens einem auf der ersten Probe (**51**) befindlichen Referenzpunkt (R1, R2) und mindestens einem auf der zweiten Probe (**53**) befindlichen Referenzpunkt (R1', R2') vorgenommen wird, die sich in den abgeglichenen Koordinatensystemen jeweils an derselben Stelle befinden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, bei dem von der in die Lasermikrodissektionseinrichtung (**79'**) eingebrachten zweiten Probe (**53**) ein mikroskopisches Bild erzeugt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem das mikroskopische Bild der ersten Probe (**51**) und das mikroskopische Bild der zweiten Probe (**53**) überlagert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, bei dem die Soll-Schnittlinie (**86**) um den ersten Probenbereich (**510**) in dem überlagerten Bild markiert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem das mikroskopische Bild der ersten Probe (**51**) ganz oder ausschnittsweise neben dem Bild oder einem Ausschnitt des Bildes der zweiten Probe (**53**) dargestellt wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, bei dem eine dritte Probe (**54**) in eine dritte Lasermikrodissektionseinrichtung (**79''**) eingebracht wird, um einen dritten Probenbereich (**540**) aus dieser dritten Probe (**54**) auszuschneiden, wobei zeitgleich zum Markieren der Soll-Schnittlinie (**86**) um den ersten Probenbereich (**510**) der ersten Probe (**51**) automatisch der dem ersten Probenbereich (**510**) entsprechende dritte Probenbereich (**540**) aus der dritten Probe (**54**) ausgeschnitten wird.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Fig. 1

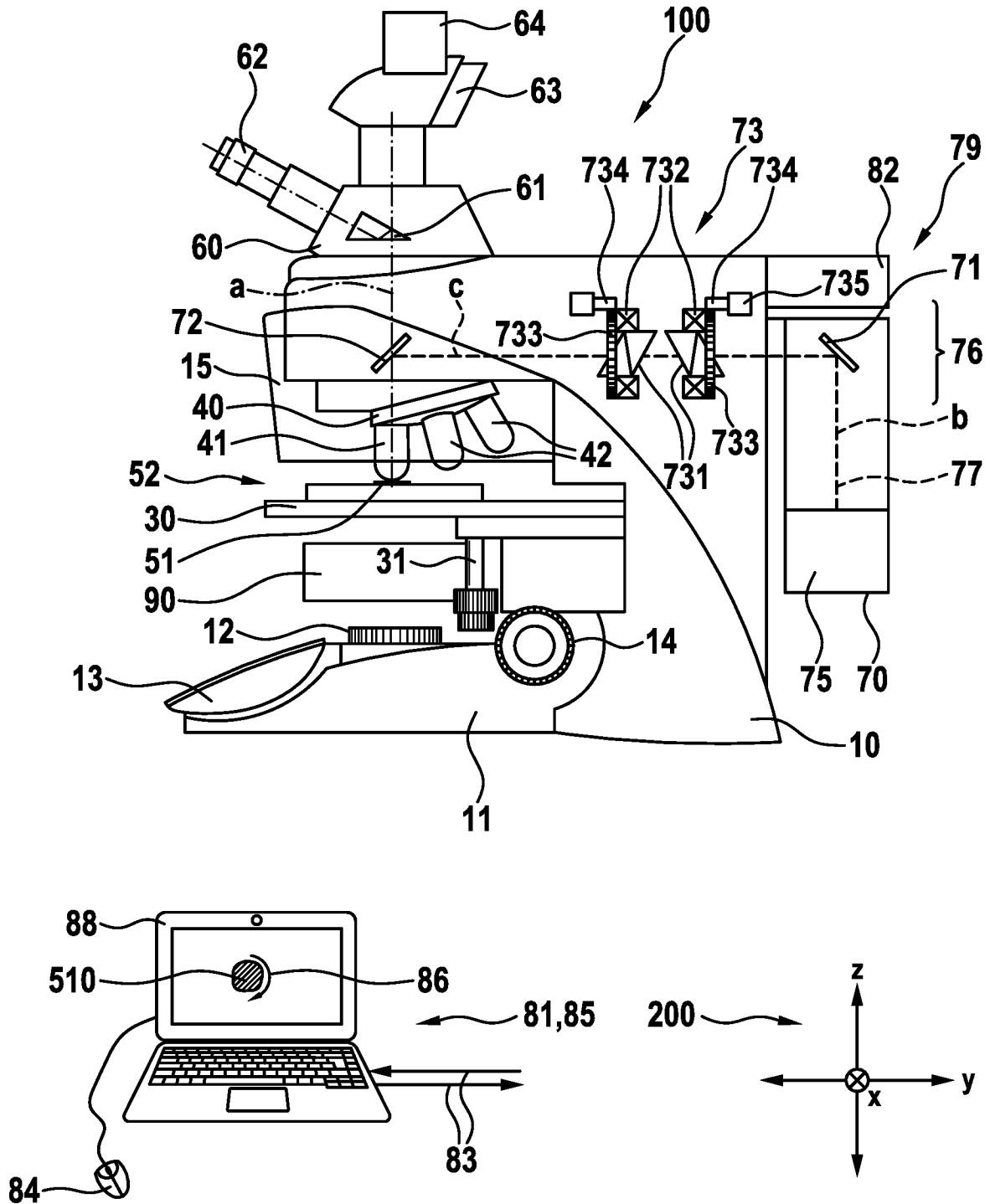


Fig. 2

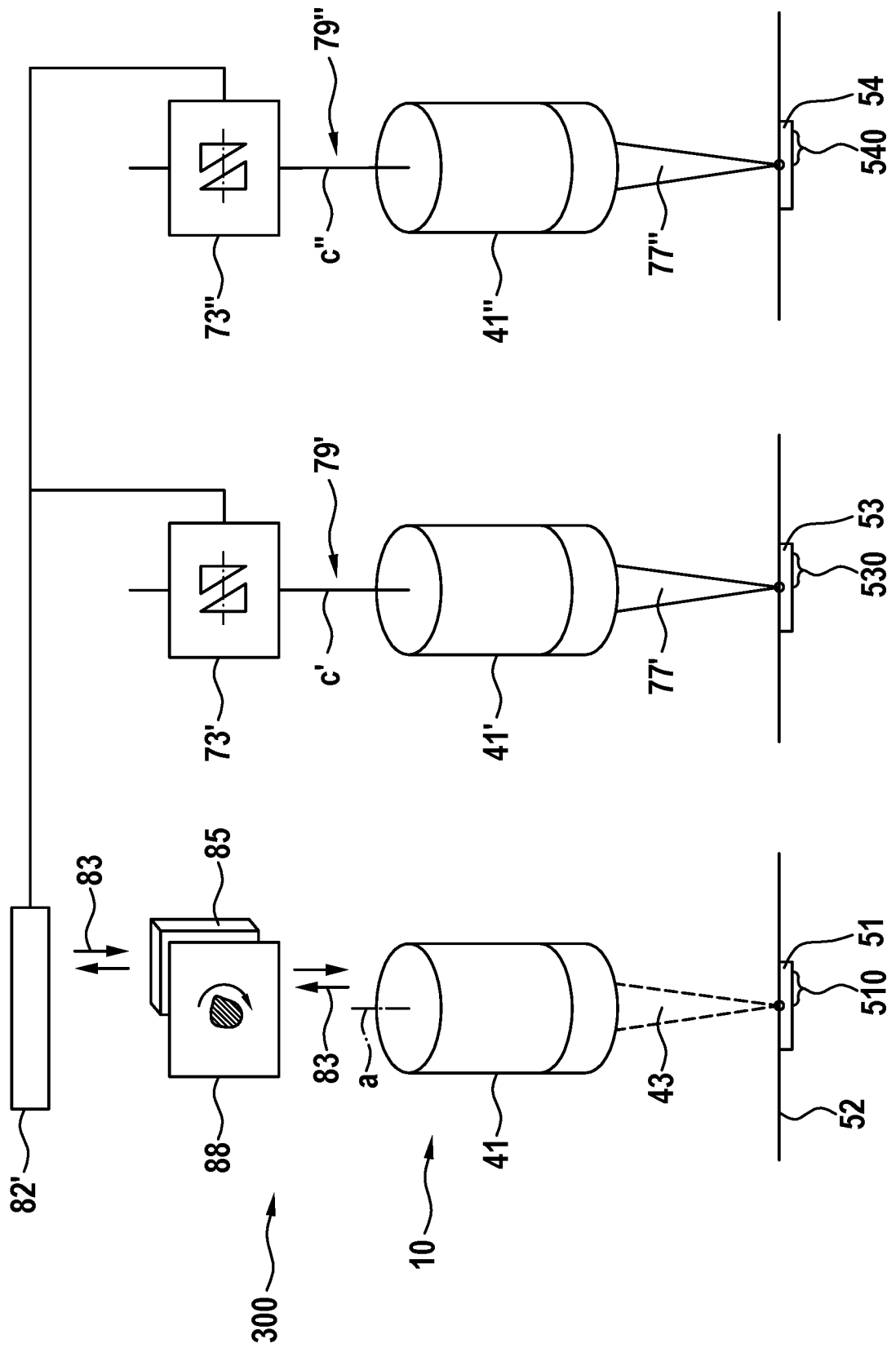
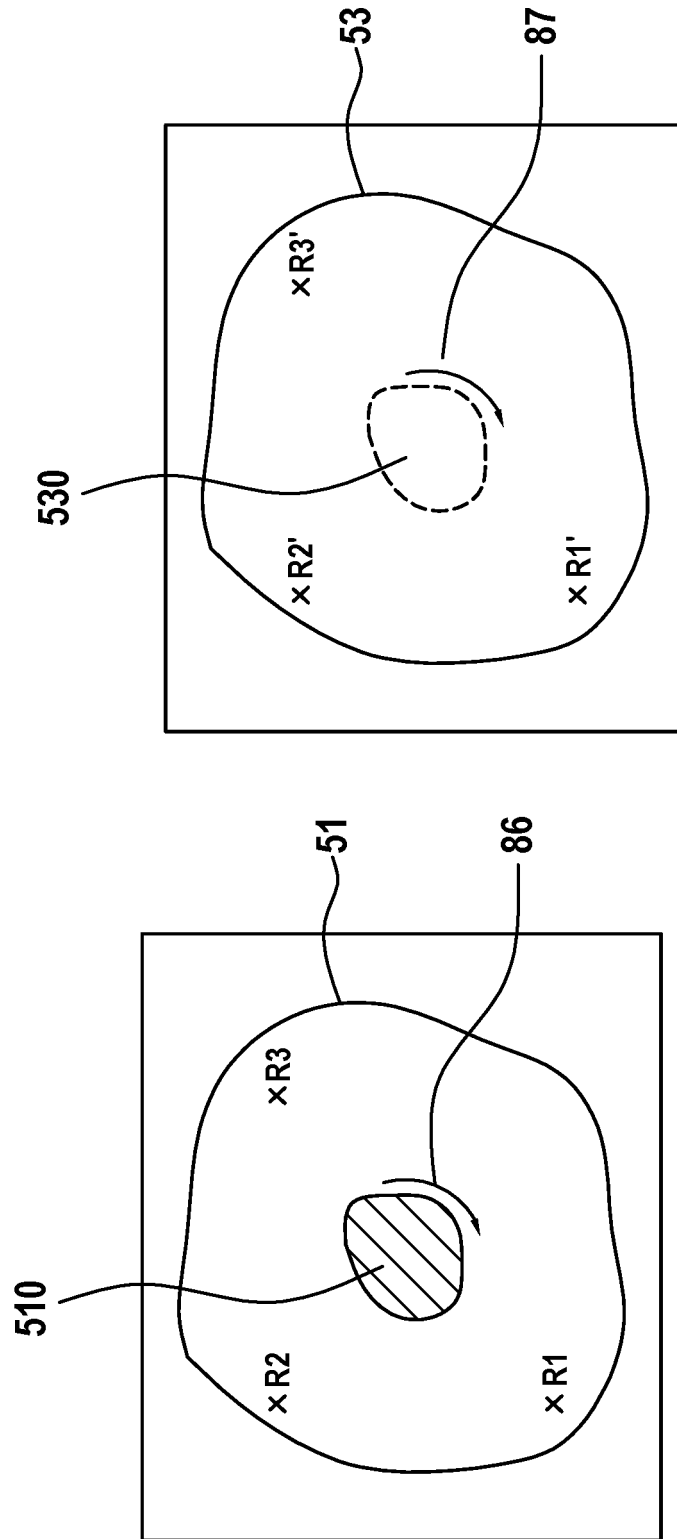


Fig. 3



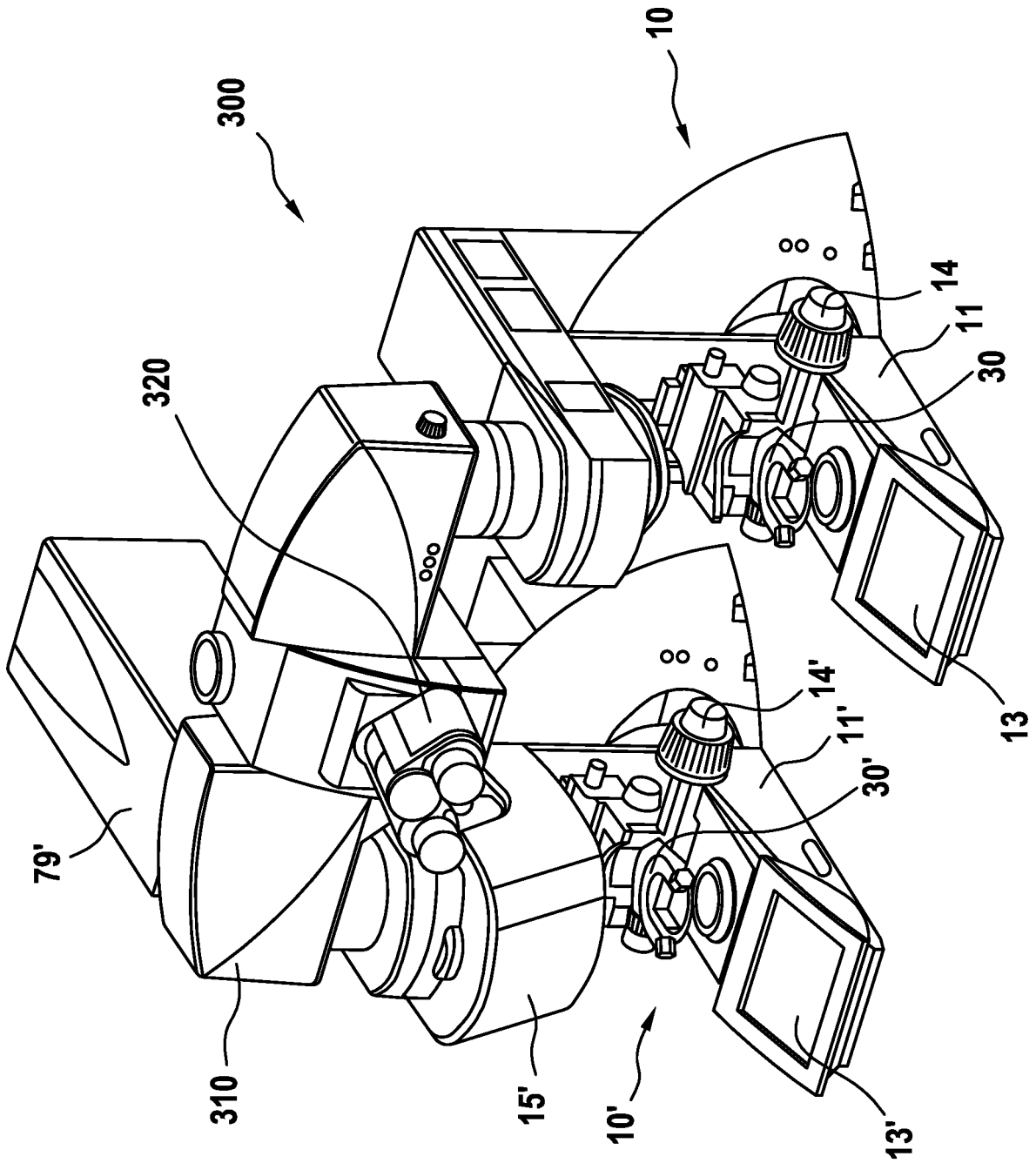


Fig. 4