



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 408 922 B**

PATENTCHRIFT

(12)

(21) Anmeldenummer: 1654/99
(22) Anmeldetag: 27.09.1999
(42) Beginn der Patentdauer: 15.08.2001
(45) Ausgabetag: 25.04.2002

(51) Int. Cl.⁷: **G02B 21/34**
G01N 21/64, 33/48

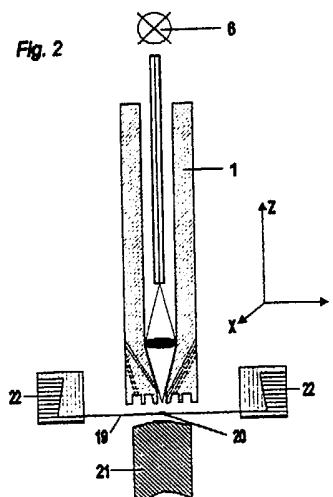
(56) Entgegenhaltungen:
DE 3415534A1 US 4508435A

(73) Patentinhaber:
DIETL PAUL DR.
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).
FRICK MANFRED MAG.
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).
HALLER THOMAS DR.
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).
MAIR NORBERT MAG.
A-6020 INNSBRUCK, TIROL (AT).

(54) EINRICHTUNG ZUR VORZUGSWEISE MIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG VON OBJEKTEN, INSBESONDERE ZELLEN

AT 408 922 B

(57) Einrichtung zur vorzugsweise mikroskopischen Untersuchung von Objekten, insbesondere Zellen, welche auf einem Träger angeordnet sind, wobei der Träger (19) elastisch und dehnbar ausgebildet ist, wobei eine einen Beobachtungsbereich (8) umgebende, vorzugsweise plane Auflage (9) für den Träger (19) sowie eine Dehneinrichtung (11, 13) vorgesehen sind, über die der elastisch und dehnbar ausgebildete Träger (19) entlang der Auflage vom Beobachtungsbereich (8) nach außen dehnbar ist. Die Einrichtung kann Bestandteil eines Mikroskops sein, mit dem das im Beobachtungsbereich (8) angeordnete Objekt (20), insbesondere Zelle, während der Dehnung des Trägers (19) beobachtbar ist.



Die Erfindung betrifft eine Einrichtung zur Untersuchung von Objekten, insbesondere Zellen, welche auf einem Träger angeordnet sind.

Ein interessantes Forschungsgebiet ist die Untersuchung von Lungenalveolarzellen, die während der Einatmung gedehnt werden und auf diesen Stimulus hin einen sogenannten Surfactant, ein lipidhaltiges Material zur Reduktion der Oberflächenspannung, in den Alveolarraum abgeben. Dieser Vorgang ist lebenswichtig, da man sonst nicht einatmen kann („Steife Lunge“ bei Frühgeborenen). Es sind bisher keine experimentellen Methoden bekannt, mit denen man einzelne isolierte lebende Lungenzellen zugleich dehnen und mit dem Mikroskop untersuchen kann. Rasche Vorgänge, wie etwa die Ausscheidung von Surfactant, muß man aber synchron mit der Dehnung untersuchen können, will man nicht auf wertvolle Information verzichten. Zudem ist die Fluoreszenzmikroskopie ein extrem rasch wachsendes Gebiet und immer mehr Lebensvorgänge können durch geeignete Fluoreszenzmarker in „Real Time“ (Echtzeit) untersucht werden. Beispielsweise wurde eine Fluoreszenzmikroskopie-Methode entwickelt, mit der man die Ausschüttung von Surfactant mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung untersuchen kann.

Aufgrund der wachsenden Fluoreszenz- (wie auch anderer) Mikroskopie ist das Bestreben, Simultandehnung von Zellen und deren mikroskopische Untersuchung auf Einzelniveau durchzuführen, nicht nur auf das Gebiet der Lunge beschränkt, sondern betrifft grundsätzlich alle Organe, die Dehnungen ausgesetzt sind, also Gefäße, Magen-Darm-Trakt, Respirationstrakt und natürlich auch Nervengewebe (Dehnungsrezeptoren). Grundsätzlich könnte auch nicht biologisches Material während der Dehnung untersucht werden.

Die Problematik bei der Untersuchung kleiner Objekte, insbesondere von lebenden Zellen (vorzugsweise mit mikroskopischen Methoden) während mechanischer Belastung besteht in Fokussier- (z-Achse) und Positionierungs- (x, y-Achse) Problemen, das heißt, daß bei der Dehnung die zu beobachtenden Objekte aus dem Fokus bzw. dem Meßareal (Beobachtungsbereich) verschoben werden. Zudem besteht das Problem, daß man für den Fall, daß konzentrische Dehnungen gewünscht sind, nur im Mittelpunkt des zu dehnenden Areals arbeiten kann.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Einrichtung der eingangs genannten Gattung zu schaffen, mit der die Objekte, beispielsweise einzelne Zellen, vorzugsweise homogen (also konzentrisch) gedehnt werden können, ohne dabei aus dem Bild zu verschwinden. Dies soll bevorzugt auch bei einer mikroskopischen Beobachtung mit hoher Vergrößerung (beispielsweise bis zu 1000-fach) möglich sein.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß der Träger elastisch und dehnbar ausgebildet ist und daß eine einen Beobachtungsbereich umgebende, vorzugsweise plane Auflage für den Träger sowie eine Dehneinrichtung vorgesehen sind, über die der elastisch und dehnbar ausgebildete Träger entlang der Auflage vom Beobachtungsbereich nach außen dehnbar ist.

Es wird also das zu untersuchende Objekt, beispielsweise eine lebende Zelle, auf einem flexiblen dehnbaren Träger, beispielsweise einer elastischen transparenten Membran, angeordnet, wobei die den Beobachtungsbereich umgebende Auflage dafür sorgt, die Membran (in der x-y-Ebene) plan zu halten, wenn die Dehneinrichtung das Objekt, insbesondere die Zelle, während der Beobachtung dehnt, indem sie den Träger, auf dem das Objekt liegt, vorzugsweise unter Dehnung radial nach außen zieht. Durch diese Auflage kann während der Dehnung die Fokussierung, also die Lage in der Beobachtungsrichtung (z-Achse) erhalten bleiben.

Um während der Dehnung auch die Lage des Objektes in der auf die Beobachtungsrichtung senkrechten x-y-Richtung beizubehalten, ist es besonders günstig, das zu beobachtende Objekt, insbesondere eine lebende Zelle, genau im Zentrum des Beobachtungsbereiches anzuordnen und die Dehneinrichtung so auszubilden, daß sie den elastischen Träger von diesem Zentrum aus allseitig radial nach außen zieht. Damit erreicht man einerseits eine homogene (also konzentrische) Dehnung des zu untersuchenden Objektes, und es wird außerdem ohne Nachstellmechanismen erreicht, daß dieses Objekt während der mikroskopischen Beobachtung und Dehnung nicht seitlich aus dem Bild verschwindet.

Zur Ausrichtung des Objektes an der gewünschten Stelle des Beobachtungsbereiches, insbesondere in dessen Zentrum, kann bevorzugt eine Einrichtung zum Erzeugen einer optischen Markierung, insbesondere eines fokussierten Lichtpunktes, vorgesehen sein.

Die Dehnung der flexiblen elastischen Membran kann grundsätzlich auf verschiedene Art und Weise geschehen. Besonders günstig ist eine Dehnung mittels Unterdruck, bei der die Membran in

eine den Beobachtungsbereich umgebende Vertiefung gesaugt wird und sich damit im dazwischen liegenden Beobachtungsbereich dehnt. Bei einer ringförmigen Vertiefung kann man eine homogene, radiale Dehnung vom Zentrum des Beobachtungsbereiches aus erzielen.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung sind anhand der nachfolgenden Figurenbeschreibung näher erläutert.

Die Fig. 1 zeigt in einem schematischen Längsschnitt die zentrale Komponente eines Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Einrichtung, die Fig. 1a zeigt eine schematische Schnittansicht von oben, die Fig. 1b zeigt eine schematische Schnittansicht von unten, die Fig. 2 zeigt zusätzlich das Objektiv eines inversen Mikroskops sowie die im Objektträger dieses Mikroskops eingespannte Membran (als flexiblen und dehnbaren Träger für eine daraufliegende Zelle), die Fig. 2a zeigt den unteren Bereich der in Fig. 1 und 2 dargestellten rohrförmigen zentralen Komponente, wobei der flexible dehnbare Träger durch Applikation von Unterdruck gedehnt ist, die Fig. 3 zeigt schematisch das Verschieben einer Zelle bei Dehnung, wenn diese sich nicht im Zentrum des Beobachtungsbereiches befindet, die Fig. 4 zeigt ein Ausführungsbeispiel, welches mit Fluoreszenzlicht arbeitet, die Fig. 5 zeigt eine Variante für die Ausbildung der Form der mit Unterdruck beaufschlagbaren Vertiefungen, die Fig. 6 zeigt eine weitere solche Variante, ebenfalls in einer Unteransicht auf die zentrale Komponente der erfindungsgemäßen Einrichtung, wobei bei diesem Ausführungsbeispiel eine lineare Dehnung des Trägers bzw. der Membran unabhängig voneinander in zwei aufeinander senkrechte Richtungen erfolgen kann.

Die Fig. 1, 1a und 1b zeigen die zentrale Komponente eines Ausführungsbeispiels einer erfindungsgemäßen Einrichtung in einem zentralen Längsschnitt bzw. in einer Schnittansicht von oben und unten. Diese zentrale Komponente umfaßt einen hohlen, rohrförmigen Körper 1, beispielsweise aus Metall oder Kunststoff.

Im hohlen Inneren 2 dieses rohrförmigen Körpers 1 ist eine optische Markiereinrichtung (allgemein mit 3 bezeichnet) angeordnet, die einen Lichtleiter 4 und eine Sammellinse 5 umfaßt. Das von einer schematisch angedeuteten Lichtquelle 6 ausgehende Licht wird durch die Sammellinse auf das Zentrum 7 des Beobachtungsbereiches 8 fokussiert und bildet dort beispielsweise einen Lichtpunkt ab.

Weiters umfaßt der rohrförmige Körper 1 eine den freien Beobachtungsbereich 8 umgebende Auflage 9 in Form eines ringförmigen Steges. An diesen ringförmigen Steg schließen sich zwei konzentrische Vertiefungen 11 und 12 an, die jeweils gesondert über Kanäle 13 und 14 und nicht näher dargestellte Leitungen 15 und 16 mit Unterdruckquellen (beispielsweise Saug- oder Vakuumpumpen) verbindbar sind.

Außerdem weist der Körper 1 einen Zufuhrkanal für ein Fluid, beispielsweise als Träger für ein Hormon, auf, das dem zu untersuchenden Objekt, beispielsweise einer Zelle, während der Dehnung zuführbar ist. Dieser Zufuhrkanal ist mit 17 bezeichnet, ein entsprechender Abfuhrkanal ist mit 18 bezeichnet.

Die Fig. 2 zeigt den rohrförmigen Körper der Fig. 1 in einer Anwendung mit einem inversen Mikroskop, bei dem das Objektiv 21 unterhalb des elastischen, transparenten Trägers 19 angeordnet ist, auf dem die zu beobachtende Zelle festhaftet. Diese elastische, flexible Membran 19 ist im Objektträger 22 des Mikroskops gehalten und kann damit in x-y-Richtung gegenüber dem Objektiv verstellt werden. Damit ist es möglich, eine ausgewählte Zelle 20 in den Beobachtungsbereich des Objektivs zu bringen und das Objektiv darauf zu fokussieren.

Daraufhin wird der Körper 1, der über einen nicht dargestellten Manipulator in alle drei Raumrichtungen x, y, z bewegbar ist, derart auf die flexible Membran bzw. Träger 19 abgesenkt, daß der fokussierte Lichtpunkt der Beleuchtungseinrichtung im Inneren mit der Lage der bezüglich des Objektivs 21 bereits zentrierten Zelle zusammenfällt. Damit liegt das Zentrum des Beobachtungsbereiches 8 im Zentrum des Objektivs, und auch der Körper 1 ist diesbezüglich zentriert.

Nachdem diese Komponenten relativ zu einander ausgerichtet bzw. zentriert worden sind, wird nun die Membran 19 durch Anlegen eines Unterdrucks in der äußeren ringförmigen Vertiefung 12 über die Saugleitung 14 etwas eingesaugt ohne einen Zug auf die Zelle auszuüben, und somit die

zu beobachtende Zelle 20 im Zentrum gehalten.

Die Dehnung des Trägers 19 bzw. der Membran erfolgt dann durch Anlegen eines Unterdrucks in die innere Kammer 11 über die Leitung 13. Dadurch wird die Membran, welche außen gehalten ist, in die Vertiefung 11 gesaugt und an der Anlage 9 vorbei radial nach außen gezogen, wie dies die Pfeile 23 andeuten. Die zu beobachtende Zelle im Zentrum des Beobachtungsbereiches bleibt dabei sowohl in der Höhenlage (z-Richtung, Fokussierung) als auch in der seitlichen Lage (x-y-Positionierung) erhalten. Sie wird lediglich samt der gedehnten Unterlage gedehnt und kann dabei gleichzeitig über das Mikroskop mit dem Objektiv 21 beobachtet werden. Der Vergrößerungsbereich liegt typischerweise zwischen 200-fach bis 1100-fach, vorzugsweise zwischen 400-fach bis 1000-fach.

Die Fig. 3 zeigt drei verschiedene Zellagen vor (ausgezogene Linien) und nach (strichlierte Linien) der Dehnung.

Liegt die Zelle wie in der Position A im Zentrum, kommt es bei der Dehnung zu einer konzentrischen Dehnung der Zelle, ohne daß eine störende x-y-Verschiebung auftritt. Bei den exzentrischen Lagen B und C wird die Zelle nicht nur gedehnt, wenn der Träger gedehnt wird, sie wandert auch zur Seite, was bei einer Beobachtung mit dem Mikroskop vor allem bei hoher Vergrößerung zu einem Verschwinden aus dem Bild führt.

Die erfindungsgemäße Idee kann nicht nur bei einer mikroskopischen Untersuchung mittels eines Lichtmikroskops (wobei auch andere Mikroskope als inverse Mikroskope möglich sind), sondern beispielsweise auch bei einer fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung angewandt werden. Dabei wird der rohrförmige Körper 1 bzw. Aufsatz ebenfalls an eine elastische Membran 19 als Träger für eine in Fig. 4 nicht näher dargestellte zu beobachtende Zelle herangeführt. Über eine Anregungslichtquelle 24 gelangt Licht über den Lichtleiter auf die zu untersuchende, mit geeigneten Fluoreszenzmarkern versehene Zelle. Das Fluoreszenzlicht gelangt dann zurück ebenfalls über den Lichtleiter 4 an ein Spektrometer 25 zur Auswertung. Wiederum stellt die gesamte Einrichtung sicher, daß bei Dehnung der Membran 19 (Träger für die zu beobachtende Zelle) eine gleichzeitige Beobachtung des sich verändernden Fluoreszenzlichts möglich ist.

Die Fig. 5 zeigt eine Schnittansicht auf einen rohrförmigen Körper 1', der ähnlich aufgebaut ist wie der Körper 1 der vorhergehenden Figuren. Es handelt sich dabei allerdings nicht um einen im Querschnitt kreisförmigen, sondern im Querschnitt quadratischen Körper. Auch hier umgibt eine Auflage 9' den Beobachtungsbereich 8'. Eine über die Leitung 13 mit Unterdruck beaufschlagbare Vertiefung 11' zieht eine nicht dargestellte Membran hinein und kann damit zu einer Dehnung derselben im Beobachtungsbereich 8' führen. Eine äußere Vertiefung 12', die über eine Leitung 14 mit Unterdruck beaufschlagbar ist, kann bei der Vorjustierung und dem Festhalten dieser nicht dargestellten Membran helfen, ganz ähnlich wie dies im Zusammenhang mit der Fig. 2a bereits beschrieben worden ist.

Mit der Erfindung sind nicht nur homogene, also konzentrische Dehnungen von einem zentralen Punkt aus möglich, vielmehr sind auch beispielsweise lineare Dehnungen in bevorzugte Richtungen möglich. Dazu ist das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 6 geeignet. Die äußere Vertiefung 12'' mit der Absaugleitung 14'' erfüllt dabei dieselbe Zellfunktion wie bei den vorhergehenden Ausführungsbeispielen, nämlich ein vorläufiges Halten einer elastischen Membran bzw. eines Trägers für das zu beobachtende Objekt. Die eigentliche Dehnung des Trägers bzw. der Membran im mittleren Beobachtungsbereich 8'' erfolgt dann durch Beaufschlagung der Bereiche 26a und 26b bzw. 27a und 27b mit Unterdruck. Diese Vertiefungen 26a, 26b, 27a und 27b sind jeweils selektiv über Unterdruckleitungen beaufschlagbar. Wenn man beispielsweise nur die Vertiefungen 26a und 26b mit Unterdruck beaufschlagt, kommt es zu einer linearen Dehnung der Membran im Beobachtungsbereich in x-Richtung, bei einer Beaufschlagung der Vertiefungen 27a und 27b in analoger Weise in y-Richtung. Mit derartigen oder ähnlichen Konstruktionen lassen sich also auch gezielte richtungsgebundene Dehnungen und damit verbundene Untersuchungen durchführen.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Einrichtung zur vorzugsweise mikroskopischen Untersuchung von Objekten, insbesondere Zellen, welche auf einem Träger angeordnet sind, dadurch gekennzeichnet, daß der

- Träger (19) elastisch und dehnbar ausgebildet ist, daß eine einen Beobachtungsbereich (8) umgebende, vorzugsweise plane Auflage (9) für den Träger (19) sowie eine Dehneinrichtung (11, 13) vorgesehen sind, über die der elastisch und dehnbar ausgebildete Träger (19) entlang der Auflage vom Beobachtungsbereich (8) nach außen dehnbar ist.
- 5 2. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehneinrichtung (11, 13) derart ausgebildet ist, daß sie den elastischen Träger (19) vom Zentrum des Beobachtungsbereichs (8) aus allseitig radial nach außen zieht.
 3. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehneinrichtung (11, 13) derart ausgebildet ist, daß sie den elastischen Träger (19) in eine oder mehrere bevorzugte Richtungen im wesentlichen jeweils linear dehnt.
 - 10 4. Einrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehnung in die einzelnen Richtungen gesondert einstellbar ist.
 5. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehneinrichtung (11, 13) den Träger (19) mit Unterdruck beaufschlagt.
 - 15 6. Einrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Dehneinrichtung (11, 13) zumindest eine außerhalb der den Beobachtungsbereich (8) umgebenden Auflage (9) angeordnete Vertiefung (11) aufweist, in die der randseitig gehaltene Träger (19) mittels Unterdruck eingesaugbar ist.
 7. Einrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Vertiefung (11) die ebenfalls vorzugsweise ringförmige Auflage (9) ringförmig umgibt.
 - 20 8. Einrichtung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest zwei gesondert mit Unterdruck beaufschlagbare Vertiefungen (11, 12) vorgesehen sind.
 9. Einrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die gesonderten Vertiefungen zumindest eine näher beim Beobachtungsbereich (8) liegende innere Vertiefung (11) und eine diese vorzugsweise ringförmig umgebende äußere Vertiefung (12) umfassen.
 - 25 10. Einrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den gesonderten Vertiefungen (11, 12) eine Zwischenauflage angeordnet ist, die mit der den Beobachtungsbereich (8) umgebenden Auflage (9) in einer Ebene liegt.
 11. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger (19) im Beobachtungsbereich (8) auflagenfrei angeordnet ist.
 - 30 12. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Zuführkanal (17) zum Zuführen von fluiden Stoffen auf das im Beobachtungsbereich (8) angeordnete Objekt (20) vorgesehen ist.
 13. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, gekennzeichnet durch eine Einrichtung (3) zum Erzeugen einer optischen Markierung, insbesondere eines fokussierten Lichtpunktes, in einem Teil, vorzugsweise im Zentrum des Beobachtungsbereiches (8).
 - 35 14. Einrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die optische Markiereinrichtung (3) einen Lichtleiter (4) und eine vorgeschaltete Fokussieroptik, vorzugsweise eine Sammellinse (5) umfaßt.
 - 40 15. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen hohlen rohrförmigen Körper (1) umfaßt, der zumindest eines, vorzugsweise alle der folgenden Merkmale aufweist:
 - eine im Inneren (2) des hohlen rohrförmigen Körpers (1) angeordnete optische Markiereinrichtung (3), vorzugsweise mit einem axialen Lichtleiter (4) und einer Sammellinse (5),
 - 45 - die vorzugsweise ringförmige an einer Stirnseite des rohrförmigen Körpers (1) angeordnete Auflage (9), die einen freien Beobachtungsbereich (8) am stirnseitigen Ende des hohlen Inneren (2) des Körpers (1) umgibt,
 - zumindest eine über einen Saugkanal (13, 14) mit Unterdruck beaufschlagbare Vertiefung (11, 12) an der Stirnseite des rohrförmigen Körpers (1),
 - 50 - zumindest einen Zuführkanal (17) zum Zuführen eines Fluids zum Beobachtungsbereich (8), sowie
 - zumindest einen Abfuhrkanal (18) zum Abführen eines Fluid vom Beobachtungsbereich (8).
 - 55 16. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie Bestandteil eines Mikroskops ist, mit dem das im Beobachtungsbereich (8) angeordnete

Objekt (20), insbesondere Zelle, während der Dehnung des Trägers (19) beobachtbar ist.

17. Einrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Mikroskop ein Durchlichtmikroskop ist, dessen Objektiv (21) vorzugsweise unter dem transparenten Träger (11) angeordnet ist, wobei das Licht vorzugsweise aus der optischen Markierungseinrichtung (3) stammt, die im Beobachtungsbereich (8) einen fokussierten Lichtpunkt erzeugt.
18. Einrichtung nach einem der Ansprüche 16 oder 17 dadurch gekennzeichnet, daß der Vergrößerungsfaktor des Mikroskops zwischen 200 und 1100, vorzugsweise zwischen 400 und 1000, liegt.
19. Einrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die den Beobachtungsbereich (8) umgebende Auflage (9), vorzugsweise samt zumindest einem Teil der Dehneinrichtung, verstellbar gelagert ist.
20. Einrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger vorzugsweise am Objektträger des Mikroskops verstellbar gelagert ist.
21. Einrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Anregungslichtquelle (24) und eine Detektoreinrichtung (25) zum Erfassen von Fluoreszenzlicht aus dem Beobachtungsbereich (8) aufweist.
22. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger (19) eine elastische, transparente Membran ist, die vorzugsweise randseitig gehalten ist.

HIEZU 5 BLATT ZEICHNUNGEN

Fig. 1

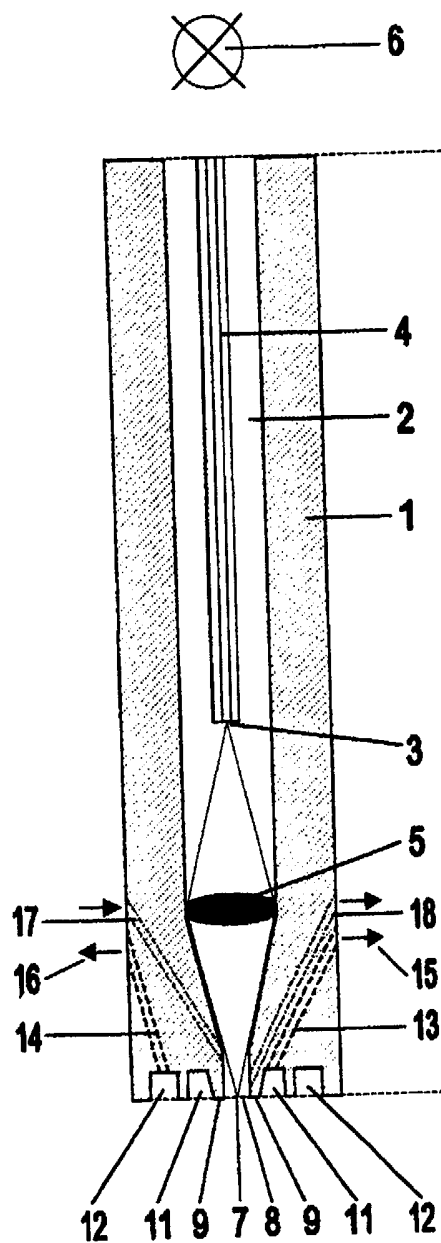


Fig. 1a

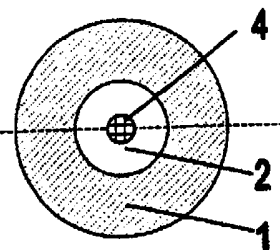


Fig. 1b

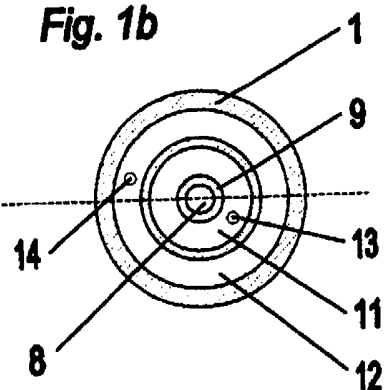


Fig. 2

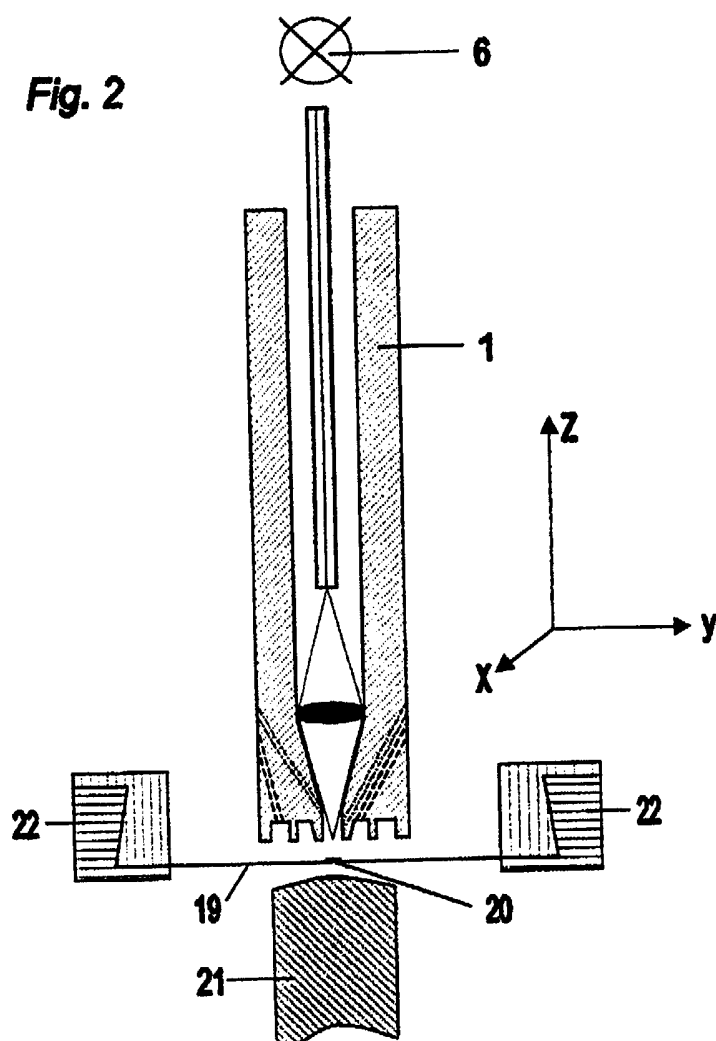


Fig. 2a

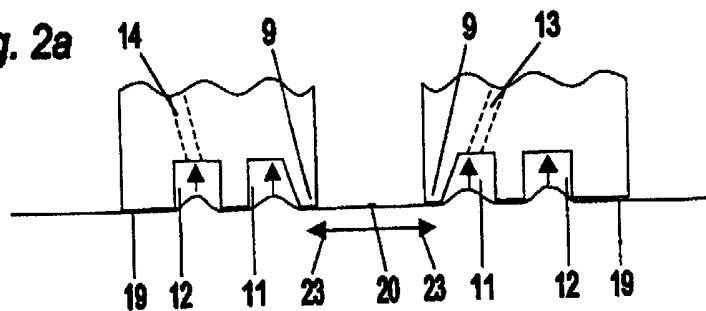


Fig. 3

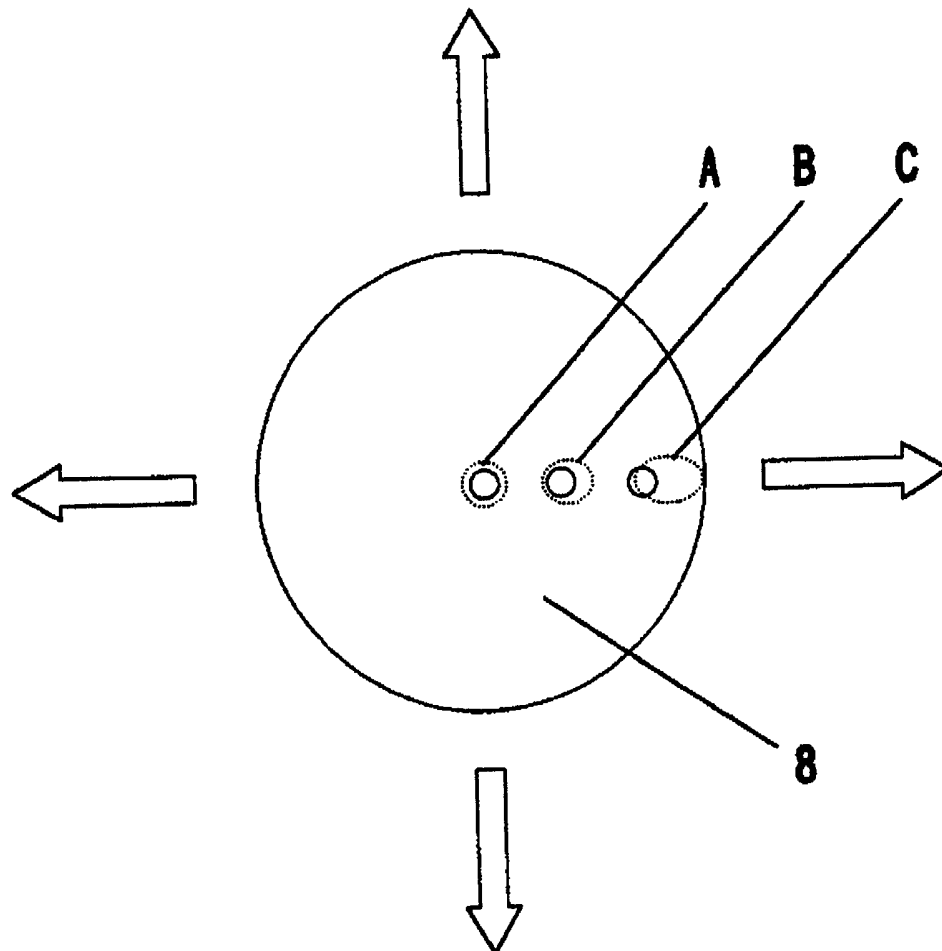


Fig. 4

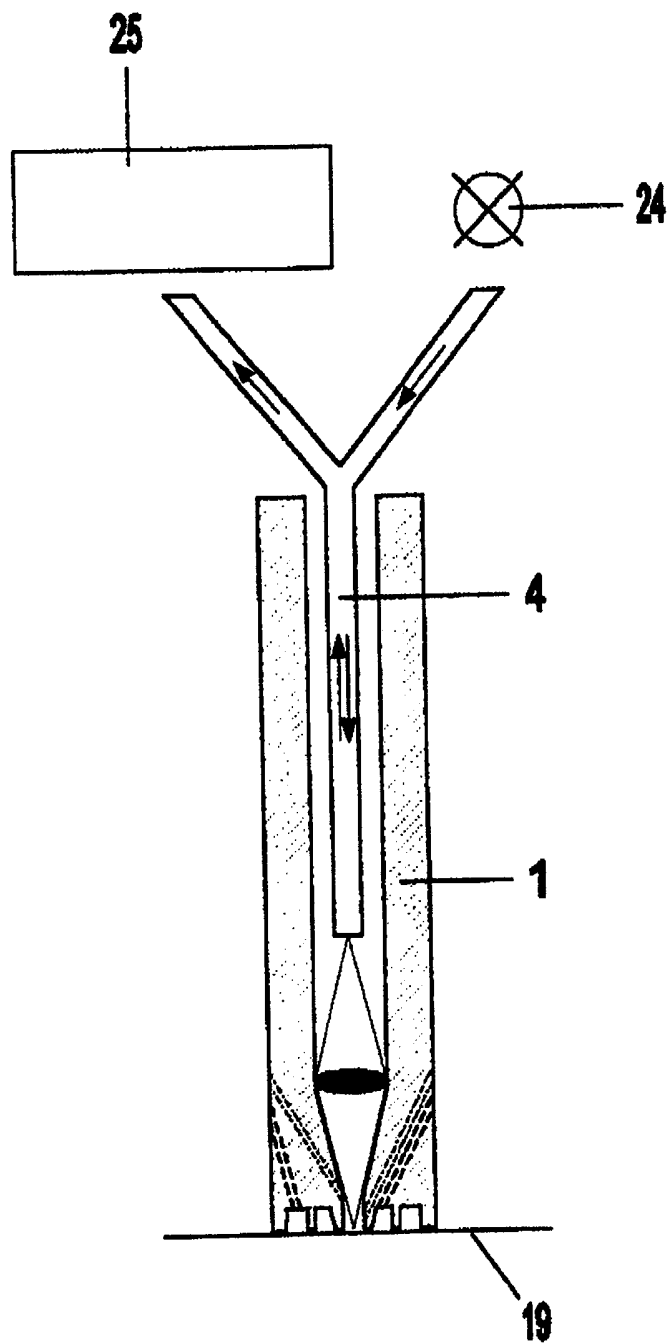


Fig. 5

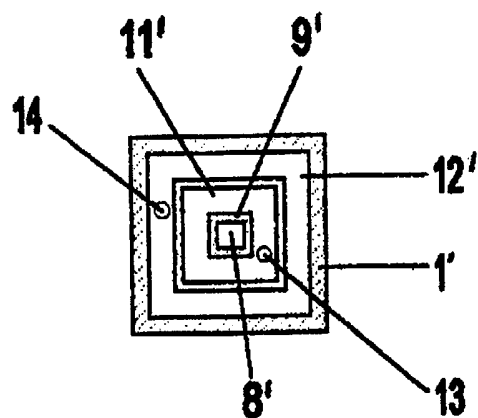


Fig. 6

