(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
2. Februar 2017 (02.02.2017)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/017271 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G02B 21/16 (2006.01) *G02B 27/48* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/068235

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Juli 2016 (29.07.2016)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2015 009 876.4 29. Juli 2015 (29.07.2015) DE

(71) Anmelder: **GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN STIFTUNG ÖFFENTLICHEN RECHTS UNIVERSITÄTSMEDIZIN** [DE/DE]; Robert-Koch-Straße 40, 37075 Göttingen (DE).

(72) Erfinder: **WOUTER-BUNT, Fred S.**; Schildweg 8a, 37085 Göttingen (DE). **VENTZKI, Robert**; Stauffenbergring 8/110, 37075 Göttingen (DE).

(74) Anwalt: **FRIEDRICH, Andreas**; GRAMM, LINS & PARTNER PATENT- UND RECHTSANWÄLTE PARTGMBB, Theodor-Heuss-Straße 1, 38122 Braunschweig (DE).

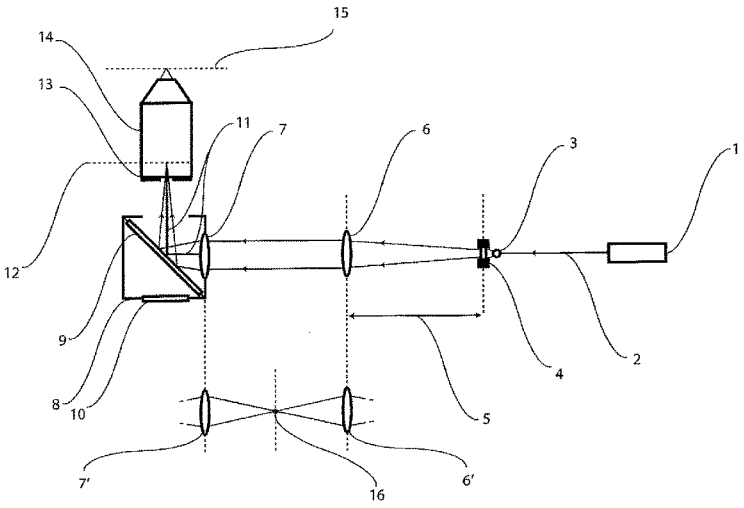
(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title**: FLUORESCENCE MICROSCOPE

(54) **Bezeichnung** : FLUORESZENZ-MIKROSKOP



(57) **Abstract**: The invention relates to a fluorescence microscope for incident-light fluorescent microscopy, comprising a radiation source for emitting electromagnetic radiation, the radiation source being a laser which is arranged in such a way that the emitted electromagnetic radiation is conducted through an optical diffuser, the optical diffuser being an active optical element for coherence suppression.

(57) **Zusammenfassung**: Die Erfindung betrifft ein Fluoreszenz-Mikroskop zur Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie, das eine Strahlungsquelle zum Aussenden elektromagnetischer Strahlung aufweist, wobei die Strahlungsquelle ein Laser ist, der derart angeordnet ist, dass die ausgesandte elektromagnetische Strahlung durch einen optischen Diffusor geleitet wird, wobei der optische Diffusor ein aktives optisches Element zur Kohärenz-Unterdrückung ist.

Abbildung 1

WO 2017/017271 A1

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)*

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii)*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)*

Fluoreszenz-Mikroskop

Die Erfindung betrifft ein Fluoreszenz-Mikroskop zur Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie, das eine Strahlungsquelle zum Aussenden elektromagnetischer Strahlung aufweist.

Fluoreszenz-Mikroskope werden seit langem in unterschiedlichen technischen Anwendungen, insbesondere jedoch in der Biotechnologie zur Untersuchung biologischer Proben eingesetzt. Elektromagnetische Strahlung einer Anregungswellenlänge wird auf die zu beobachtende Probe gelenkt. Dort wird in der Regel eine zu beobachtende Molekülsorte angeregt, die anschließend Fluoreszenz-Strahlung einer Fluoreszenz-Wellenlänge aussendet. Diese wird durch einen Detektor, der Teil des Fluoreszenz-Mikroskops ist, detektiert. Dabei besteht bei der Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie die zusätzliche Schwierigkeit, dass das Anregungslicht der Anregungswellenlänge und das Fluoreszenzlicht der Fluoreszenzwellenlänge durch das gleiche Objektiv geleitet werden müssen. Beide werden erst in einem Filterelement, der oft als Filterwürfel bezeichnet wird, getrennt.

Olympus America, eine der großen Hersteller von Fluoreszenz-Mikroskopen beschreibt auf seiner Internet-Seite unter der Überschrift „Anatomy of the Fluorescence Microscope“ sehr detailliert den Aufbau eines entsprechenden Fluoreszenz-Mikroskopes. Es werden beispielsweise Quecksilberdampflampen, Xenonlampen oder Lichtbogenentladungslampen als Lichtquelle verwendet, da diese räumlich und zeitlich konstant ihr Licht aussenden und gleichzeitig eine hohe Intensität der ausgesandten elektromagnetischen Strahlung gewährleiten. Das ausgesandte multichromatische Licht wird durch einen Filter geleitet, der nur Licht der Anregungswellenlänge hindurchlässt. Über einen farbtrennenden oder auch dichroitischen Spiegel wird das so gefilterte Anregungslicht umgelenkt und auf die zu beobachtende Probe

durch ein Objektiv geleitet. Fluoreszenz-Strahlung, die von der zu beobachtenden Probe ausgesandt wird, durchläuft das gleiche Objektiv, trifft auf den dichroitischen Spiegel und wird zum Teil durch diesen hindurch geleitet, bevor sie auf den Detektor trifft. Nachteilig ist, dass ein Großteil der von der Strahlungsquelle ausgesandten elektromagnetischen Strahlung innerhalb des Fluoreszenz-Mikroskopes verloren geht, da beispielsweise Fluoreszenz-Licht den dichroitischen Spiegel passiert, an einer Apertur oder Blende absorbiert, reflektiert oder gestreut wird oder bereits am Filter herausgefiltert wird, da es nicht die richtige Wellenlänge aufweist.

Bei der Weitfeld-Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie wird der gesamte Objektbereich, der durch die Anregungsstrahlung beleuchtet ist, bildgebend auf den Detektor abgebildet. Ein relativ großer Bereich des Objektes kann so gleichzeitig beobachtet werden, wodurch einerseits das Verfahren beschleunigt und andererseits die Gefahr des Ausbleichens („bleaching“) der Fluorophore verringert wird. Um ein möglichst unverfälschtes Bild zu erhalten ist es jedoch notwendig, den zu beobachtenden Objektbereich möglichst homogen, also mit möglichst ortsunabhängiger Intensität zu beleuchten. Dies wird herkömmlicherweise durch die aus dem Stand der Technik seit langem bekannte „Köhlersche Beleuchtung“ erreicht. Bei diesem Verfahren wird eine flächig ausgedehnte Strahlungsquelle für elektromagnetische Strahlung, beispielsweise die Glühwendel einer Halogenleuchte, der Plasmakegel einer Gasentladungslampe oder der Lichtbogen einer Lichtbogenlampe, durch ein optisches System auf die hintere Fokusebene des Objektives des abbildenden Systems abgebildet. Vorzugsweise geschieht diese Abbildung hierbei unter Einbeziehung des optischen Systems des Objektivs durch dessen Frontlinse. Das jeweils von den einzelnen Punkten der flächig ausgedehnten Strahlungsquelle ausgehende Licht tritt als parallele Strahlenbündel unter verschiedenen Winkeln durch das in der Fokus-Objekt-Ebene des Objektivs liegende Objekt. Im weiteren Verlauf des Strahlengangs werden die genannten parallelen Bündel vom optischen System des Objektivs zu einer scharfen Abbildung auf dessen hintere Fokus-Ebene fokussiert. Vorteilhafterweise wird das so abgebildete Objekt, vorliegend also die Glühwendel oder Plasmakegel der Strahlungsquelle durch weitere optische Systeme, beispielsweise Tubuslinsen oder Okulare, auf die lichtempfindliche Fläche des Abbildungssystems, beispielsweise die Netzhaut des Beobachters oder ein CCD-Chip einer Kamera abgebildet. Dies geschieht maximal unscharf, so dass die von jedem einzelnen Punkt der Strahlungsquelle ausgehende

Strahlung als paralleles Strahlenbündel die gesamte lichtempfindliche Fläche trifft. Wird das Köhlersche Beleuchtungsverfahren in der Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt, wird die räumlich ausgedehnte Lichtquelle in die hintere Fokusebene des Objektivs abgebildet und so das zu beobachtende Objekt homogen beleuchtet.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Fluoreszenz-Mikroskop so weiterzuentwickeln, dass der nicht verwendete Anteil der von der Strahlungsquelle ausgesandten elektromagnetischen Strahlung reduziert und somit die Effizienz des Mikroskops erhöht werden kann.

Die Erfindung löst die gestellte Aufgabe durch ein Fluoreszenz-Mikroskop, das eine Strahlungsquelle zum Aussenden elektromagnetischer Strahlung aufweist und sich dadurch auszeichnet, dass die Strahlungsquelle ein Laser ist, der derart angeordnet ist, dass die ausgesandte elektromagnetische Strahlung durch einen optischen Diffusor geleitet wird, wobei der optische Diffusor ein aktives optisches Element zur Kohärenz-Unterdrückung ist.

Durch diese überraschende einfache Lösung wird erreicht, dass weniger elektromagnetische Strahlung, die von der Strahlungsquelle ausgesandt wird, verloren geht. Der Laser sendet vorteilhafterweise elektromagnetische Strahlung der Anregungswellenlänge aus, so dass es nicht mehr notwendig ist, diese von der Strahlungsquelle stammende elektromagnetische Strahlung durch einen Filter zu filtern, und so einen Großteil der Strahlung herauszufiltern und nicht fürs eigentliche Mikroskopierverfahren zu verwenden. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass selbst das Köhlersche Beleuchtungsverfahren verwendbar ist, wenn die vom Laser ausgesandte elektromagnetische Strahlung durch einen optischen Diffusor geleitet wird. Im Stand der Technik ist man bisher davon ausgegangen, dass das Köhlersche Beleuchtungsverfahren bei punktförmigen und/oder kohärenten Lichtquellen nicht geeignet ist. Da das Verfahren die flächige Ausdehnung der Lichtquelle benötigt, um das zu beleuchtende Objekt homogen, also mit räumlich gleichbleibender Intensität zu beleuchten, erschien es für eine punktförmige Lichtquelle nicht geeignet.

Hinzukommt, dass die Erfinder in Versuchen mit einem Laser als Strahlungsquelle Zonen unterschiedlicher Helligkeit im Fluoreszenzlicht beobachteten, die nicht durch

eine Verteilung der Fluorophore erklärt werden konnten. Überraschenderweise werden all diese Probleme und Nachteile, die die verwendete Laserstrahlung mit sich bringt, durch den verwendeten optischen Diffusor überwunden.

Erfindungsgemäß handelt es sich bei dem optischen Diffusor um ein aktives optisches Element zur Kohärenz-Unterdrückung. Derartige Elemente werden beispielsweise unter der Bezeichnung „Speckle-Reducer“ vertrieben. Um die Kohärenz des verwendeten Laserlichtes zu reduzieren sind unterschiedliche Verfahren bekannt. So kann beispielsweise die elektromagnetische Strahlung des Lasers in einer Multimode-Glasfaser eingekoppelt werden, die in schnelle mechanische Vibration versetzt wird. Dadurch wird die Kohärenz des Laserlichtes gestört und die aus der Glasfaser austretende elektromagnetische Strahlung ist im Vergleich zur eintretenden Strahlung deutlich weniger kohärent. Alternativ dazu wird die ausgesandte elektromagnetische Strahlung durch eine vibrierende oder sich schnell drehende Scheibe beispielsweise aus matten Glas geleitet. Auch die Verwendung von kolloidalen Dispersionen oder elektroaktiven Polymeren, die durch Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes mit einem Frequenz von beispielsweisen einigen hundert Hertz bewegt werden, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Beim Durchtritt der elektromagnetischen Strahlung durch einen derartigen Diffusor wird die Kohärenz der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung deutlich reduziert oder vorteilhafterweise vollständig zerstört. Oft handelt es sich bei einem derartigen optischen Element um eine bewegliche Streueinrichtung, beispielsweise eine Streuscheibe. Diese kann beispielsweise an Lagereinrichtungen aus Polymeren gelagert sein, deren Länge durch das Anlegen einer elektrischen Spannung verändert werden kann. Dadurch kann das Streuelement schnell bewegt werden, wodurch die zeitliche Kohärenz der durchtretenden Laserstrahlung nahezu ganz oder sogar vollständig zerstört wird.

Ein derartiges Element wird beispielsweise von der Firma OptoTune unter der Bezeichnung „laser speckle reducer“ vertrieben.

Bei sogenannten FLIM-Messungen (FLIM: fluorescence lifetime imaging microscopy) wird die Probe mit einer modulierten Beleuchtung beaufschlagt. Dabei tritt bei der dann auftretenden Emission der Fluoreszenzstrahlung eine Phasenverschiebung und Demodulation der Intensitätsamplitude auf, die von der Lebensdauer abhängt. Es

gibt entsprechende Kameras, beispielsweise von PCO, die jeweils das Signal für zwei um 180° zueinander phasenverschobene Phasen aufintegriert wird. Danach erfolgt eine zweite Belichtung für zwei Phasen, die gegenüber den Phasen der ersten Belichtung um beispielsweise 90° verschoben sind. Beide Belichtungen bilden ein sogenanntes „“Doppelbild“, von denen beispielsweise 90 pro Sekunde aufgenommen werden können.

Um die bei diesen Aufnahmen störende Kohärenz der Laserstrahlung herausmitteln zu können, muss die Bewegung des Diffusors ausreichend groß sein. In der Regel bewegt sich der Diffusor auf einer geschlossenen Bahn in einer Ebene senkrecht zur optischen Achse des Systems. Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, wenn der Diffusor ein ganzzahliges Vielfaches eines Umlaufes auf dieser geschlossenen Bahn während der Aufnahme eines Doppelbildes durchläuft. Die Bahn kann beispielsweise kreisförmig oder oval ausgebildet sein.

Durch den Diffusor wird die Laserstrahlung gestreut, so dass ein Lichtkegel entsteht, dessen Öffnungswinkel von der Art und des Moduls des jeweiligen Diffusors abhängt. Gängige Öffnungswinkel liegen bei beispielsweise 5 bis 25°. Je stärker der verwendete optische Diffusor streut, desto besser ist die Unterdrückung der Kohärenz der ausgesandten elektromagnetischen Strahlung. Gleichzeitig vergrößert sich auch der Öffnungswinkel des austretenden Lichtkegels.

Der beleuchtete Diffusor bildet vorteilhafterweise eine Lichtfläche homogener Intensität. Gegebenenfalls ist es vorteilhaft, das Laserlicht aufweitende optische Elemente, wie beispielsweise eine Kugellinse, zwischen dem Laser und dem Diffusor anzuordnen, um die Lichtfläche zu vergrößern und/oder die Homogenität der Lichtintensität auf der Lichtfläche zu verbessern.

Die Lichtfläche wird erfindungsgemäß durch die Beleuchtung des optischen Diffusors erzeugt, der wie bereits dargelegt eine Mattglas-Scheibe oder ein weißer transluzenter Kunststoff oder ein anderes aktives, insbesondere bewegtes optisches Element ist.

Vorteilhafterweise verfügt das Fluoreszenz-Mikroskop über ein optisches Abbildungssystem, das eingerichtet ist, die Lichtfläche des optischen Diffusors in einem Abbildungsmaßstab an einer Abbildungsposition in einem Objektiv des Fluoreszenz-Mikroskops abzubilden. Besonders vorteilhafterweise ist die Abbildungsposition dabei die hintere Fokusebene des jeweiligen Objektives.

Diese Projektion oder Abbildung der Lichtfläche des optischen Diffusors in die hintere Apertur oder Fokusebene des Objektes geschieht vorteilhafterweise, indem aus der von dem Diffusor ausgehenden elektromagnetischen Strahlung ein kollimiertes Lichtbündel gebildet wird. Dieses Lichtbündel wird durch das Abbildungssystem fokussiert und in die hintere Aperturöffnung des Objektes projiziert. Die Kollimation oder Kollimierung der von der Lichtfläche ausgehenden elektromagnetischen Strahlung wird vorteilhafterweise durch ein fokussierendes optischen Elementes erreicht, das Teil des Abbildungssystems ist. Dieses optische Element wird vorteilhafterweise so platziert, dass die Lichtfläche des optischen Diffusors in der Fokusebene des fokussierenden optischen Elementes liegt. In diesem Fall wird die von der Lichtfläche ausgehende elektromagnetische Strahlung ins Unendliche projiziert. Zur fokussierten Einleitung des kollimierten Lichtbündels in die hintere Aperturöffnung des Objektives ist vorteilhafterweise ein weiteres fokussierendes optisches Element vorhanden. Dies wird vorteilhafterweise so platziert, dass die hintere Fokusebene des Objektives in seiner Fokusebene liegt. Dies bedeutet vorzugsweise, dass ein Abstand zwischen der hinteren Fokusebene des Objektivs und der Fokusebene des fokussierenden optischen Elementes kleiner ist als 10 mm, vorzugsweise kleiner als 8 mm, bevorzugt weniger als 5 mm, besonders bevorzugt weniger als 3 mm. Optimalerweise liegen die beiden Fokusebenen zusammen. Besonders bevorzugt liegt die Fokusebene des fokussierenden optischen Elementes entlang der Ausbreitungsrichtung der von dem Laser ausgesandten Strahlung nicht vor der hinteren Fokusebene des Objektivs.

Die optische Weglänge zwischen der Strahlungsquelle des Fluoreszenz-Mikroskops und dem Objektiv beträgt bei üblichen Mikroskopen zwischen 20 und 50 Zentimetern. Da das von der Lichtquelle ausgehende kollimierte Strahlenbündel nicht exakt parallel kollimiert werden kann, wächst der Durchmesser dieses Lichtbündels bis zur Rückseite des Objektivs auf ca. 25 mm an. Der Durchmesser der hinteren Aperturöffnung üblicher Objektive beträgt jedoch nur etwa 5 bis 10 mm, so dass bei direkter

unfokussierter Einleitung des Lichtbündels ca. 80 bis 95% der elektromagnetischen Strahlung an der hinteren Aperturöffnung des Objektives abgeblockt werden und verloren gehen.

Daher ist es von Vorteil, wenn die elektromagnetische Strahlung in die hintere Aperturöffnung des Objektives fokussiert eingeleitet wird, da dadurch die Verluste der elektromagnetischen Strahlung vermieden und der Einsatz von Strahlungsquellen mit begrenzter Leistung, beispielsweise hochfrequent modulierte Laser, ermöglicht wird.

Vorzugsweise ist die Größe der Lichtfläche des optischen Diffusors so gewählt, dass ihr Durchmesser etwa dem Durchmesser der hinteren Aperturöffnung üblicher Objektive, also beispielsweise fünf bis 10 Millimetern entspricht. Der Abbildungsmaßstab ist daher vorzugsweise ungefähr 1 zu 1. Die die Abbildung der Lichtfläche auf der hinteren Fokusebene des Objektives liegt wird die von jedem einzelnen Punkt der Lichtfläche ausgehende elektromagnetische Strahlung vom Objektiv so geleitet, dass sie in parallelen Strahlenbündeln unter verschiedenen Winkeln auf die Fokusebene des Objektives trifft, so dass dieser analog zur bekannten Köhlerschen Beleuchtung homogen ausgeleuchtet wird. Um dieses vorteilhafte Abbildungsverhältnis für unterschiedliche Mikroskop-Anordnungen, beispielsweise unterschiedliche Objektive einfach realisieren zu können, ist vorteilhafterweise die Größe der Lichtfläche des Diffusors anpassbar und veränderbar. Dies kann beispielsweise erreicht werden, indem ein optisches Aufweiteelement, das verwendet wird, um den von dem Laser ausgesandten Strahl aufzuweiten, verschoben oder ausgetauscht wird.

In einer bevorzugten Ausgestaltung verfügt das Abbildungssystem über eine optische Anpassungsvorrichtung, durch die der Abbildungsmaßstab und/oder die Abbildungsposition veränderbar ist. Dies geschieht vorteilhafterweise durch gegeneinander auswechselbarere Linsensysteme. Das von der Lichtfläche des optischen Diffusors ausgesandte Licht kann kollimiert der Anpassungsvorrichtung zugeleitet werden. Alternativ kann das Licht auch ohne Zwischenkollimation einem derartigen Linsensystem zugeführt werden. Durch das Linsensystem wird ein reelles Zwischenbild der Lichtfläche erzeugt.

Durch die Wahl der verwendeten Linsen in den Linsensystemen, insbesondere deren Brennweiten und Art und Form der jeweiligen Linse, können unterschiedliche Abbildungsmaßstäbe und Abbildungspositionen unabhängig davon, ob das Licht kollimiert oder nicht kollimiert zugeführt wird, erreicht werden.

Nachdem das Licht die Anpassungsvorrichtung verlassen hat, ist es vorteilhafterweise ein kollimiertes Strahlenbündel auch wenn es der Anpassungsvorrichtung nicht kollimiert zugeleitet wird, wobei sich jedoch insbesondere der Durchmesser verändert hat. Dieser bildet für das fokussierende optische Element, durch das die ausgesandte elektromagnetische Strahlung auf die oder in den Bereich der hinteren Fokusebene des Objektivs fokussiert wird, die Gegenstandsgröße. Bei festen unveränderten fokussierenden optischen Elementen kann auf diese Weise die Bildgröße verändert und damit der jeweiligen Apertur des Objektivs angepasst werden. Dazu ist vorteilhafterweise ein Austausch des fokussierenden optischen Elementes nicht notwendig.

Vorteilhafterweise verfügt das Fluoreszenz-Mikroskop über eine Filtereinrichtung, die eingerichtet ist, elektromagnetische Strahlung einer Anregungswellenlänge auf ein Objekt und elektromagnetische Strahlung einer Fluoreszenz-Wellenlänge von dem Objekt auf einen Detektor zu leiten, wobei wenigstens ein optisches Element des Abbildungssystems mit der Filtereinrichtung eine Filterbaugruppe bildet. Die Verwendung derartiger Filtereinrichtungen ist bei Fluoreszenz-Mikroskopen üblich. Sie umfassen in aller Regel auch einen dichroitischen Spiegel, mit dem das Fluoreszenz-Licht auf dem Weg zum Detektor von dem Anregungslicht getrennt werden kann. Herkömmlicherweise verfügen die Fluoreszenz-Mikroskope über eine Mehrzahl dieser Filterbaugruppen, die auch als Filterwürfel bekannt sind. Das eine fokussierende optische Element, das die ankommende elektromagnetische Strahlung, also das Anregungslicht, in das Objektiv hinein projiziert, ist vorteilhafterweise das Element des Abbildungssystems, das Teil der Filterbaugruppe ist.

Vorteilhafterweise verfügt das Fluoreszenz-Mikroskop über eine Mehrzahl von gegeneinander auswechselbaren Objektiven. Dies ist bei Mikroskopen üblicherweise der Fall, um beispielsweise unterschiedliche Vergrößerungen des zu beobachtenden Gegenstandes ansehen zu können. Diese unterschiedlichen Objektive verfügen in

aller Regel über unterschiedliche Aperturen, wobei die Anpassungsvorrichtung vorteilhafterweise eingerichtet ist, den Abbildungsmaßstab so anzupassen, dass die jeweilige Apertur zumindest nahezu vollständig, bevorzugt jedoch vollständig, ausgeleuchtet wird. Dies geschieht wie bereits dargelegt beispielsweise durch die gegeneinander auswechselbaren Linsensysteme. Sofern das von der Lichtfläche ausgesandte Licht diesem Linsensystem als kollimiertes Strahlenbündel zugeführt wird und das Linsensystem auch als kollimiertes Strahlenbündel wieder verlässt, muss dabei die Position des Linsensystems innerhalb des optischen Weges und Strahlengangs im Fluoreszenz-Mikroskop nicht verändert werden. Daher können auch bestehende Mikroskope mit einem solchen Zusatzelement, das austauschbar im Strahlengang positioniert wird und jeweils eines der austauschbaren Linsensysteme beinhaltet, nachgerüstet werden.

Unterschiedliche Objektive können Aperturöffnungen unterschiedlicher Durchmesser aufweisen. Nur Licht, das diese rückseitige Aperturöffnung passiert, kann tatsächlich zur Beleuchtung benutzt werden. Bei bestimmten Objektiven und Mikroskopaufbauten ist es durchaus möglich, dass die rückseitige Aperturöffnung einen limitierenden Faktor bildet, und es beispielsweise nicht möglich oder nicht sinnvoll ist, die vollständige hintere Aperturebene auszuleuchten. In diesem Fall kann bei der gegebenen Geometrie das Loch, also die rückseitige Aperturöffnung, selbst als Begrenzung wirken. In diesem Fall ist es von Vorteil, diese Aperturöffnung vollständig auszuleuchten. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn das Bild der Lichtfläche nicht exakt in die hintere Aperturebene des Objektives abgebildet wird.

Da das Fluoreszenz-Mikroskop vorzugsweise über eine Mehrzahl von auswechselbaren Filterbaugruppen verfügt, können in diesen auch unterschiedliche fokussierende optische Elemente, also insbesondere Sammellinsen, enthalten sein. Herkömmlicherweise werden unterschiedliche Filterwürfel verwendet, um beispielsweise die Anregungswellenlänge, insbesondere aber die Fluoreszenz-Wellenlänge, die zum Detektor geleitet und somit beobachtet wird, anzupassen. Da in dieser bevorzugten Ausführungsform die Filterbaugruppe jedoch auch wenigstens eines der optischen Elemente aufweist, die für die Abbildungsposition und/oder den Abbildungsmaßstab zumindest auch verantwortlich sind, kann durch einen geänderten Filterwürfel auch

einer geänderten Objektivauswahl Rechnung getragen werden. Dies ist insbesondere dann der Fall wenn für die Positionierung des fokussierenden optischen Elementes entlang der optischen Achse des Systems etwas Bauraum zur Verfügung steht. In diesem Fall kann die Position des fokussierenden optischen Elementes in der Filterbaugruppe je nach verwendeter Filterbaugruppe variieren. Der zur Verfügung stehende Bauraum ist in aller Regel jedoch sehr gering. Doch auch für den Fall, dass dies nicht möglich ist, können unterschiedliche Linsen verwendet werden, die insbesondere in Kombination mit einer geänderten Anpassungsvorrichtung, also einem entsprechend ausgetauschten Linsensystem, die optimale Abbildung für die jeweilige Objektivauswahl ermöglichen.

Vorteilhafterweise unterscheiden sich zumindest einige der verschiedenen Filterbaugruppen zumindest auch durch das fokussierende optische Element.

Vorteilhafterweise wird dabei die elektromagnetische Strahlung die der Lichtfläche des optischen Diffusors entspringt, als kollimiertes, paralleles Strahlenbündel in die Filterbaugruppe eingeleitet.

Bei den hier beschriebenen Fluoreszenz-Mikroskopen ist es von Vorteil, hohe Anforderungen an die Effizienz der Einkopplung der elektromagnetischen Strahlung insbesondere bei der Nutzung von Strahlungsquellen mit begrenzter Leistung, beispielsweise den bereits genannten hochfrequent modulierten Lasern, zu stellen. So ist beispielsweise die Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer im Frequency-Domain-FLIM-Verfahren (FLIM: „Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy“) von der Intensität der elektromagnetischen Beleuchtungsstrahlung unabhängig. Die Qualität von FLIM-Aufnahmen, also die zeitliche Auflösung der zu messenden Fluoreszenz-Lebensdauer, wird wesentlich von der Modulation-Frequenz und –Tiefe und bei Rechteck-Modulation vom Puls-Pause-Verhältnis bestimmt. Je kürzer die Pulsdauer, umso höher ist das zeitliche Auflösungsvermögen des Verfahrens. Gleichzeitig bestimmt das Puls-Pause-Verhältnis jedoch auch die zeitlich gemittelte Leistung der modulierten Laser-Strahlungsquelle. Je kürzer die Pulsdauer ist, umso geringer ist auch die Laser-Lichtleistung, so dass eine möglichst effiziente Einkopplung dieser elektromagnetischen Strahlung mit möglichst minimalen Verlusten wichtig wird, um zeitlich hoch auflösende FLIM-Messungen durchführen zu können.

Die beschriebenen vorteilhaften Ausführungsformen des Fluoreszenz-Mikroskopes erlauben den Einsatz unterschiedlicher Objektive mit unterschiedlichen Brennweiten und damit unterschiedlichen Positionen der jeweiligen hinteren Fokusebene. Die Anpassung kann durch eine ebenfalls zu wechselnde Filterbaugruppe und/oder ein gegeneinander auszutauschendes Linsensystem erfolgen. Insbesondere durch das im Filterwürfel, also der Filterbaugruppe, angeordnete optische fokussierende Element entfällt ein zusätzlicher Halter, so dass auch hier bestehende Mikroskope leicht nachgerüstet werden können und der apparative Aufwand klein bleibt. Es kommen Linsen unterschiedlicher Form, beispielsweise plankonvex oder bikonvex mit unterschiedlichen Durchmessern, beispielsweise 25 mm, und unterschiedlichen Brennweiten von beispielsweise 50 mm bis 200 mm in Frage. Wie bereits dargelegt befindet sich vorteilhafterweise in der Nähe der Lichtfläche des optischen Diffusors ein optisches fokussierendes Element, also beispielsweise eine Linse, die dafür sorgen kann, dass die ausgesandte elektromagnetische Strahlung insbesondere dem Linsensystem, oder, sofern kein Linsensystem vorhanden ist, dem nächsten optischen Element entlang des optischen Weges ein kollimiertes Strahlenbündel zugeführt wird. Ist dieses optische Element nicht geeignet, ein kollimiertes Strahlenbündel zu erzeugen, sondern fokussiert es von der Lichtfläche ausgehende elektromagnetische Strahlung zu einem Zwischenbild, muss der Abstand zwischen den beiden optischen Elementen die Summe ihrer Brennweiten betragen. Größere Distanzen lassen sich durch das Einfügen weiterer optischer Elemente, insbesondere der gegeneinander auswechselbaren Linsensysteme überbrücken. Selbstverständlich ist es auch möglich, Teile des zu überbrückenden Weges mittels eines kollimierten Strahlenbündels zu überbrücken.

Verfügt der optische Diffusor über einen großen Öffnungswinkel, kann es von Vorteil sein, ein weiteres fokussierendes optisches Element zu verwenden, das insbesondere nahe der Austrittsöffnung des Diffusors angeordnet wird und den Öffnungswinkel verringert. Dies kann gleichzeitig die Funktion der Kollimierung des ausgesandten Lichtes, also der elektromagnetischen Anregungsstrahlung übernehmen. Hierfür kommt beispielsweise eine konvexe oder plankonvexe Linse, beispielsweise eine asphärische Linse in Frage, die beispielsweise einen Durchmesser von 20 mm bei einer ebensolchen Brennweite aufweisen kann.

Bevor die elektromagnetische Strahlung des Lasers in den optischen Diffusor eingeleitet wird, ist es von Vorteil, einen sogenannten Beam Expander einzusetzen, der üblicherweise aus zwei Linsen unterschiedlicher Brennweite besteht, die in einem Abstand der Summe ihrer Brennweiten angeordnet sind. Dies können üblicherweise zwei konvexe oder eine konkave und eine konvexe Linse sein. Auf diese Weise wird der Durchmesser des Strahlenbündels der ausgesandten elektromagnetischen Strahlung vergrößert. Alternativ oder zusätzlich dazu kann die ausgesandte elektromagnetische Laserstrahlung beispielsweise durch eine Kugellinse aufgeweitet werden, die beispielsweise einen Durchmesser von 5 mm und eine Brennweite von 4 mm aufweisen kann. Auch konkave Linsen beispielsweise mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Brennweite von ca. -10 mm, können verwendet werden, um den Laserstrahl, also die vom Laser ausgesandte elektromagnetische Strahlung, aufzuweiten. Der Abstand dieses optischen Elementes zur Lichteintrittsöffnung des Diffusors wird dabei so gewählt, dass bei einem mittig in das optische Element eintretenden Laserstrahl der austretende Lichtquell die Fläche des Diffusors voll ausleuchtet. Auf diese Weise lässt sich beispielsweise bei der Verwendung von Dioden- oder DPSS(Diode pumped solid state)-Lasern ein monolithischer Aufbau realisieren, wobei die elektromagnetische Strahlungsquelle zusammen mit dem Diffusor direkt an den Rest des Mikroskops montiert werden kann.

Verfügt das Fluoreszenz-Mikroskop über eine externe Strahlungsquelle, beispielsweise einen Multilaser, kann die elektromagnetische Strahlung durch einen optischen Lichtleiter in den optischen Diffusor eingeleitet werden. Die aus dem Lichtleiter austretende elektromagnetische Strahlung kann vor dem Eintritt in den Diffusor kollimiert werden.

Mit Hilfe der beigefügten Figuren wird nachfolgend ein Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung näher erläutert. Es zeigt:

Figur 1 - schematische Darstellung eines Teils eines Mikroskops gemäß einem ersten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung,

Figuren 2a - schematische Darstellung eines Teils eines Mikroskops,

bis 2c

Figuren 3a - eine 3D-Ansicht eines Fluoreszenz-Mikroskops,
und 3b

Figuren 4a - Fluoreszenz-Mikroskop-Bilder,
bis 4d

Figur 5a - Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie-Bilder,
und 5b

Figuren 6a - weitere Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie-Bilder.
bis 6d

Figur 1 zeigt die schematische Darstellung eines Teils eines Fluoreszenz-Mikroskops gemäß einem ersten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung. Das Mikroskop verfügt über eine Strahlungsquelle 1, die ein Laser ist und elektromagnetische Laserstrahlung 2 aussendet. Diese wird im gezeigten Ausführungsbeispiel auf eine Kugellinse 3 geleitet, durch die der vom Laser 1 ausgesandte Strahl elektromagnetischer Laserstrahlung 2 aufgeweitet und defokussiert wird. Selbstverständlich können Anstelle der Kugellinse 3 auch andere Defokussierungselemente verwendet werden. Das aufgeweitete Licht trifft dann auf einen optischen Diffusor 4, der im gezeigten Ausführungsbeispiel ein Speckle-Reducer ist. Der optische Diffusor bildet eine Lichtfläche, von der das Licht auf ein erstes fokussierendes optisches Element 6, im gezeigten Ausführungsbeispiel eine Sammellinse, geleitet wird. Das fokussierende optische Element 6 verfügt über eine Brennweite 5 wobei das optische Element 6 und der Diffusor 4 genau in einem Abstand zueinander angeordnet sind, der der Brennweite 5 des ersten fokussierenden optischen Elementes 6 entspricht. Da sich die Lichtfläche des optischen Diffusors 4 folglich im genauen Abstand der Brennweite 5 des ersten fokussierenden optischen Elementes 6 von diesem Element 6 befindet, wird die von der Lichtfläche ausgehende Laserstrahlung durch das erste fokussierende optische Element in einen kollimierten Strahl überführt, der in Figur 1 als paralleler Strahl dargestellt ist.

Diese elektromagnetische Strahlung trifft auf ein zweites fokussiertes optisches Element 7 das die elektromagnetische Strahlung in ein Objektiv 14 fokussiert. Dabei wird die elektromagnetische Strahlung innerhalb eines Filterwürfels oder einer Filterbaugruppe 8, von der das zweite fokussierende optische Element 7 ein Teil ist, über einen halb durchlässigen dichroitischen Spiegel 9 umgelenkt. Das zweite fokussierende optische Element 7 verfügt über eine Brennweite 11 und ist so relativ zu dem Objektiv 14 angeordnet, dass sich dessen hintere Fokusebene 12 genau im Abstand der Brennweite 11 des zweiten fokussierenden optischen Elementes 7 von diesem befindet. Auf diese Weise wird eine homogene Beleuchtung der Objektebene 15 des Objektivs 14 gewährleistet. Das Objektiv 14 verfügt über ein Gehäuse, dessen Aperturöffnung 13 möglichst vollflächig ausgeleuchtet werden sollte.

In der Objektivebene 15 befindet sich das zu beobachtende Objekt, das Fluoreszenz-Strahlung aussendet, die ebenfalls durch das Objektiv 14 in die Filterbaugruppe 8 gelangt und dort zumindest zum Teil durch den halb durchlässigen Spiegel 9 auf einen optischen Fluoreszenz-Emissionsfilter 10 trifft. Von dort wird die Strahlung weiter zum Detektor geleitet, der in Figur 1 nicht dargestellt ist.

Alternativ zu den beiden fokussierenden optischen Elementen 6 und 7 können auch beispielsweise die im unteren Teil von Figur 1 dargestellten optischen Elemente 6` und 7`angeordnet sein, die sich von den beiden im oberen Bereich gezeigten Elementen 6 und 7 im Wesentlichen durch ihre Brennweite unterscheiden. Man erkennt, dass das fokussierende Element 6` die einfallende Laserstrahlung von der Lichtfläche des optischen Diffusors 4 nicht in ein kollimiertes paralleles Strahlenbündel fokussiert, sondern ein reelles Zwischenbild 16 zwischen den beiden Linsen 6` und 7` entstehen lässt. Durch geschickte Wahl der Brennweiten der beiden Elemente 6` und 7` kann die Position des reellen Zwischenbildes 16 nahezu frei zwischen den beiden fokussierenden optischen Elementen 6` und 7` eingestellt werden, wobei der Abstand zwischen dem zweiten fokussierenden optischen Element 7` und der Position des reellen Zwischenbildes 16 die Gegenstandsweite für die Abbildung des reellen Zwischenbildes 16 durch das zweite fokussierende optische Element 7` ist. Auf diese Weise lässt sich folglich über das Verhältnis von Gegenstandsweite und Bildweite auch das Verhältnis von Gegenstandsgröße und Bildgröße einstellen, sodass es insbesondere möglich wird, die Apertur der hinteren Fokusebene 12 des Objektivs 14

vollständig auszuleuchten.

Figur 2a bis 2c zeigt unterschiedliche Möglichkeiten, die von der Strahlungsquelle 1 ausgesandte elektromagnetische Strahlung, die in den Figuren 2a und 2b einen Durchmesser 2` aufweist, zu defokussieren und aufzuweiten, bevor sie auf den optischen Diffusor 4 trifft. In Figur 2a ist die bereits gezeigte Kugellinse 3 verwendet worden. Figur 2b zeigt die Verwendung einer Plan-Konkav-Linse 17 zur Defokussierung der einfallenden Laserstrahlung, währen in Figur 2c die vom Laser 1 ausgesandte Strahlung in einen optischen Lichtleiter 19 eingekoppelt wird, aus dem sie unter einem bestimmten Öffnungswinkel austritt, bevor sie durch eine Linse 18 kollimiert und auf den optischen Diffusor 4 geleitet wird.

Figur 3a zeigt ein Fluoreszenz-Mikroskop 1 gemäß einem Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung. Im vergrößerten Ausschnitt in Figur 2b wird erkennbar, dass die elektromagnetische Strahlung 2 von dem nicht gezeigten Laser 1 auf einen Speckle-Reducer 21, der als optischer Diffusor 4 wirkt, trifft. Über eine Stellschraube 22 kann die Lasereintrittsposition im optischen Weg des Moduls justiert werden.

Im weiteren Verlauf des Strahlenganges ist ein Schieber 23 dargestellt, durch den beispielsweise das erste fokussierende optische Element 6 austauschbar in den Strahlengang einführbar ist. Die eingeführte Laserstrahlung trifft dann auf einen Spiegelschieber 24, in dem zwischen zwei unterschiedlichen Beleuchtungsmitteln ausgewählt werden kann. Während die dargestellte Laserstrahlung 2 eine Möglichkeit der Beleuchtung des Objektes ist, kann auch übe einen im 90° Winkel dazu angeordneten zweiten optischen Weg eine andere Lichtquelle verwendet werden. Innerhalb der gezeigten Apparatur wird die einfallende Laserstrahlung 2 in ein kollimiertes Strahlenbündel 25 überführt und auf die Filterbaugrube 8 mit dem zweiten fokussierenden optischen Element 7 geleitet.

Figur 4 zeigt HEK293 Zelle, in denen vergleichbare Mengen eines hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierenden fluoreszenten Fusionsproteins (Cyan-Fluoreszenzprotein an DJ1) experimentiert wurden. Die Bilder wurden mit einem handelsüblichen invertierten Weitfeld-Mikroskop (Olympus IX71), ausgestattet mit einem 60x Öl-Immer-

sions-Objektiv mit numerischer Apertur von 1,35 mit dem in Figur 3B gezeigten, modifizierten IX2-RFAEVA-2 TIRF Licht-Illuminator-Modul als Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Vorrichtung aufgenommen. Das CFP wurde mit einem über einen optischen Lichtleitere eingekoppelten Laser der Wellenlänge 445 nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde über einen handelsüblichen Filterwürfel für CFP mit einer digitalen CMOS-Kamera aufgenommen. Die Fluoreszenz-Verteilung wird in Figur 4A und 5C gemäß des Helligkeitsbalkens invertiert gezeigt (255 steht hier für die maximale Fluoreszenz-Intensität).

Figuren 4B und 4D zeigen das Intensitätsprofil der Zellen in Figur 4A und 4C als Höhenverteilung.

Die in den Figuren 4A und 4B gezeigten Aufnahmen entstanden ohne Speckle-Reducer. Das Beleuchtungslicht weist hier zwar eine hohe Intensität auf, aufgrund der Kohärenz ist die Intensitäts-Verteilung jedoch nicht homogen. Die Abbildungs-Qualität ist durch Flecken (Speckles) beinträchtigt: Die Zelle zeigt scharf definierte, helle Punkte auf einem dunkleren Hintergrund, obwohl das Fusionsprotein im Zytoplasma homogen verteilt ist. Der Kern, in den das Protein nur teilweise eindringt, ist wegen des aufgrund der Speckles fehlenden räumlichen Kontrastes nur schwer zu erkennen (gestricheltes Oval). Die in den Figuren 4C und 4D gezeigten Aufnahmen entstanden mit Speckle-Reducer im Beleuchtungs-Strahlengang. Die Verteilung der Fluoreszenz zeigt die reelle Verteilung des Fusionsproteins mit klar erkennbarem Kern und scharf abgebildeten Zellrändern. Die verbleibende Heterogenität ist durch Höhenunterschiede der Zelle (vermehrt um den Kernbereich) und Ausschluß zytoplasmatischer Organellen zu erklären und ist vollkommen frei von Speckle-Artefakten.

Das in Figur 3 gezeigte Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Vorrichtung mit einem angepassten IX2-RFAEVA-2 TIRF Faser-Illuminator-Modul der Fa. Olympus wurde auch für Fluoreszenz-Lebensdauer-Imaging-Mikroskopie (FLIM) eingesetzt. Hierzu wurde der Laser hochfrequent moduliert und die Fluoreszenz mittels einer FLIM-Kamera (Fa. PCO, Regensburg) analysiert. Die hierfür einsetzbaren, speziellen direkt-hochfrequent modulierbaren Laser sind nicht so leistungsstark wie nicht modulierbare (CW-)Laser. Außerdem sinkt entsprechend dem Puls-Pause-Verhältnis der Modulation die zeitlich gemittelte Leistung weiter. Bei üblichen Puls-

Pause-Verhältnissen von 50% (z.B. Sinus- oder Rechteck-Modulation) bleibt demnach nur die Hälfte der Maximal-Leistung. Für solche Anwendungen ist eine effiziente und Speckle-reduzierte Einkopplung wie in dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Verfahren beschrieben essentiell.

Die Figur 5 zeigt einen ungefärbten Paraffin-Dünnschnitt menschlichen Lungengewebes, wie er üblicherweise zu pathologisch-histologischen Untersuchungen, hergestellt wird. Formaldehyd-fixiertes Gewebe weist eine deutliche Autofluoreszenz auf, die hier gezeigt ist. Die Probe wurde nicht mit Farbstoffen gefärbt. Die Aufnahmen entstanden mit einem Luft-gekoppelten 20x Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0,75. Die Beleuchtung erfolgte durch den Speckle-Reducer.

Die Figur 5A zeigt die Verteilung der Autofluoreszenz. Aufgrund der mit dem Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Vorrichtung erzielten homogenen Beleuchtung des Objektes ist die Fluoreszenz-Intensität über den ganzen Aufnahmebereich gleichmäßig verteilt. Stark fluoreszierende Komponenten sind die roten Blutkörperchen in den kapillaren Blutgefäße in der Wand der Lungenbläschen (Punkte) und das kollagene/elastische Gewebe in der Wand (längere Streifen). Der Rest des Gewebes, die Endothelzellen, zeigt eine homogene Fluoreszenz-Verteilung geringerer Intensität.

Figur 5B zeigt die mittels der FLIM-Kamera bestimmte Fluoreszenz-Lebensdauer-Verteilung der gleichen Probe. Die hellen roten Blutkörperchen haben eine kurze Lebensdauer (hier hell abgebildet), die hellen kollagenen/elastischen Fasern dagegen eine lange Lebensdauer (hier dunkel abgebildet). Die alveolären Endothelzellen weisen eine mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer auf.

In Figur 6 ist dargestellt, dass eine einfache Segmentierung auf Lebensdauerwert-Bereiche die einzelnen Komponenten in der Autofluoreszenz der FLIM-Aufnahme in Figur 5B zeigt. Demnach liefert die Lebensdauer-Mikroskopie anatomisch-funktionelle Trennparameter in der Autofluoreszenz.

Figur 6A zeigt die roten Blutkörperchen im Bereich von 0,05 bis 1,2 ns.

Figur 6B zeigt die alveolären Makrophagen im Bereich von 1 - 2ns. Es existiert ein Überlapp mit längeren Lebensdauerwerten in (kürzeren) roten Blutkörperchen und kürzeren Werten in (längeren) Endothelzellen. Zwei Makrophagen werden angezeigt.

Figur 6C zeigt die alveolären Endothelzellen im Bereich 2 - 2,5 ns.

Figur 6D zeigt die in Fasern vorliegenden kollagenen/elastischen Gewebe-Komponenten, die der mechanischen Stabilität dienen. Diese liegen oftmals undulierend um Hohlbereiche (wie in drei Fällen in Figur 6D zu sehen ist) und in der Wand von Arterien/Arteriolen vor.

Patentansprüche

1. Fluoreszenz-Mikroskop zur Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie, das eine Strahlungsquelle zum Aussenden elektromagnetischer Strahlung aufweist, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Strahlungsquelle ein Laser ist, der derart angeordnet ist, dass die ausgesandte elektromagnetische Strahlung durch einen optischen Diffusor geleitet wird, wobei der optische Diffusor ein aktives optisches Element zur Kohärenz-Unterdrückung ist.

2. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fluoreszenz-Mikroskop ein optisches Abbildungssystem aufweist, das eingerichtet ist, eine Lichtfläche des optischen Diffusors in einem Abbildungsmaßstab an einer Abbildungsposition in einem Objektiv des Fluoreszenz-Mikroskops abzubilden, wobei die Abbildungsposition vorteilhafterweise eine hintere Fokusebene des Objektives ist.

3. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Abbildungssystem eine optische Anpassungsvorrichtung aufweist, durch die der Abbildungsmaßstab und/oder die Abbildungsposition veränderbar ist.

4. Fluoreszenz-Mikroskop nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fluoreszenz-Mikroskop eine Filtereinrichtung aufweist, die eingerichtet ist,
   - elektromagnetische Strahlung einer Anregungswellenlänge auf ein Objekt und
   - elektromagnetische Strahlung einer Fluoreszenz-Wellenlänge von dem Objekt auf einen Detektor zu leiten,

wobei wenigstens ein optisches Element des Abbildungssystems mit der Filtereinrichtung eine Filterbaugruppe bildet.

5. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Anpassungsvorrichtung eine Mehrzahl gegeneinander auswechselbarer Linsensysteme aufweist.

6. Fluoreszenz-Mikroskop nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fluoreszenz-Mikroskop eine Mehrzahl von auswählbaren Objektiven aufweist.

7. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Objektive unterschiedlicher Aperturen aufweisen und die Anpassungsvorrichtung eingerichtet ist, den Abbildungsmaßstab so anzupassen, dass die jeweilige Apertur zumindest nahezu vollständig, bevorzugt jedoch vollständig, ausgeleuchtet wird.

8. Fluoreszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 4 bis 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fluoreszenz-Mikroskop eine Mehrzahl von auswechselbaren Filterbaugruppen aufweist.

9. Fluoreszenz-Mikroskop nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** sich zumindest einige der Filterbaugruppen in dem optischen Element des Abbildungssystems unterscheiden.

10. Fluoreszenz-Mikroskop nach einem der Ansprüche 4 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Abbildungssystem derart eingerichtet ist, dass elektromagnetische Strahlung als kollimiertes Strahlenbündel in die Filterbaugruppe eingeleitet wird.

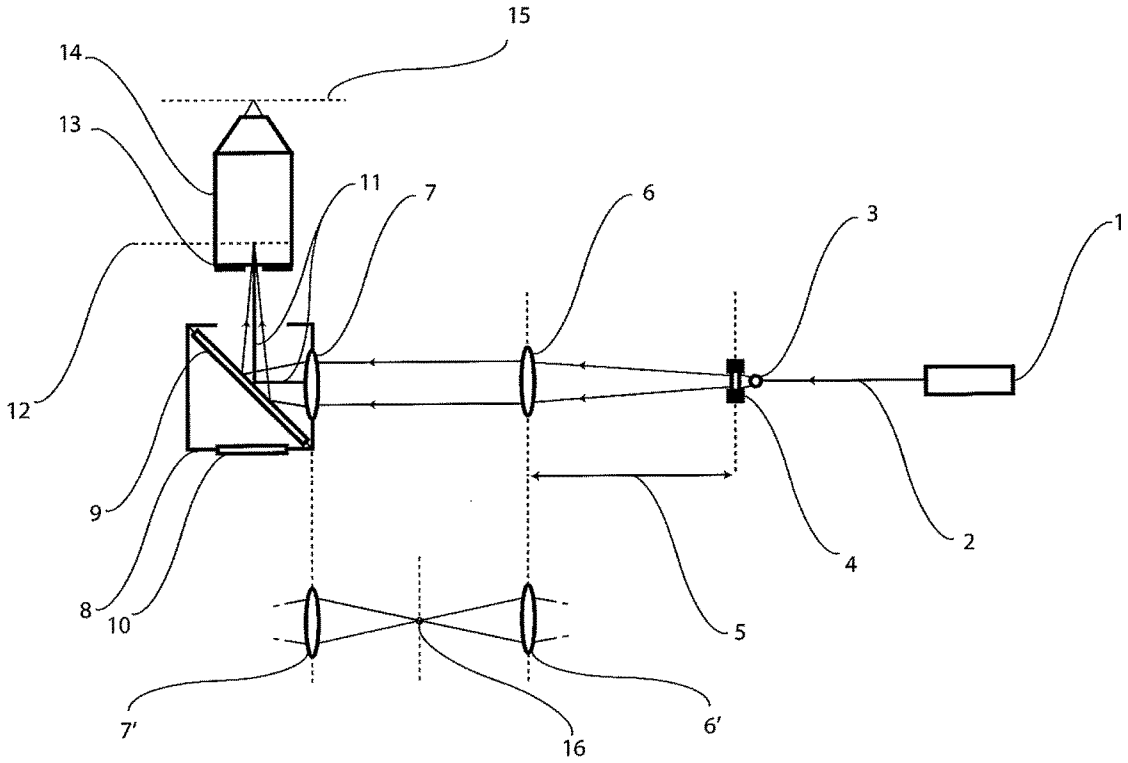


Abbildung 1

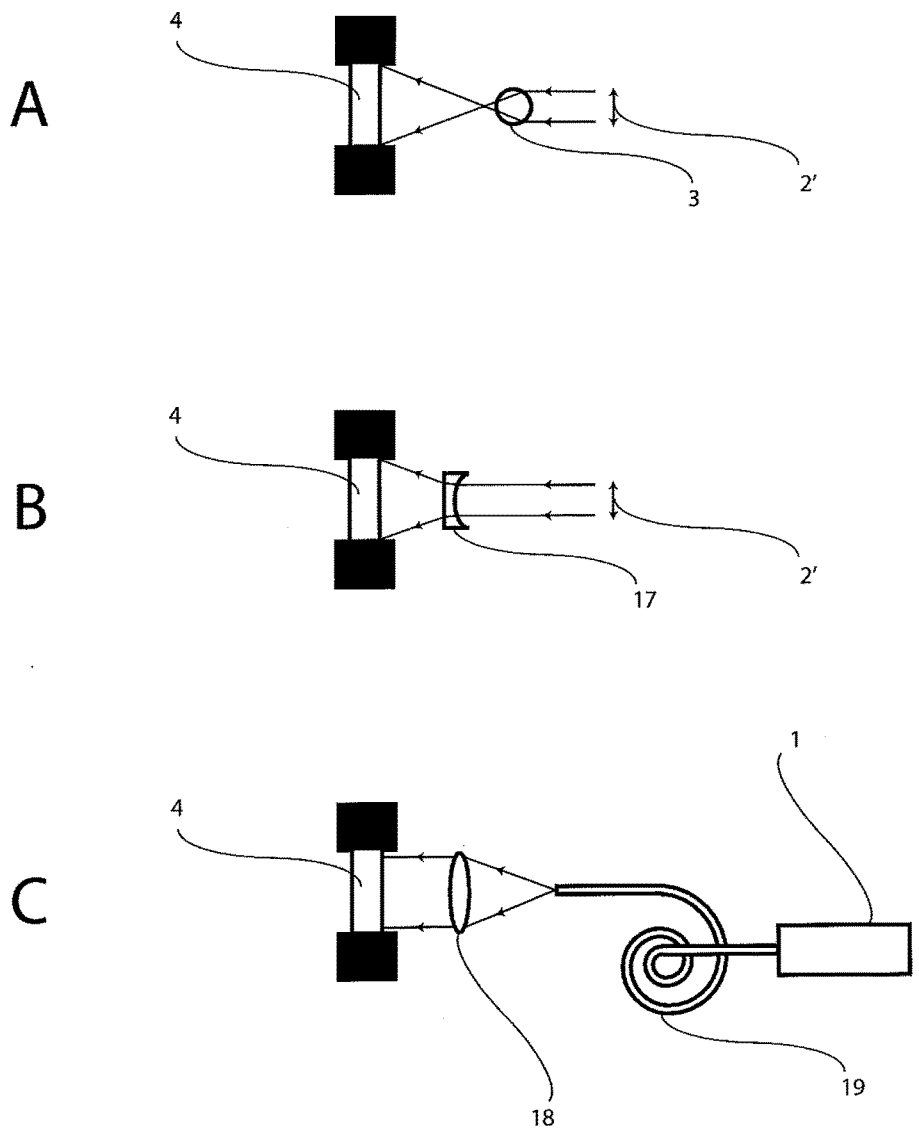


Abbildung 2

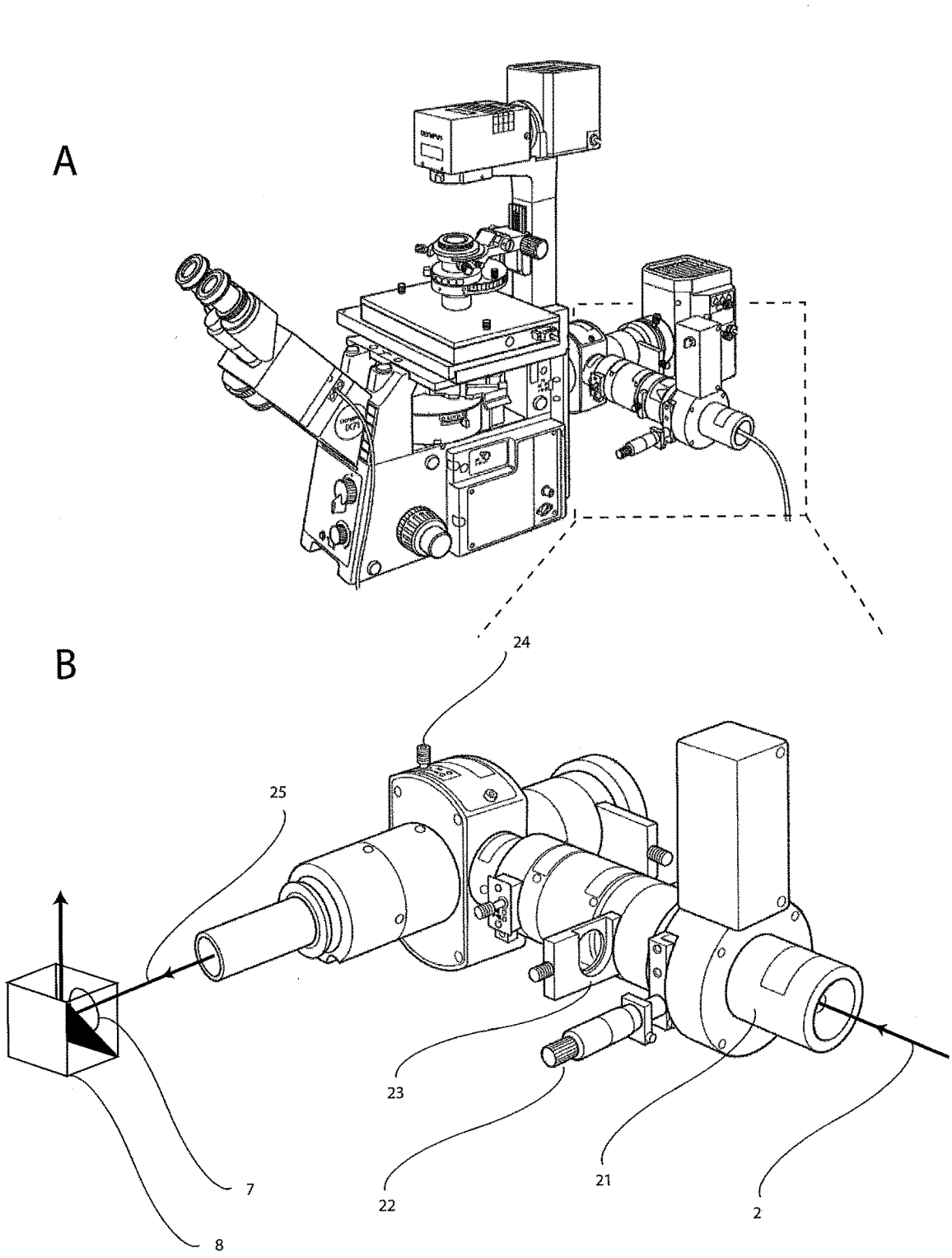


Abbildung 3

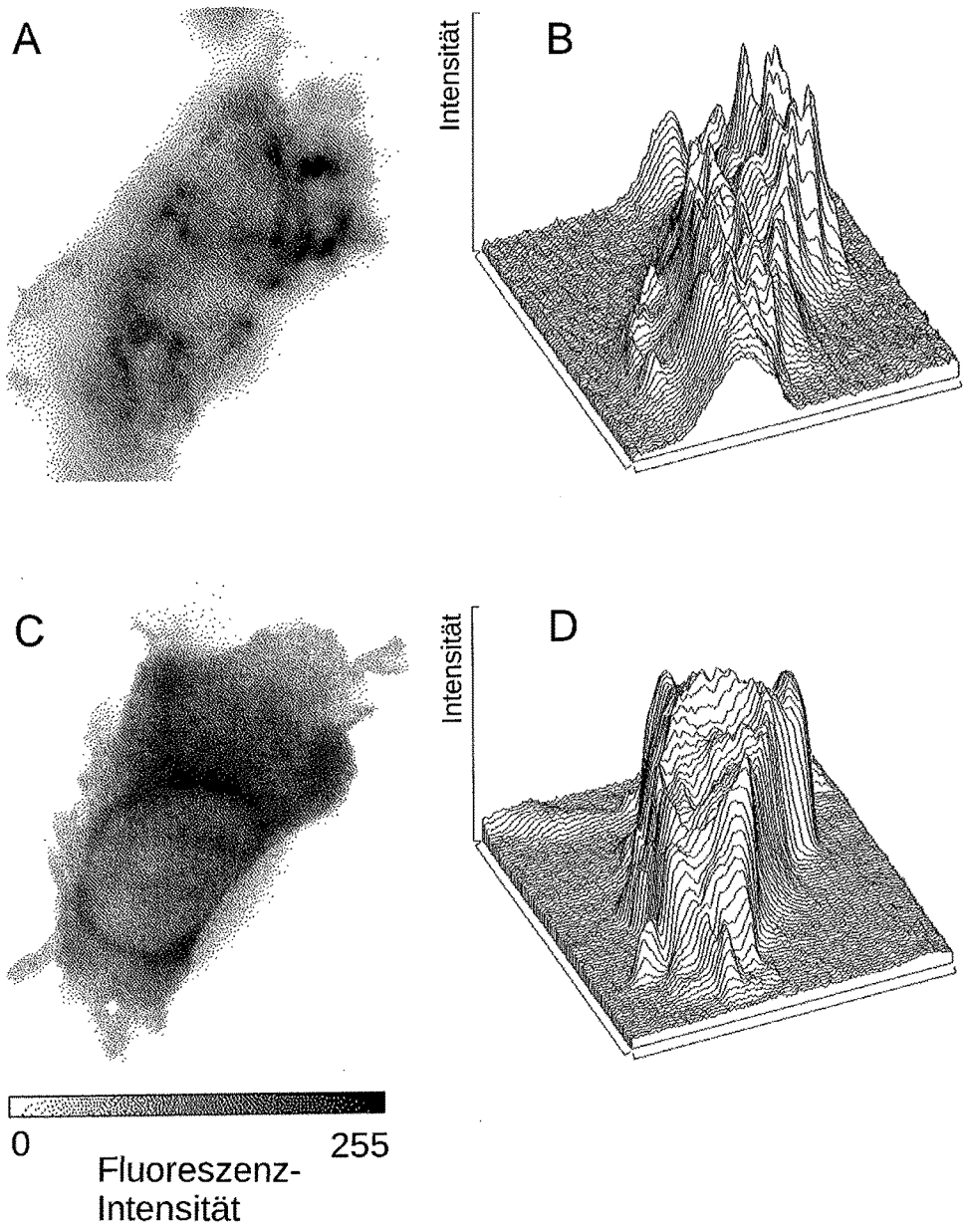


Abbildung 4

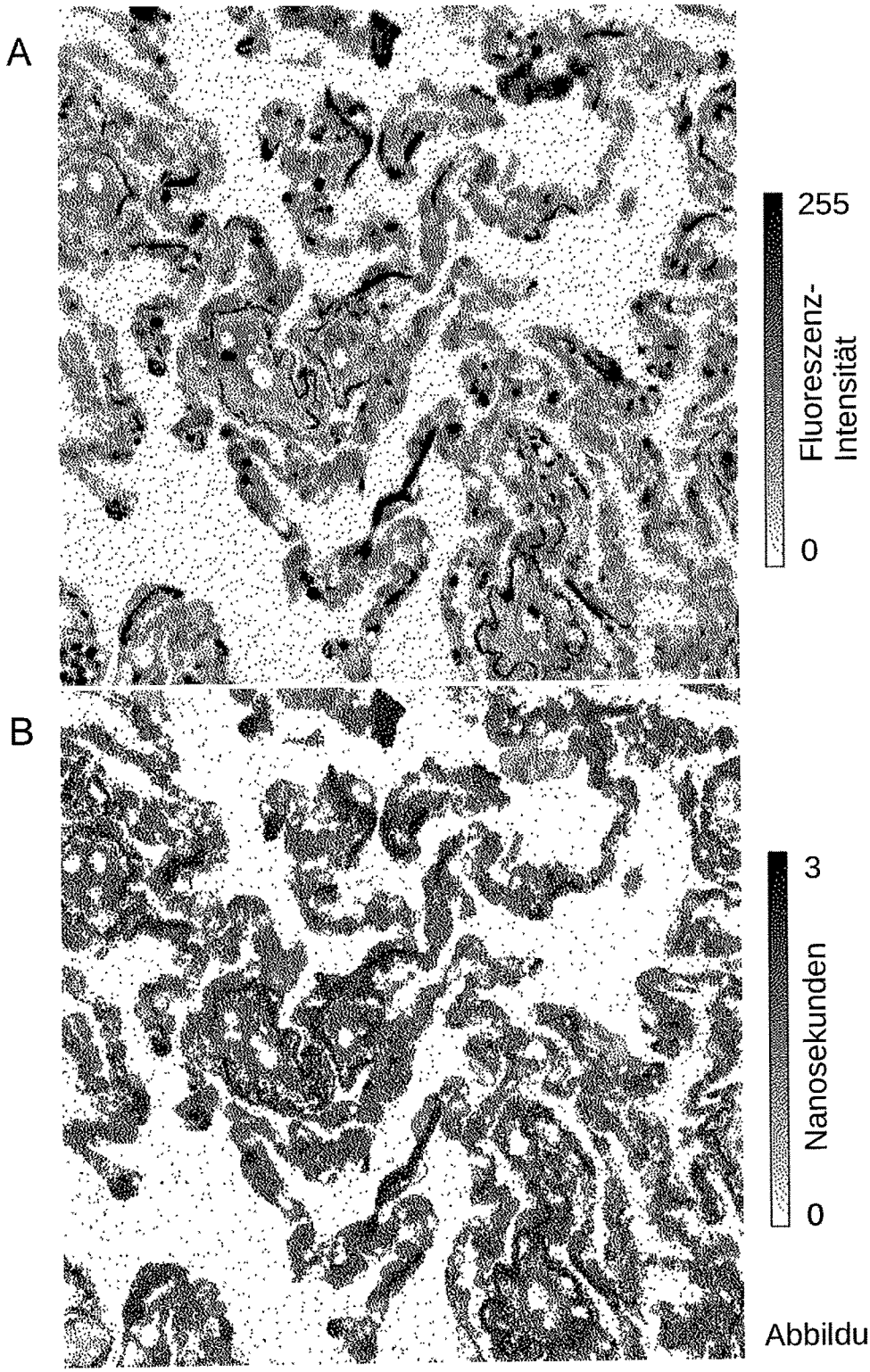


Abbildung 5

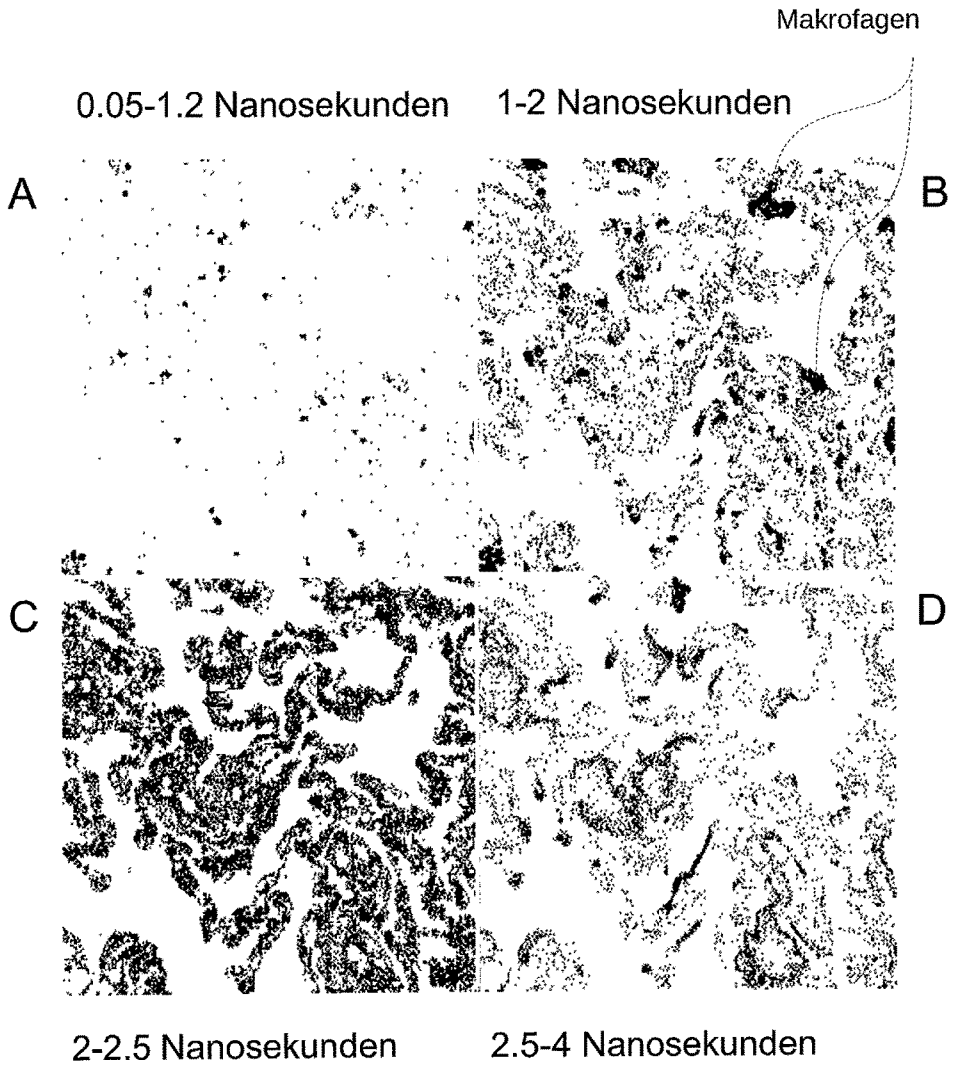

Makrofagen
0.05-1.2 Nanosekunden
1-2 Nanosekunden
A
B
C
D
2-2.5 Nanosekunden
2.5-4 Nanosekunden

Abbildung 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/068235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/16 G02B27/48
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/156098 A1 (DUBOIS FRANK [BE] ET AL) 12 August 2004 (2004-08-12) paragraphs [0038], [0039]; figure 3	1,2
X	US 2013/100525 A1 (CHIANG SU YU [TW] ET AL) 25 April 2013 (2013-04-25) paragraphs [0012], [0013], [0029]; figure 3	1,3,4, 8-10
X	WO 2009/133111 A1 (OPTYKA LTD [IE]; SQALLI OMAR [IE]) 5 November 2009 (2009-11-05) page 1, lines 19-21 page 3, lines 1-22	1
X	EP 1 515 175 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH CORP [JP]) 16 March 2005 (2005-03-16) paragraphs [0006] - [0009], [0017] - [0028]	1,6

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 September 2016	10/10/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mollenhauer, Ralf

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/068235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 241 921 A1 (KARL STORZ ENDOSKOP PRODUKTION [DE]) 20 October 2010 (2010-10-20) claim 1	1
A	US 6 249 381 B1 (SUGANUMA HIROSHI [JP]) 19 June 2001 (2001-06-19) page 20, line 60 - page 21, line 41; figure 16	1-10
A	WO 2005/045502 A1 (FACHHOCHSCHULE MANNHEIM HOCHSC [DE]; SUHR HAJO [DE]) 19 May 2005 (2005-05-19) page 4, paragraph 2 - page 5, paragraph 2	1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/068235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004156098 A1	12-08-2004	AU 2002344849 A1	03-03-2003
		CA 2451166 A1	09-01-2003
		CA 2724743 A1	09-01-2003
		EP 1399730 A2	24-03-2004
		EP 2420822 A2	22-02-2012
		ES 2398088 T3	13-03-2013
		JP 2004538451 A	24-12-2004
		US 2004156098 A1	12-08-2004
		US 2006132799 A1	22-06-2006
		WO 03002972 A2	09-01-2003
US 2013100525 A1	25-04-2013	JP 5524308 B2	18-06-2014
		JP 2013088808 A	13-05-2013
		TW 201317621 A	01-05-2013
		US 2013100525 A1	25-04-2013
WO 2009133111 A1	05-11-2009	NONE	
EP 1515175 A1	16-03-2005	EP 1515175 A1	16-03-2005
		JP 2004020988 A	22-01-2004
		US 2005226556 A1	13-10-2005
		WO 03107071 A1	24-12-2003
EP 2241921 A1	20-10-2010	DE 102009017940 A1	21-10-2010
		EP 2241921 A1	20-10-2010
		US 2010268034 A1	21-10-2010
US 6249381 B1	19-06-2001	JP H11326826 A	26-11-1999
		KR 19990088198 A	27-12-1999
		US 6249381 B1	19-06-2001
WO 2005045502 A1	19-05-2005	DE 10350243 A1	19-05-2005
		WO 2005045502 A1	19-05-2005

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2016/068235

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G02B21/16 G02B27/48
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G02B

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2004/156098 A1 (DUBOIS FRANK [BE] ET AL) 12. August 2004 (2004-08-12) Absätze [0038], [0039]; Abbildung 3	1,2
X	US 2013/100525 A1 (CHIANG SU YU [TW] ET AL) 25. April 2013 (2013-04-25) Absätze [0012], [0013], [0029]; Abbildung 3	1,3,4, 8-10
X	WO 2009/133111 A1 (OPTYKA LTD [IE]; SQALLI OMAR [IE]) 5. November 2009 (2009-11-05) Seite 1, Zeilen 19-21 Seite 3, Zeilen 1-22	1
X	EP 1 515 175 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH CORP [JP]) 16. März 2005 (2005-03-16) Absätze [0006] - [0009], [0017] - [0028]	1,6

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
29. September 2016	10/10/2016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mollenhauer, Ralf

1

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 2 241 921 A1 (KARL STORZ ENDOSKOP PRODUKTION [DE]) 20. Oktober 2010 (2010-10-20) Anspruch 1 -----	1
A	US 6 249 381 B1 (SUGANUMA HIROSHI [JP]) 19. Juni 2001 (2001-06-19) Seite 20, Zeile 60 - Seite 21, Zeile 41; Abbildung 16 -----	1-10
A	WO 2005/045502 A1 (FACHHOCHSCHULE MANNHEIM HOCHSC [DE]; SUHR HAJO [DE]) 19. Mai 2005 (2005-05-19) Seite 4, Absatz 2 - Seite 5, Absatz 2 -----	1

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2016/068235

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2004156098 A1	12-08-2004	AU 2002344849 A1	03-03-2003
		CA 2451166 A1	09-01-2003
		CA 2724743 A1	09-01-2003
		EP 1399730 A2	24-03-2004
		EP 2420822 A2	22-02-2012
		ES 2398088 T3	13-03-2013
		JP 2004538451 A	24-12-2004
		US 2004156098 A1	12-08-2004
		US 2006132799 A1	22-06-2006
		WO 03002972 A2	09-01-2003
US 2013100525 A1	25-04-2013	JP 5524308 B2	18-06-2014
		JP 2013088808 A	13-05-2013
		TW 201317621 A	01-05-2013
		US 2013100525 A1	25-04-2013
WO 2009133111 A1	05-11-2009	KEINE	
EP 1515175 A1	16-03-2005	EP 1515175 A1	16-03-2005
		JP 2004020988 A	22-01-2004
		US 2005226556 A1	13-10-2005
		WO 03107071 A1	24-12-2003
EP 2241921 A1	20-10-2010	DE 102009017940 A1	21-10-2010
		EP 2241921 A1	20-10-2010
		US 2010268034 A1	21-10-2010
US 6249381 B1	19-06-2001	JP H11326826 A	26-11-1999
		KR 19990088198 A	27-12-1999
		US 6249381 B1	19-06-2001
WO 2005045502 A1	19-05-2005	DE 10350243 A1	19-05-2005
		WO 2005045502 A1	19-05-2005