

(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
07. Dezember 2017 (07.12.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/207807 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G02B 21/00 (2006.01) G02B 21/36 (2006.01)
G02B 21/18 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/063576

(22) Internationales Anmeldedatum:
02. Juni 2017 (02.06.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 110 354.3
03. Juni 2016 (03.06.2016) DE

(71) Anmelder: LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH
[DE/DE]; Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(72) Erfinder: TILLE, Sebastian; Sperberweg 10, 35043 Marburg (DE). FAHRBACH, Florian; Cambridgestr. 8, 69115 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: BRADL, Joachim; Leica Microsystems GmbH, Corporate Patents + Trademarks Dept., Ernst-Leitz-Str. 17-37, 35578 Wetzlar (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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) Title: LIGHT SHEET MICROSCOPE AND MICROSCOPIC METHOD USING A LIGHT SHEET MICROSCOPE

(54) Bezeichnung: LICHTBLATTMIKROSKOP UND MIKROSKOPISCHES VERFAHREN MIT EINEM LICHTBLATTMIKROSKOP

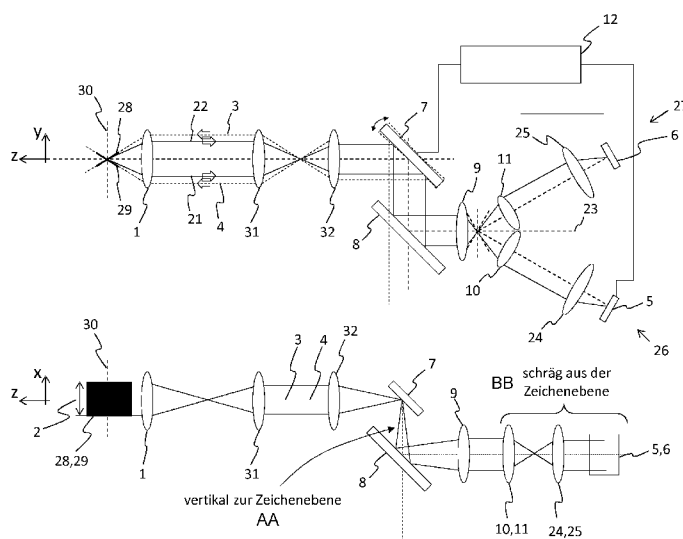


Fig. 1

AA Vertical to the plane of the drawing
BB Obliquely out of the plane of the drawing

(57) Abstract: In view of the realization of highly resolved images of a specimen by constructively simple means, a light sheet microscope having a specimen-side objective (1), having an illumination device for providing a first illumination beam (3), which is focused for forming a first light sheet for illuminating a sample from a first direction, said light sheet being inclined obliquely in relation to an optical axis (2) of the objective (1) and being guided through the objective (1), and having a detection device for detection light passing through the objective (1), is configured and developed in such a way that the illumination device is embodied, moreover, for providing at least one second illumination beam (4), which is focused for forming at least one second light sheet for illuminating the sample from at least one second direction that differs from the first direction, said at least one second light sheet being inclined obliquely in relation



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, 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).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

to the optical axis (2) of the objective (1) and being guided through the objective (1). Moreover, a microscopic method using a light sheet microscope, in particular using a light sheet microscope as described above, is specified.

(57) Zusammenfassung: Im Hinblick auf die Realisierung hochauflösender Bilder einer Probe mit konstruktiv einfachen Mitteln ist ein Lichtblattmikroskop mit einem probenseitigen Objektiv (1), mit einer Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung eines ersten Beleuchtungsstrahls (3), der zur Bildung eines schräg zu einer optischen Achse (2) des Objektivs (1) geneigten und durch das Objektiv (1) geführten ersten Lichtblatts zur Beleuchtung einer Probe aus einer ersten Richtung fokussiert ist, und mit einer Detektionseinrichtung für durch das Objektiv (1) gelangendes Detektionslicht derart ausgestaltet und weitergebildet, dass die Beleuchtungseinrichtung des Weiteren zur Bereitstellung mindestens eines zweiten Beleuchtungsstrahls (4) ausgebildet ist, der zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse (2) des Objektivs (1) geneigten und durch das Objektiv (1) geführten mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden mindestens einen zweiten Richtung fokussiert ist. Des Weiteren ist ein mikroskopisches Verfahren mit einem Lichtblattmikroskop, insbesondere mit einem wie oben beschriebenen Lichtblattmikroskop, angegeben.

Lichtblattmikroskop und mikroskopisches Verfahren mit einem Lichtblattmikroskop

Die Erfindung betrifft ein Lichtblattmikroskop mit einem probenseitigen Objektiv, mit
5 einer Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung eines ersten Beleuchtungsstrahls, der zur Bildung eines schräg zu einer optischen Achse des Objektivs geneigten und durch das Objektiv geführten ersten Lichtblatts zur Beleuchtung einer Probe aus einer ersten Richtung fokussiert ist, und mit einer Detektionseinrichtung für durch das Objektiv gelangendes Detektionslicht.

Des Weiteren betrifft die Erfindung ein mikroskopisches Verfahren mit einem Licht-
blattmikroskop, wobei ein erster Beleuchtungsstrahl mittels einer Beleuchtungsein-
richtung bereitgestellt wird, der zur Bildung eines schräg zu einer optischen Achse
eines probenseitigen Objektivs geneigten und durch das Objektiv geführten ersten
15 Lichtblatts zur Beleuchtung einer Probe aus einer ersten Richtung fokussiert wird, und wobei durch das Objektiv gelangendes Detektionslicht mit einer Detektionseinrichtung detektiert wird.

Lichtblattmikroskope und mikroskopische Verfahren mit derartigen Lichtblattmikro-
20 skopen sind aus der Praxis bekannt und existieren in unterschiedlichen Ausführungsformen. Beispielsweise sind Lichtblattmikroskope zur Beleuchtung einer Probe mit einem schräg gegen eine optische Achse gekippten Lichtblatt aus der US 8 619 237 B2, aus der WO 2015/109323 A2 und aus der US 8 582 203 B2 bekannt. Gemäß diesem Stand der Technik wird eine Probe beispielsweise bei der OPM/SCAPE
25 (Oblique Plane Microscopy/Swept Confocally-Aligned Planar Excitation)-Mikroskopie immer nur von einer feststehenden Seite aus oder aus einer Richtung beleuchtet und annähernd senkrecht dazu detektiert. Die Möglichkeit zur Fusion und Entfaltung von Bildern, die aus mehreren Richtungen aufgenommen werden, ist daher nicht möglich, ohne das Objekt oder die Probe zu drehen. Damit entfällt auch eine einfache, erprobte
30 und etablierte Möglichkeit zur Erzeugung von Bilddaten mit isotroper Auflösung. Es wäre kompliziert, aufwändig und teuer, eine Möglichkeit in das System zu integrieren, die die Beleuchtung der Probe aus mehreren Richtungen ermöglicht, beispielsweise durch die Rotation des optischen Strahlengangs. Dabei könnte es in besonders aufwändiger Weise erforderlich sein, eine Aufrichtungseinheit inklusive Kamera und
35 möglicherweise weiteren Bauteilen mit zu rotieren.

Eine Beleuchtung und Betrachtung einer Probe aus zwei oder mehreren Richtungen wurde im Bereich der SPIM (Single Plane Illumination Microscopy)-Mikroskopie weiterhin durch Drehung der Probe erreicht.

5

Bei dem Lichtblattmikroskop gemäß der WO 2015/109323 A2 werden beispielsweise Fluorophore durch einen Beleuchtungsstrahl angeregt, der über ein probenseitiges Objektiv geführt und gegenüber der optischen Achse des Objektivs verkippt ist. Das von dem Lichtblatt ausgehende Licht wird vom selben probenseitigen Objektiv aufgefangen. Über eine telezentrische Optik und ein zweites Objektiv wird durch dieses Licht ein Bild erzeugt, das in gleicher Weise gegenüber der optischen Achse des zweiten Objektivs verkippt ist. Dieses sogenannte „Luftbild“ kann durch eine weitere Optik, typischerweise ein drittes Objektiv und eine Tubuslinse, auf einen Sensor abgebildet werden, wobei die optische Achse oder der Strahlengang der Optik und des Sensors so verkippt ist, dass die Optik senkrecht auf das Luftbild gerichtet ist und das Luftbild in der Fokusebene der Optik, z.B. des dritten Objektivs liegt.

10

15

20

Ausgehend von diesem Stand der Technik liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Lichtblattmikroskop sowie ein mikroskopisches Verfahren mit einem Lichtblattmikroskop der eingangs genannten Art derart auszugestalten und weiterzubilden, dass hochauflösende Bilder einer Probe mit konstruktiv einfachen Mitteln realisierbar sind.

25

Erfindungsgemäß wird die voranstehende Aufgabe durch ein Lichtblattmikroskop mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie durch mikroskopische Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 11 und 12 gelöst.

30

Danach ist gemäß Anspruch 1 das Lichtblattmikroskop derart ausgestaltet und weitergebildet, dass die Beleuchtungseinrichtung des Weiteren zur Bereitstellung mindestens eines zweiten Beleuchtungsstrahls ausgebildet ist, der zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse des Objektivs geneigten und durch das Objektiv geführten mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden mindestens einen zweiten Richtung fokussiert ist.

35

Des Weiteren ist danach das Verfahren gemäß Anspruch 11 derart ausgestaltet und weitergebildet, dass des Weiteren mindestens ein zweiter Beleuchtungsstrahl mittels der Beleuchtungseinrichtung bereitgestellt wird, der zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse des Objektivs geneigten und durch das Objektiv geführten
5 mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden mindestens einen zweiten Richtung fokussiert wird.

In erfindungsgemäßer Weise ist zunächst erkannt worden, dass durch geschickte Realisierung der Strahlführung in dem Lichtblattmikroskop und durch geschickte Ausgestaltung der Beleuchtungseinrichtung die voranstehende Aufgabe auf überraschend einfache Weise gelöst wird. In weiter erfindungsgemäßer Weise ist hierzu im Konkreten erkannt worden, dass die zusätzliche Ausbildung der Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung mindestens eines zweiten Beleuchtungsstrahls eine
10 sichere zusätzliche Beleuchtung der Probe aus mindestens einer weiteren Richtung ermöglichen kann. Dabei ist der mindestens eine zweite Beleuchtungsstrahl in weiter konkreter Weise zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse des Objektivs geneigten und durch das Objektiv geführten mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden
15 mindestens einen zweiten Richtung fokussiert. Im Ergebnis wird die Probe aus zwei Richtungen beleuchtet, wobei die Beleuchtung der Probe jeweils mit einem Lichtblatt erfolgt, wobei die Probe nicht bewegt werden muss, um beispielsweise dreidimensionale Bilderstapel aus den mindestens zwei Richtungen aufzunehmen. Die Bilder können in einem Post-Processing-Schritt verrechnet werden, um einen
20 Bilderstapel mit ungefähr isotroper Auflösung zu erhalten.

Folglich sind mit dem erfindungsgemäßen Lichtblattmikroskop und dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Lichtblattmikroskop und ein Verfahren angegeben, wonach hochauflösende Bilder einer Probe mit konstruktiv einfachen Mitteln, insbesondere
25 ohne das Erfordernis der Bewegung einer Probe, realisierbar sind.

Bei einer konkreten Ausgestaltung eines Lichtblattmikroskops und mikroskopischen Verfahrens kann beispielsweise ein zweiter Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang in eine vorhandene Optik derart integriert werden, dass die Beleuchtungs- und
35 die Detektionsrichtung jeweils vertauscht sind. Mit anderen Worten entspricht der

Beleuchtungsstrahlengang des ersten Beleuchtungsstrahls dem Detektionsstrahlengang des zweiten Beleuchtungsstrahls und umgekehrt.

5 Bei dem probenseitigen Objektiv des Lichtblattmikroskops handelt es sich um ein Objektiv, welches sowohl zur Beleuchtung der Probe mit mindestens zwei Beleuchtungsstrahlen als auch zur Detektion des von diesen Beleuchtungsstrahlen erzeugten Detektionslichts, beispielsweise angeregtes Fluoreszenzlicht, dient.

10 Bei einer konkreten Ausführungsform des Lichtblattmikroskops können – beispielsweise im Fall von zwei bereitgestellten Beleuchtungsstrahlen – die erste Richtung und die zweite Richtung mindestens zweier Beleuchtungsstrahlen senkrecht zueinander oder ungefähr senkrecht zueinander stehen. Grundsätzlich können die Beleuchtungsstrahlen in den Randbereich der Pupille oder der hinteren Brennebene des probenseitigen Objektivs gelenkt sein, um die erforderliche schräge Beleuchtung der
15 Probe von der Seite aus zu gewährleisten. Falls die Apertur des probenseitigen Objektivs nicht dazu ausreicht, um die Beleuchtungsstrahlen in einem Winkel von 90° gegeneinander in das Probenvolumen einzustrahlen, können die erste Richtung und die zweite Richtung auch nicht senkrecht zueinander sondern in einem kleineren Winkel zueinander stehen.

20 Im Hinblick auf eine besonders sichere Detektion eines Detektionslichts kann die Detektionseinrichtung einen ersten Sensor für durch den ersten Beleuchtungsstrahl verursachtes und entlang einem ersten Detektionsstrahlengang im Objektiv verlaufendes erstes Detektionslicht und mindestens einen zweiten Sensor für durch den
25 mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahl verursachtes und entlang mindestens einem zweiten Detektionsstrahlengang im Objektiv verlaufendes mindestens zweites Detektionslicht aufweisen. Insoweit kann für jedes durch einen jeweiligen Beleuchtungsstrahl verursachtes Detektionslicht ein eigener Sensor bereitgestellt sein, um dann genau dieses Detektionslicht, das entlang seinem individuellen Detektionsstrahlengang verläuft, zu detektieren. Dabei können die Strahlengänge dazu
30 geeignet und/oder eingerichtet sein, zu einer optischen Achse schräge Bildebenen aufzurichten. Durch die Realisierung derartiger mehrerer Sensoren für mehrere Detektionslichter ist weiterhin ein besonders individueller Betrieb – je nach Erfordernis – ermöglicht, da ausgewählt werden kann, welche Beleuchtungsstrahlen erzeugt und

verarbeitet werden sollen. Hierdurch ist eine besonders hohe Flexibilität beim Gebrauch des Lichtblattmikroskops gewährleistet.

Die Beleuchtungseinrichtung kann bei einem konkreten Ausführungsbeispiel zur gleichzeitigen Bereitstellung des ersten Beleuchtungsstrahls und des mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahls oder zur Bereitstellung des ersten Beleuchtungsstrahls und des mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahls zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vorzugsweise alternierend oder in einer vorgebbaren Abfolge, ausgebildet sein.

Alternativ oder zusätzlich hierzu kann die Detektionseinrichtung oder können die Sensoren der Detektionseinrichtung zur gleichzeitigen Detektion des ersten Detektionslichts und des mindestens einen zweiten Detektionslichts oder zur Detektion des ersten Detektionslichts und des mindestens einen zweiten Detektionslichts zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vorzugsweise alternierend oder in einer vorgebbaren Abfolge, ausgebildet sein. Nicht nur durch eine vorgebbare zeitliche Abfolge der Bereitstellung der Beleuchtungsstrahlen sondern auch durch eine vorgebbare Abfolge der Detektionsfunktion der Detektionseinrichtung oder der Sensoren kann eine besonders hohe Flexibilität und Anpassung an unterschiedliche Erfordernisse und Untersuchungsmethoden mit dem erfindungsgemäßen Lichtblattmikroskop erreicht werden. In einer einfachen Situation kann eine Aufnahme von Bildern derart realisiert werden, dass der Beleuchtungsstrahl so geschaltet wird, dass zu einem ersten Zeitpunkt der erste Strahlengang zur Beleuchtung genutzt wird und ein erster Sensor ein Bild aufnimmt und anschließend – zu einem zweiten Zeitpunkt – ein zweiter Beleuchtungsstrahlengang aktiviert und mit einem zweiten Sensor ein Bild aus beispielsweise annähernd orthogonaler Richtung aufgenommen wird.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des Lichtblattmikroskops kann im Strahlengang vor der Detektionseinrichtung oder vor mindestens einem Sensor ein Emissionsfilter, Bandpassfilter oder Filter für das erste und/oder das mindestens eine zweite Detektionslicht angeordnet sein. Derartige Emissionsfilter können in verschiedenen Ausprägungen implementiert werden, wobei beispielsweise ein Prisma oder ein Gitter eingesetzt werden kann. Dabei kann ein Emissionsfilter, Bandpassfilter oder Filter in einem Strahlengang positioniert werden, der mindestens einem der Sensoren nicht zugeordnet ist. Mit anderen Worten wird das Licht in dem

Strahlengang, in dem sich der Filter befindet, auf mindestens einen Sensor abgebildet und auf mindestens einen anderen Sensor nicht abgebildet. Derartige Filter sind üblicherweise in einem Unendlich-Strahlengang angeordnet, also in einem Strahlengang, in dem das Detektionslicht weder fokussiert noch divergent verläuft, sondern kollimiert ist.

Im Hinblick auf eine konstruktiv besonders einfache Ausgestaltung des Lichtblattmikroskops kann die Beleuchtungseinrichtung einen Dichroiten, ein Galvanometer, planparallele Glasblöcke, Lichtleitfasern oder ein polarisationsdrehendes Element mit einem polarisationsabhängigen Strahlteiler zur Einkopplung der Beleuchtungsstrahlen in einen Beleuchtungsstrahlengang aufweisen. Je nach Anwendungsfall kann eine für diesen Anwendungsfall besonders geeignete Einkopplungstechnik verwendet werden.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung kann die Detektionseinrichtung Mittel zum Zusammenführen von durch den ersten Beleuchtungsstrahl verursachtem und entlang einem ersten Detektionsstrahlengang im Objektiv verlaufendem ersten Detektionslicht und von durch den mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahl verursachtem und entlang mindestens einem zweiten Detektionsstrahlengang im Objektiv verlaufendem mindestens zweitem Detektionslicht auf einen Sensor aufweisen. Dabei wird Detektionslicht aus unterschiedlichen Detektionsstrahlengängen auf ein und denselben Sensor geführt. Bei dieser Ausgestaltung ist es also nicht erforderlich, jedem Detektionsstrahlengang einen separaten Sensor zuzuordnen. Grundsätzlich kann das mindestens eine zweite Detektionslicht mit geeigneten optischen Mitteln auf einen Sensor oder den ersten Sensor umgelenkt werden, so dass kein weiterer Sensor erforderlich ist. Dieser Umlenkaufwand kann günstiger sein, als die Realisierung eines oder mehrerer weiterer Sensoren, und zwar einerseits in Bezug auf System-Kosten und andererseits in Bezug auf einen erforderlichen Justage- und Kalibrations-Aufwand bezüglich der möglichen weiteren Sensoren oder Kameras. Dabei ist insbesondere zu berücksichtigen, dass es meist recht aufwändig ist, mehrere Sensoren oder Kameras aufeinander abzustimmen, auch weil sie sich meist in ihrer Performance voneinander unterscheiden. Das Führen oder Umlenken des mindestens einen zweiten Detektionslichts auf einen oder den ersten Sensor bietet sich beispielsweise an, wenn eine Detektion des Detektionslichts unterschiedlicher

Beleuchtungsstrahlen alternierend erfolgen soll. Detektionslicht aus unterschiedlichen Detektionsstrahlengängen kann auch nebeneinander auf ein und denselben Sensor geführt werden.

5 Im Hinblick auf eine besonders sichere Erzeugung hochauflösender Bilder einer Probe kann die Beleuchtungseinrichtung Mittel zur Verschiebung des ersten Lichtblatts und/oder des mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Erzeugung von Bilderstapeln aus vorzugsweise parallel zueinander liegenden Bildebenen aufweisen und kann der Detektionseinrichtung eine Auswerteeinrichtung zur Verarbeitung der Bilderstapel zugeordnet sein.

Bei einer weiter konkreten Ausführungsform können der erste Beleuchtungsstrahl und der mindestens eine zweite Beleuchtungsstrahl durch ein einziges gemeinsames optisches Element entlang einer zur optischen Achse des Objektivs senkrechten Richtung durch die Probe scanbar sein, wobei vorzugsweise dieses optische Element zum Entscannen von über dieses optische Element zurückgeführtem Detektionslicht einsetzbar ist. Ein derartiges optisches Element kann beispielsweise einen Kippspiegel oder ein Galvanometer aufweisen. Bei dem Entscannen kann die veränderliche Position der Beleuchtungsebene in der Probe auf einen ortsfesten Sensor abgebildet werden.

Des Weiteren ist ein mikroskopisches Verfahren mit einem Lichtblattmikroskop angegeben, gekennzeichnet durch die Schritte: Aufnehmen von Bildern einer Probe, wobei der Winkel zwischen den Bildebenen und der optischen Achse idealerweise gleich ist und der Winkel zwischen den Bildebenen idealerweise 90° beträgt, Erzeugen von Bilderstapeln von Bildern idealerweise parallel zueinander liegender Ebenen und Fusion der Bilderstapel beispielsweise durch eine Multiview-Entfaltung.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die nachgeordneten Ansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung bevorzugter Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

- 5 Fig. 1 in einer schematischen Darstellung einen Strahlengang in einem Lichtblattemikroskop gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung, wobei der Strahlengang zum einen in der y-z-Ebene und zum anderen in der x-z-Ebene gezeigt ist,
- Fig. 1a in einer schematischen Darstellung ein Ausführungsbeispiel mit drei Aufrichtungseinheiten,
- 10 Fig. 2 in einer schematischen Darstellung zwei Möglichkeiten der Einkopplung zweier Beleuchtungsstrahlen,
- Fig. 3a, b, c in schematischen Darstellungen einen Strahlengang in einem Lichtblattemikroskop gemäß weiterer Ausführungsbeispiele,
- 15 Fig. 4 in einer schematischen Darstellung einen Strahlengang in einem Lichtblattemikroskop gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel,
- Fig. 5 in einer schematischen Darstellung eine Bildaufnahme zum gleichen Zeitpunkt bei Emissionen mit unterschiedlichen Wellenlängen,
- 20 Fig. 6 bis 8 in schematischen Darstellungen Strahlengänge, Beleuchtungswinkel und Aperturen für Beleuchtungsobjektive mit $NA = 1,2$, $1,1$ und $1,0$.
- 25 Fig. 1 zeigt in einer schematischen Darstellung einen Strahlengang in einem Lichtblattemikroskop gemäß einem ersten Ausführungsbeispiel der Erfindung. Dabei ist der Strahlengang in der oberen Hälfte der Fig. 1 in einer y-z-Ebene und in der unteren Hälfte der Fig. 1 in einer x-z-Ebene gezeigt. Das Ausführungsbeispiel umfasst ein probenseitiges erstes Objektiv 1 mit einer optischen Achse 2, wobei ein erster Beleuchtungsstrahl 3 zu einem Zeitpunkt 1 erzeugt wird, der zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse 2 des Objektivs 1 geneigten und durch das Objektiv 1 geführten ersten Lichtblatts in einer ersten Bildebene 28 zur Beleuchtung einer Probe aus einer ersten Richtung fokussiert ist. Des Weiteren ist die Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung eines zweiten Beleuchtungsstrahls 4 zu einem Zeitpunkt 2
- 30
- 35

ausgebildet, wobei der zweite Beleuchtungsstrahl 4 zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse 2 des Objektivs 1 geneigten und durch das Objektiv 1 geführten zweiten Lichtblatts in einer zweiten Bildebene 29 zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden zweiten Richtung fokussiert ist.

5

Die Detektionseinrichtung weist einen ersten Sensor 5 für durch den ersten Beleuchtungsstrahl 3 verursachtes und entlang einem ersten Detektionsstrahlengang im Objektiv 1 verlaufendes erstes Detektionslicht 21 und einen zweiten Sensor 6 für durch den zweiten Beleuchtungsstrahl 4 verursachtes und entlang einem zweiten Detektionsstrahlengang im Objektiv 1 verlaufendes zweites Detektionslicht 22 auf. Eine Verschiebung der Lichtblätter entlang der y-Richtung erfolgt mittels eines Galvanometers 7 um einen Bilderstapel aus parallel zueinander liegenden Bildebenen zu erzeugen. Die Einkopplung der Beleuchtungsstrahlen 3, 4 erfolgt über einen Dichroiten 8.

15

Durch ein zweites Objektiv 9 wird ein Luftbild vom ersten und zweiten Detektionslicht 21 und 22 erzeugt. Wie weiter oben beschrieben erzeugt das vom ersten Beleuchtungsstrahl 3 verursachte Detektionslicht 21 ein Luftbild in einer Bildebene, welches durch eine senkrecht auf dieser Bildebene stehende erste Detektionsoptik (umfassend ein drittes Objektiv 10 und eine Tubuslinse 24) auf den ersten Sensor 5 abgebildet wird. Darüber hinaus wird auch vom zweiten Detektionslicht 22 ein zweites Luftbild in einer zweiten Bildebene erzeugt, das an der optischen Achse 23 des Objektivs 9 gespiegelt ist. Dieses Luftbild wird durch eine senkrecht auf dieser zweiten Bildebene stehende zweite Detektionsoptik (umfassend ein viertes Objektiv 11 und eine Tubuslinse 25) auf einen zweiten Sensor 6 abgebildet. Zusammenfassend werden die Luftbilder durch Detektionssysteme aufgefangen und aberrationsfrei auf Sensoren 6 und 5 abgebildet, wobei die Detektionssysteme für das erste und das zweite Luftbild zueinander an der optischen Achse des Objektivs 9 „gespiegelt“ liegen. Es wäre zwar alternativ möglich (bei Nichtverwendung einer zweiten Detektionsoptik), das System bestehend aus dem dritten Objektiv 10, einer Tubuslinse 24 und dem Sensor 5 um die optische Achse 23 des zweiten Objektivs 9 zu drehen, jedoch ist dies aufgrund der erforderlichen Präzision bei den Abmessungen und der Masse der zu bewegenden Bauteile sehr aufwändig und fehleranfällig. Der Vorteil, ein zweites Detektionssystem mit einem zweiten Sensor 6 zur Detektion der Bilder aus der zweiten Richtung aufzubauen, wie dies in Fig. 1

35

dargestellt ist, liegt auch darin, dass Bilder aus der ersten und der zweiten Richtung gleichzeitig oder innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne aufgenommen werden können, was bei einer mechanischen Rotation des gesamten Detektionssystems nicht denkbar wäre. Die Einkopplung von Beleuchtungslicht kann auch über einen oder
5 mehrere dichroitische Spiegel zwischen den dritten Objektiven 10, 11 und/oder den Tubuslinsen 24, 25 erfolgen. In diesem Fall ist kein dichroitischer Spiegel zwischen Galvanometer 7 und zweitem Objektiv 9 notwendig.

Mit dem in Fig. 1 dargestellten Ausführungsbeispiel ist eine einfache Aufnahme von
10 Bilderstapeln möglich, wobei hier ein Verkippen eines in einer hinteren Brennebene des probenseitigen Detektionsobjektivs 1 liegenden Galvanometers 7 erfolgt. Alternativ hierzu kann auch das Verschieben des das Luftbild erzeugenden Objektivs 9 entlang seiner optischen Achse 23, beispielsweise mittels eines Piezo-Aktuators (SPIM nach Dunsby), die Erzeugung und Aufnahme von Bilderstapeln ermöglichen.
15 Weiter alternativ hierzu kann einfach das Objekt relativ zum Objektiv 1 zum Erzeugen und Aufnehmen von Bilderstapeln verschoben werden, vorzugsweise entlang der Y-Achse. Die Vorteile der ersten beiden Varianten liegen darin, dass das Objekt nicht bewegt werden muss. Die letzte Variante ist optisch einfacher und auch günstiger umzusetzen.

Fig. 1 zeigt des Weiteren eine Steuereinheit 12, die beispielsweise durch eine Re-
cheneinrichtung, einen Computer oder dergleichen gebildet sein kann, wobei die Steuereinheit 12 zur Übernahme mehrerer Aufgaben ausgebildet sein kann. Dabei
25 kann es sich beispielsweise um die Steuerung der Aktorik zum relativen Versatz von Beleuchtungs-/Detektionsebene relativ zum Objekt handeln, wobei die drei dazu besonders vorteilhaften Verfahren oben beschrieben sind. Des Weiteren kann die Steuereinheit 12 – alternativ oder zusätzlich – beispielsweise das Auslesen und Verarbeiten der Bilder der Sensoren 5, 6 beziehungsweise der Sensorelemente, siehe Fig. 3c, durchführen. Alternativ oder zusätzlich hierzu kann die Steuereinheit
30 12 das Verrechnen der Bilder zu einem 3D-Bilderstapel, beispielsweise ein Bilderstapel gemäß Fig. 5, beispielsweise mittels Multi-View-Deconvolution, durchführen.

Grundsätzlich ist ein erfindungsgemäßes Lichtblattmikroskop auch mit mehr als zwei
35 derartigen Aufrichtungseinheiten 26 und 27 denkbar, die hier gemäß Fig. 1 die

- Elemente 5, 24 und 10 bzw. 6, 25 und 11 aufweisen. Mit drei Einheiten könnten diese dann so angeordnet sein, dass die optischen Achsen jeweils in Winkeln von 120° zueinander stehen, wobei jeweilige Fokusebenen parallel zu den Oberflächen eines Tetraeders liegen können, siehe hierzu Fig. 1a. In diesem Fall könnte ein
- 5 Galvanometer oder Galvanometerspiegel als vorzugsweise kardanischer 2-Achsen-Galvanometer ausgeführt sein, um die in verschiedene Richtungen orientierten Objektive bedienen zu können. Eine weitere Alternative besteht in vier paarweise gegenüberliegenden Objektiven. Deren Vorteil besteht darin, dass jeweils zwei gegenüberliegende Richtungen gleichzeitig bedient werden können. Durch mehr als
- 10 zwei gegenüberliegende Objektive lässt sich die Auflösung des Systems allerdings nur geringfügig steigern, da der Hauptvorteil der Fusion oder Zusammenführung von Aufnahmen aus mehreren Richtungen darin besteht, zwei vorzugsweise senkrecht zueinander orientierte Bilderstapel zu verrechnen, so dass jeweils anstelle der – schlechteren – axialen Auflösung in einem Bilderstapel die – bessere – laterale
- 15 Auflösung des anderen Bilderstapels verwendet werden kann. Der Hauptvorteil der Beleuchtung und der Detektion aus mehr als zwei Richtungen besteht in der Möglichkeit der Reduzierung von Abschattungseffekten, die durch streuende und/oder absorbierende Teile in der Probe entstehen können.
- 20 Ein Verfahren zur Aufnahme von Bildern kann derart ausgestaltet sein, dass ein erster Beleuchtungsstrahl 3 zu einem ersten Zeitpunkt zur Beleuchtung der Probe genutzt wird und ein Sensor 5 ein entsprechendes Bild auffängt/aufnimmt. Danach wird ein zweiter Beleuchtungsstrahlengang mit einem zweiten Beleuchtungsstrahl 4 aktiviert, wobei mit einem zweiten Sensor 6 ein Bild aus annähernd orthogonaler Richtung zu
- 25 einem zweiten Zeitpunkt aufgenommen wird.
- Derartige Bilder können auch zeitgleich oder im selben Zeitraum aufgenommen werden, wenn in der Probe unterschiedliche Farbstoffe mit Licht aus Beleuchtungsstrahlen 3 und 4 mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Dabei ist es
- 30 vorteilhaft, wenn die Emissionsspektren der Farbstoffe oder Fluorophore möglichst wenig gegenseitig und mit den Anregungswellenlängen der Beleuchtungsstrahlen 3 und 4 überlappen. In weiter vorteilhafter Weise können vor den Sensoren 5 und 6 Emissionsfilter, Bandpassfilter oder Filter positioniert werden, die jeweils Bereiche aus den Bereichen der Spektren der Fluorophore oder Farbstoffe ausschneiden, in

denen weder das jeweils andere Fluorophor Licht abstrahlt noch das zu dessen Anregung verwendete Licht liegt. In diesen Fällen kann man zeitlich aus zwei Richtungen messen.

5 Zur Aufnahme von 3D-Volumina bestehen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten. Für die Abbildung eines Farbstoffs können Bilder von parallel zueinander liegenden Ebenen aus einer Richtung nacheinander durch Verkippen des Galvanometers 7 aufgenommen werden. Anschließend wird die Beleuchtung umgeschaltet und mit dem zweiten Sensor 6 ein Bilderstapel aus der anderen Richtung aufgenommen. Dies
10 kann entweder auf dem „Rückweg“ des Galvanometers passieren, wobei ein Zick-Zack-Steuersignal an den Galvanometer gesendet wird, oder in der gleichen Richtung, wobei ein Sägezahn-Signal an den Galvanometer gesendet wird. Für das Zurückfahren an den Startpunkt kann eine Pause – wenige Millisekunden – in der Bildaufnahme vorgesehen sein. Alternativ kann auch die Beleuchtung so schnell
15 geschaltet werden, dass für jede Winkelposition des Galvanometers 7 aus zwei Richtungen Bilder der Probe aufgenommen werden. Die Bewegung des Galvanometers 7 kann dabei schrittweise erfolgen, in vorteilhafter Weise jedoch kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit, die ein Verwaschen des Bilds durch die Relativbewegung von abgebildeter Ebene gegenüber der Probe während der Belichtungszeit
20 vermeidet, d. h. die Bewegung beträgt deutlich weniger als die effektive Schärfentiefe der Detektion. Ob der erste oder der zweite Modus bevorzugt wird, liegt im Wesentlichen daran, wie schnell die Schaltung beziehungsweise die Umschaltung der Beleuchtung vorgenommen werden kann. Werden schnelle und verschleißfreie Schalter verwendet, kann der zweite Modus in vorteilhafter Weise verwendet werden.
25 Ansonsten stellt der erste Modus eine einfache Alternative dar.

Gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Fig. 1 werden die Beleuchtungsstrahlen 3 und 4 über einen Dichroiten 8 zwischen dem Galvanometer 7 und dem zweiten Objektiv 9 eingekoppelt. Im Gegensatz zur Realisierung und Darstellung gemäß dem
30 Ausführungsbeispiel in Fig. 1 ist es jedoch besonders vorteilhaft, die Beleuchtungsstrahlen 3 und 4 über den Dichroiten 8 in den Strahlengang zu reflektieren und nicht zu transmittieren. In entsprechender Weise würde dann das Bild oder Detektionslicht transmittiert und nicht – wie in Fig. 1 dargestellt – reflektiert.

Zur Schaltung der Beleuchtung kann ein weiterer Aktuator notwendig sein, der den notwendigen parallelen Strahlenversatz der Beleuchtungsstrahlen 3 und 4 erzeugen kann. Dabei ist es lediglich erforderlich, dass ein Beleuchtungsstrahl vorzugsweise abwechselnd an zwei Positionen bereitgestellt werden kann. Daher erscheint eine Ausführung mit einem kontinuierlich arbeitenden Bauteil wie beispielsweise einem Galvanometer oder einer Wackelplatte nicht unbedingt erforderlich, würde aber eine flexible Justage der Position, insbesondere Verkipfung, des Lichtblatts in Abhängigkeit des Brechungsindex der Probe direkt mitberücksichtigen können.

Gemäß Fig. 2 ist an der oberen Position a) ein weiteres Ausführungsbeispiel einer Einrichtung zum Bereitstellen zweier Beleuchtungsstrahlen 3, 4 an zwei unterschiedlichen Positionen gezeigt. Dabei können ein oder mehrere planparallele Glasblöcke 34 in den Strahlengang 33 der Lichtquelle eingebracht werden, die den Strahl jeweils in den einen oder anderen Strahlengang umlenken um die zwei Beleuchtungsstrahlen 3, 4 zu erzeugen. Lediglich durch Drehen eines Glasblockes 34 kann der Umschaltvorgang realisiert werden.

Alternativ hierzu zeigt Fig. 2 bei b) eine Kombination aus einem schnellen polarisationsdrehenden Element 35 wie beispielsweise einem EOM (Elektrooptischer Modulator) und einem polarisationsabhängigen Strahlteiler 36 in dem Strahlengang 33 der Lichtquelle. Je nach Polarisation des Lichtstrahls erfolgt eine Reflexion durch den polarisationsabhängigen Strahlteiler an der einen oder an der anderen Position. Um die so erzeugten zwei Beleuchtungsstrahlen 3, 4 zur besseren weiteren Verwendung parallel auszurichten, kann optional beispielsweise ein nachgeschalteter Spiegel 37 benutzt werden.

Alternativ hierzu könnten zwei Lichtleitfasern an geeigneter Position angeordnet werden, wobei das Licht zwischen den Fasern mit einem schnellen Schalter umgeschaltet werden kann.

Alternativ hierzu – beispielsweise wenn kein Strahlteiler zwischen dem zweiten Objektiv 9 und dem Galvanometer 7 eingebracht werden kann oder soll – können auch Dichroite in den Aufrichtungseinheiten 26 und 27 verwendet werden.

Die Fig. 3a, b und c zeigen weitere Ausführungsbeispiele eines Strahlengangs in einem Lichtblattmikroskop, wobei zwei unterschiedliche Detektionsstrahlengänge vereinigt werden, um sie auf einem einzigen Sensor 5 abbilden zu können. Für Elemente der Figuren, die mit derselben Bezugsziffer wie entsprechende Elemente in Fig. 1 bezeichnet sind, sei auf die Figurenbeschreibung zu Fig. 1 verwiesen. Die Tubuslinse 43 kann dabei auch doppelt ausgeführt jeweils in den beiden Strahlengängen angeordnet sein. Anstatt der hier gezeigten Spiegel 40, 41, 42 können beispielsweise auch dichroitische Würfel mit Langpass- oder Kurzpassfiltern verwendet werden, wenn gleichzeitig mit zwei Farben detektiert wird.

Zur wechselnden Führung der Detektionsstrahlengänge auf den Sensor 5 werden im Ausführungsbeispiel in Fig. 3a unter anderem ein Kippspiegel 39 und weitere Spiegel 40, 41 sowie eine Tubuslinse 43 verwendet. Der Kippspiegel kann zwei Ausrichtungen (Spiegelstellungen) einnehmen, die dadurch definiert sind, dass bei der ersten Spiegelstellung (zu einem Zeitpunkt 1) das erste Detektionslicht 21 über einen ersten Detektionsstrahlengang und im Fall der zweiten Spiegelstellung (zu einem Zeitpunkt 2) das zweite Detektionslicht 22 über einen zweiten Detektionsstrahlengang zum Sensor 5 gelangt. Die Zeitpunkte müssen so gewählt sein, dass sie mit den Zeitpunkten der Beleuchtung mittels der Beleuchtungsstrahlen 3, 4 geeignet korrespondieren, also so festgelegt sind, dass Detektionslicht erzeugt durch den Beleuchtungsstrahl 3 bei einer der beiden Spiegelstellungen des Kippspiegels 39 zum Sensor 5 gelangt und Detektionslicht erzeugt durch den Beleuchtungsstrahl 4 bei der anderen Spiegelstellung.

Im in Fig. 3b gezeigten Ausführungsbeispiel hingegen wird vereinfachend ein fixes Spiegelsystem (ausgebildet durch die Spiegel 40, 41, 42) benutzt. Dieses hat im Vergleich zum Ausführungsbeispiel aus Fig. 3a den Nachteil, dass es hier potentiell zu störenden Artefakten bei der Detektion bzw. zu einer geringeren Bildqualität kommen kann, unter anderem wegen der nichtidealen Abbildung, da immer beide Detektionsstrahlengänge offen sind.

Die Abbildung (über die Spiegel 39, 40, 41, 42 und die Linse 43) erfolgt im Fall der in Fig. 3a und 3b gezeigten Ausführungsbeispiele zu zwei Detektionszeitpunkten, beispielsweise abwechselnd, auf den gleichen Bereich des Sensors 5. Die Strahlengänge für die beiden Ansichten können aber auch so ausgeführt sein, dass

die Bilder nebeneinander versetzt auf dem Sensor 5 liegen. Ein entsprechendes Ausführungsbeispiel ist in Fig. 3c gezeigt.

Die Darstellung des Detektionsstrahlengangs zwischen probenseitigem Objektiv 1 und Objektiv 9 ist in den Figuren 3a, 3b, 3c vereinfacht ohne Galvanometer 7 und Linse 31 dargestellt. Die Scan-Aktorik (Galvanometer-Spiegel) und/oder eine beliebige Zahl telezentrischer optischer Abbildungssysteme kann an der gekennzeichneten Stelle 45 eingefügt werden. Zur Abbildung von Volumina kann ein optisches System wie in Figur 1 gezeigt verwendet werden oder das Objektiv 9 kann mechanisch entlang seiner optischen Achse verschiebbar montiert sein.

Fig. 4 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel eines Strahlengangs in einem Lichtblattnikroskop, wobei diese Ausführung auf die Vermeidung einer sterischen Kollision bei einer Realisierung mit dritten Objektiven 10, 11 mit hoher numerischer Apertur ausgerichtet ist. Die Darstellung ist analog zu den Figuren 3a, 3b, 3c vereinfacht ohne Galvanometer realisiert. Ähnlich wie in Fig. 3a wird hier ein schaltbarer Spiegel verwendet, allerdings wird dieser dazu benutzt, den Detektionspfad schon vor einem das Luftbild erzeugenden Objektiv (Objektiv 9 in den anderen Ausführungsbeispielen) aufzuspalten. Die Spiegel 50, 51 dienen bei diesem Ausführungsbeispiel nur der Kompaktheit des Aufbaus. Die Objektive 52 und 53 übernehmen die Funktion des Objektives 9 aus den vorherigen Ausführungsbeispielen. Wie auch in den vorherigen Beispielen kann die Scan-Aktorik (Galvanometer-Spiegel) und/oder eine beliebige Zahl telezentrischer optischer Abbildungssysteme beispielsweise an der gekennzeichneten Stelle 45 eingefügt werden. Auch in diesem Ausführungsbeispiel entsprechen Elemente, die mit denselben Bezugsziffern wie in Fig. 1 bezeichnet sind, den in Fig. 1 gezeigten Elementen.

Fig. 5 zeigt in einer schematischen Darstellung eine Scanbewegung, bei der unterschiedliche Farbstoffe 1 und 2 mit unterschiedlichen Wellenlängen zur Emission von Detektionslicht mit ebenfalls unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Dabei werden zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten jeweils immer beide Beleuchtungsstrahlen 3, 4 gleichzeitig zur Probe geleitet, wodurch die in der Probe enthaltenen unterschiedlichen Farbstoffe 1 und 2 zum selben Zeitpunkt zur Emission von Detektionslicht 21, 22 angeregt werden. Ein derart (beispielsweise mit einem

Aufbau, wie er in Fig. 1 gezeigt ist) erzeugtes und aufgefangenes Detektionslicht 21, 22 von beiden Farbstoffen kann nach und nach von Zeitpunkt 1 bis Zeitpunkt n zu einem Bilderstapel verarbeitet werden, wie dies im unteren Teil der Fig. 5 gezeigt ist. Auch hier entsprechen Elemente der Figur, die mit denselben Bezugsziffern wie in Fig. 1 bezeichnet sind, den in Fig. 1 gezeigten Elementen.

Die Fig. 6 bis 8 zeigen die Strahlgänge, Beleuchtungswinkel und Aperturen für Beleuchtungsobjektive mit einer numerischen Apertur $NA_W = 1,2$ (Fig. 6), $1,1$ (Fig. 7) und $1,0$ (Fig. 8) in Wasser (Brechungsindex $n = 1,33$), wobei jeweils zwei beispielhafte Varianten für den Strahlverlauf, einmal bei Detektion senkrecht zum Lichtblatt, und einmal bei nichtsenkrechter Detektion, eingezeichnet sind. In den Zeichnungen sind die für die folgenden Betrachtungen relevanten Winkel eingetragen, wobei sich Variablennamen, die das Zeichen „ α “ beinhalten, auf halbe Öffnungswinkel beziehen, während Variablennamen mit dem Zeichen „ β “ Winkel zur optischen Achse 2 kennzeichnen. Bei den Indizes werden mit „S“ Winkel gekennzeichnet, die sich auf senkrechte Detektion beziehen, und mit „D“ Winkel, die bei nichtsenkrechter Detektion auftreten.

Typischerweise wird das durch den Beleuchtungsstrahl 3 generierte Lichtblatt gegen die optische Achse 2 um einen Winkel β_{LS} verkippt. Der Winkel α_{LS} entspricht dem halben Öffnungswinkel des Beleuchtungsstrahls 3 bei einer numerischen Apertur $NA = n \sin(\alpha_{LS})$. Wie oben geschrieben, werden jeweils zwei Strahlgänge 60, 61 für die senkrechte und 62, 63 und die nichtsenkrechte Detektion eingezeichnet, wobei die Hauptstrahlen 61 und 63 gestrichelt gezeichnet sind und jeweils ein Randstrahl 60, 62 eingezeichnet ist. Mit 60, 61 ist ein Strahlengang gezeigt, der eine Detektion senkrecht zur Beleuchtung garantiert und bei dem die Randstrahlen 60 symmetrisch um den Hauptstrahl 61 angeordnet verlaufen. Der Hauptstrahl 61 ist dann um den Winkel $\beta_S = 90^\circ - \beta_{LS}$ gegen die optische Achse verkippt. Die symmetrische (sagittale) Apertur für den senkrechten Fall ergibt sich dann aus $NA_s = n \sin(\alpha_s)$ mit $\alpha_s = \alpha_{Obj} - \beta_S$, wobei α_{Obj} der halbe Öffnungswinkel des probenseitigen Objektives ist.

Tabelle 1:

Symmetrische Pupille	$NA_w = 1,2$	$NA_w = 1,1$	$NA_w = 1,0$
α_{obj}	$64,4^\circ$	$55,8^\circ$	$48,8^\circ$
β_{LS}	$60,1^\circ$	$51,5^\circ$	$44,4^\circ$
β_s	$29,9^\circ$	$38,5^\circ$	$45,6^\circ$
α_s	$34,5^\circ$	$17,3^\circ$	$3,2^\circ$
NA_s	0,75	0,4	0,07

Wie in Fig. 6 zu sehen ist kann bei einer hohen Apertur des Objektivs von $NA_w = 1,2$ mit hoher numerischer Apertur von bis zu $NA_{d,max} = 0,75$ detektiert werden. Allerdings kann in diesem Fall keine zwei Objektive 10, 11 auf der gegenüberliegenden Seite angebracht werden, da die beiden Objektive kollidieren würden. In Fig. 7 und 8, also bei Objektiven mit $NA_w = 1,1$ und $NA_w = 1,0$ bestehen keine Kollisionsprobleme, allerdings wird durch die symmetrische Nutzung des Objektivs und die senkrechte Ausrichtung auf dem Lichtblatt mögliche Apertur verschenkt. In Fig. 8 sieht man, dass eine praxisferne Detektionsapertur von 0,07 bleibt.

Daher ist in ein alternativer Strahlengang 62, 63 gezeigt, der einerseits die Detektionsapertur maximal nutzt und andererseits noch zusätzlich 5° Raumwinkel zur optischen Achse freihält, um zwei Objektive montieren zu können (also zur Vermeidung der weiter oben diskutierten sterischen Kollision). Daraus folgt $\beta_D = \alpha_D - 5^\circ$. Die Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die zur Vermeidung von Kollisionen der beiden zur Detektion der Luftbilder genutzten dritten und vierten Objektive 10, 11 maximal vorhaltbare numerische Apertur kann für $NA_w = 1,0$ und $NA_w = 1,1$ größer sein, als es zur Übertragung optischer Information notwendig wäre. In anderen Worten, die vom probenseitigen Objektiv 1 zur Detektion genutzte Teilapertur kann kleiner sein als die von den Objektiven 10, 11, ohne dass es zur Kollision/Überschneidung der Objektive kommt. Zu beachten ist in diesem Fall, dass es durch die asymmetrische Nutzung der Pupille zu einer asymmetrischen numerischen Apertur bzw. Nutzung der Apertur kommt und daher auch die Auflösung asymmetrisch ist. Die dritten und vierten Objektive 10, 11 sind um den Winkel $\gamma = \beta_D + \beta_{LS}$ gegen die vom Lichtblatt beleuchtete Ebene verkippt. Während das dritte bzw. vierte Objektiv 10, 11 den Raumwinkel $2\alpha_3$ bereit hält (in den Figuren entspricht dies dem Winkel zwischen dem Randstrahl 62 und der gestrichelten Linie 65), wird effektiv der Winkelbereich $2\alpha_D$

genutzt. Hierbei ist der halbe Öffnungswinkel α_3 dieser Objektive gegeben durch den Verkippwinkel zwischen der optischen Achse 2 und dem Hauptstrahl 61 abzüglich des oben erwähnten Winkels zur Vermeidung der sterischen Kollision, also in diesem Beispiel 5°. Während für eine NA vom probenseitigen Objektiv 1 von 1,2 also das dritte und vierte Objektiv 10, 11 die effektive Detektionsapertur einschränken, ist diese für kleinere Werte der Apertur vom probenseitigen Objektiv 1 von 1,1 oder 1,0 nicht der Fall.

Tabelle 2:

Asymmetrische Pupille	NA _w =1,2	NA _w =1,1	NA _w =1,0
α_{Obj}	64,4°	55,8°	48,8°
β_{LS}	60,1°	51,5°	44,4°
β_{D}	35°	30°	27°
α_{D}	30°	25°	22°
NA _D	0,65	0,56	0,50

Gemäß Fig. 6 sichert der Strahlverlauf 60, 61 die Detektion senkrecht zur Anregung. Der alternative Strahlverlauf 62, 63 ist dualview-kompatibel, d.h. es können zwei Objektive mit einem halben Öffnungswinkel α_{D} um β_{D} verkippt gegen die optische Achse genutzt werden, um gegeneinander verkippte Luftbilder abzugreifen.

Hinsichtlich weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Lichtblattmikroskops und des erfindungsgemäßen mikroskopischen Verfahrens mit einem Lichtblattmikroskop wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf den allgemeinen Teil der Beschreibung sowie auf die beigefügten Ansprüche verwiesen.

Schließlich sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die voranstehend beschriebenen Ausführungsbeispiele lediglich zur Erörterung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

Ansprüche

1. Lichtblattmikroskop mit einem probenseitigen Objektiv (1), mit einer Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung eines ersten Beleuchtungsstrahls (3), der zur
5 Bildung eines schräg zu einer optischen Achse (2) des Objektivs (1) geneigten und durch das Objektiv (1) geführten ersten Lichtblatts zur Beleuchtung einer Probe aus einer ersten Richtung fokussiert ist, und mit einer Detektionseinrichtung für durch das Objektiv (1) gelangendes Detektionslicht,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die Beleuchtungseinrichtung des Weiteren zur Bereitstellung mindestens eines zweiten Beleuchtungsstrahls (4) ausgebildet ist, der zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse (2) des Objektivs (1) geneigten und durch das Objektiv (1) geführten mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden
15 mindestens einen zweiten Richtung fokussiert ist.
2. Lichtblattmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Richtung und die zweite Richtung mindestens zweier Beleuchtungsstrahlen (3, 4) senkrecht zueinander oder ungefähr senkrecht zueinander stehen oder die Beleuchtungsstrahlen (3, 4) in den Randbereich der Pupille oder der hinteren Brennebene des probenseitigen Objektivs (1) gelenkt sind.
20
3. Lichtblattmikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung einen ersten Sensor (5) für durch den ersten Beleuchtungsstrahl (3) verursachtes und entlang einem ersten Detektionsstrahlengang im Objektiv (1) verlaufendes erstes Detektionslicht und mindestens einen zweiten Sensor (6) für durch den mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahl (4) verursachtes und entlang mindestens einem zweiten Detektionsstrahlengang im Objektiv (1) verlaufendes mindestens zweites Detektionslicht aufweist.
25
30
4. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinrichtung zur gleichzeitigen Bereitstellung des ersten Beleuchtungsstrahls (3) und des mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahls (4) oder zur Bereitstellung des ersten Beleuchtungsstrahls (3) und des

mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahls (4) zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vorzugsweise alternierend oder in einer vorgebbaren Abfolge, ausgebildet ist.

5. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung oder die Sensoren (5, 6) der Detektionseinrichtung zur gleichzeitigen Detektion des ersten Detektionslichts und des mindestens einen zweiten Detektionslichts oder zur Detektion des ersten Detektionslichts und des mindestens einen zweiten Detektionslichts zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vorzugsweise alternierend oder in einer vorgebbaren Abfolge, ausgebildet ist oder sind.

6. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass im Strahlengang vor der Detektionseinrichtung oder vor mindestens einem Sensor (5, 6) ein Emissionsfilter, Bandpassfilter oder Filter für das erste und/oder das mindestens eine zweite Detektionslicht angeordnet ist.

7. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinrichtung einen Dichroiten (8), ein Galvanometer, planparallele Glasblöcke, Lichtleitfasern oder ein polarisationsdrehendes Element mit einem polarisationsabhängigen Strahlteiler zur Einkopplung der Beleuchtungsstrahlen (3, 4) in einen Beleuchtungsstrahlengang aufweist.

8. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektionseinrichtung Mittel zum Zusammenführen von durch den ersten Beleuchtungsstrahl (3) verursachtem und entlang einem ersten Detektionsstrahlengang im Objektiv (1) verlaufendem ersten Detektionslicht und von durch den mindestens einen zweiten Beleuchtungsstrahl (4) verursachtem und entlang mindestens einem zweiten Detektionsstrahlengang im Objektiv (1) verlaufendem mindestens zweitem Detektionslicht auf einen Sensor (5) aufweist.

9. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungseinrichtung Mittel zur Verschiebung des ersten Lichtblatts und/oder des mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Erzeugung

von Bilderstapeln aus vorzugsweise parallel zueinander liegenden Bildebenen aufweist und dass der Detektionseinrichtung eine Auswerteeinrichtung zur Verarbeitung der Bilderstapel zugeordnet ist.

- 5 10. Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Beleuchtungsstrahl (3) und der mindestens eine zweite Beleuchtungsstrahl (4) durch ein einziges gemeinsames optisches Element entlang einer zur optischen Achse (2) des Objektivs (1) senkrechten Richtung durch die Probe scanbar sind, wobei vorzugsweise dieses optische Element zum Entscannen von über dieses optische Element zurückgeführtem Detektionslicht einsetzbar ist.
- 10 11. Mikroskopisches Verfahren mit einem Lichtblattmikroskop, insbesondere mit einem Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei ein erster Beleuchtungsstrahl (3) mittels einer Beleuchtungseinrichtung bereitgestellt wird, der zur Bildung eines schräg zu einer optischen Achse (2) eines probenseitigen Objektivs (1) geneigten und durch das Objektiv (1) geführten ersten Lichtblatts zur Beleuchtung einer Probe aus einer ersten Richtung fokussiert wird, und wobei durch das Objektiv (1) gelangendes Detektionslicht mit einer Detektionseinrichtung detektiert wird,
- 15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass des Weiteren mindestens ein zweiter Beleuchtungsstrahl (4) mittels der Beleuchtungseinrichtung bereitgestellt wird, der zur Bildung eines schräg zu der optischen Achse (2) des Objektivs (1) geneigten und durch das Objektiv (1) geführten mindestens einen zweiten Lichtblatts zur Beleuchtung der Probe aus einer sich von der ersten Richtung unterscheidenden mindestens einen zweiten Richtung fokussiert wird.
- 20 25 12. Mikroskopisches Verfahren mit einem Lichtblattmikroskop, insbesondere mit einem Lichtblattmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, gekennzeichnet durch die Schritte:
- 30 – Aufnehmen von Bildern einer Probe, wobei der Winkel zwischen den Bildebenen und der optischen Achse idealerweise gleich ist und der Winkel zwischen den Bildebenen idealerweise 90° beträgt,
- Erzeugen von Bilderstapeln von Bildern idealerweise parallel zueinander liegender Ebenen und
- 35 – Fusion der Bilderstapel beispielsweise durch eine Multiview-Entfaltung.

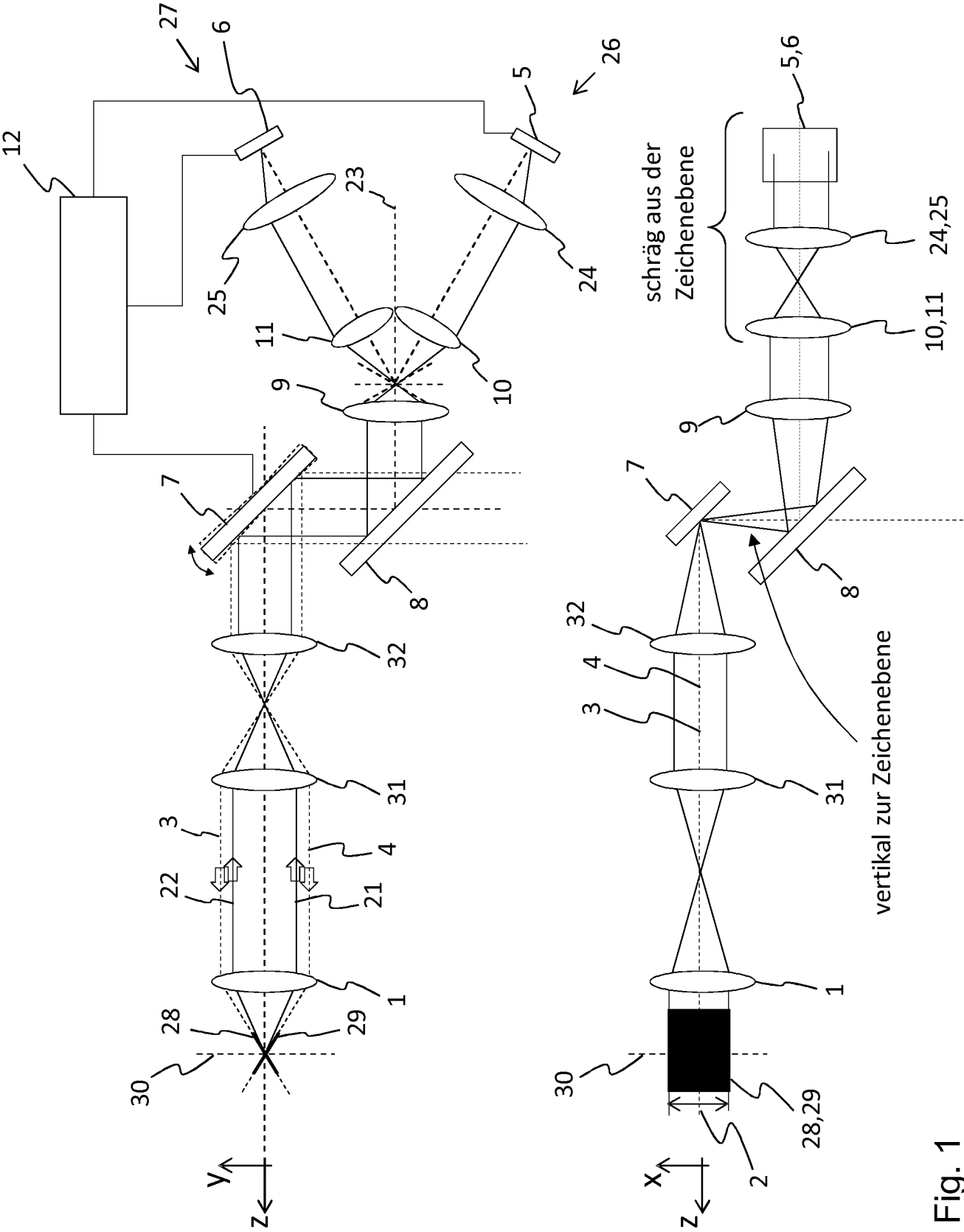


Fig. 1

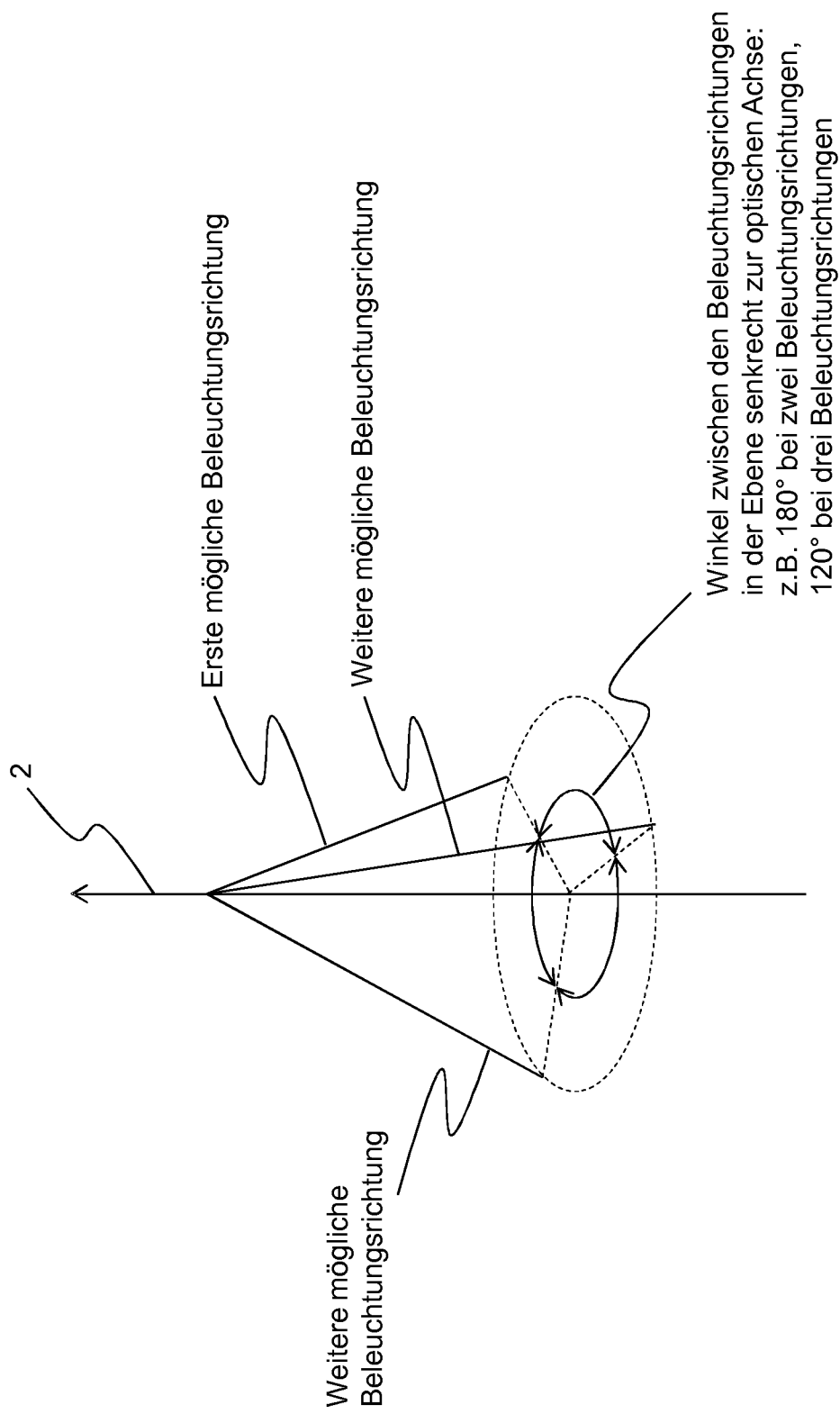


Fig. 1a

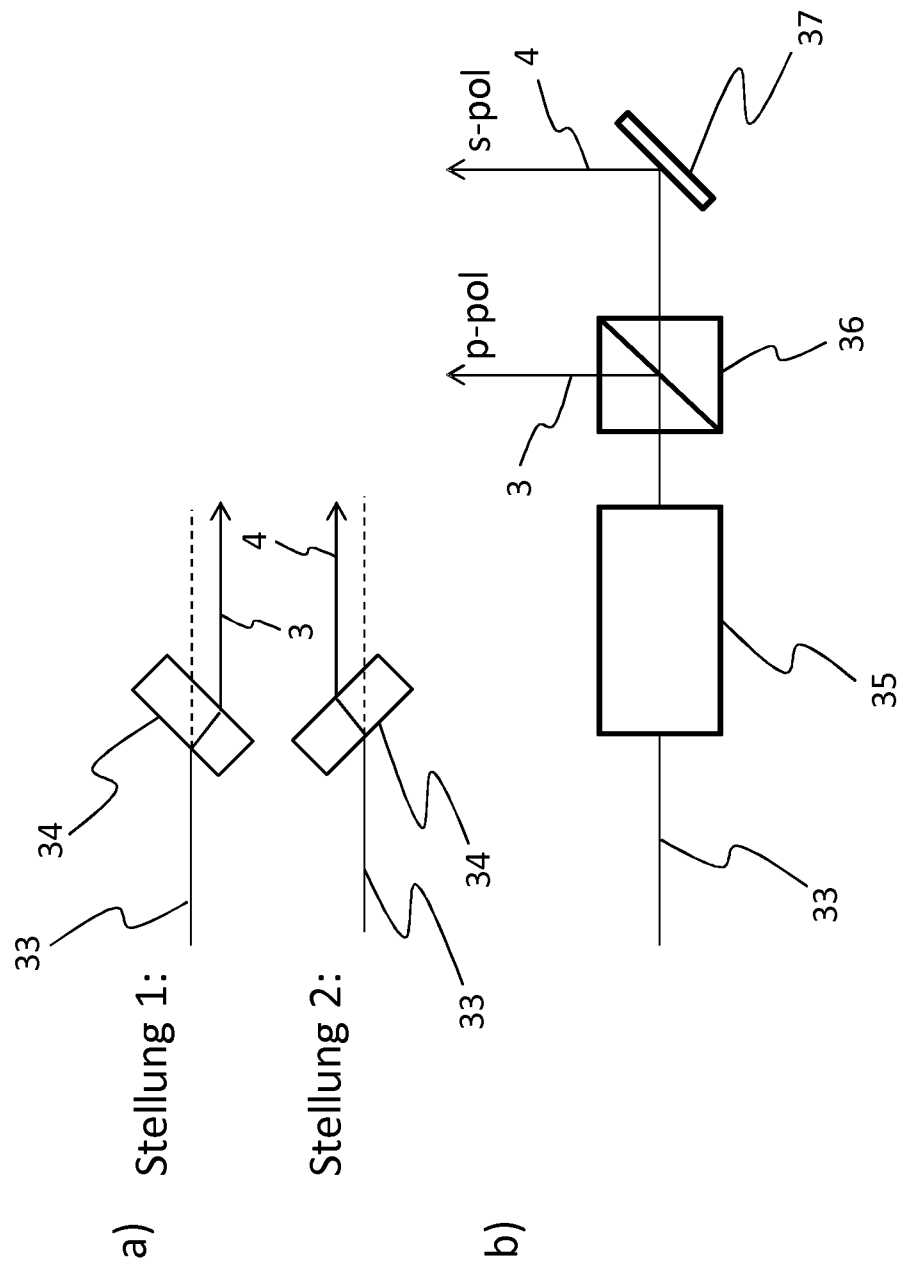


Fig. 2

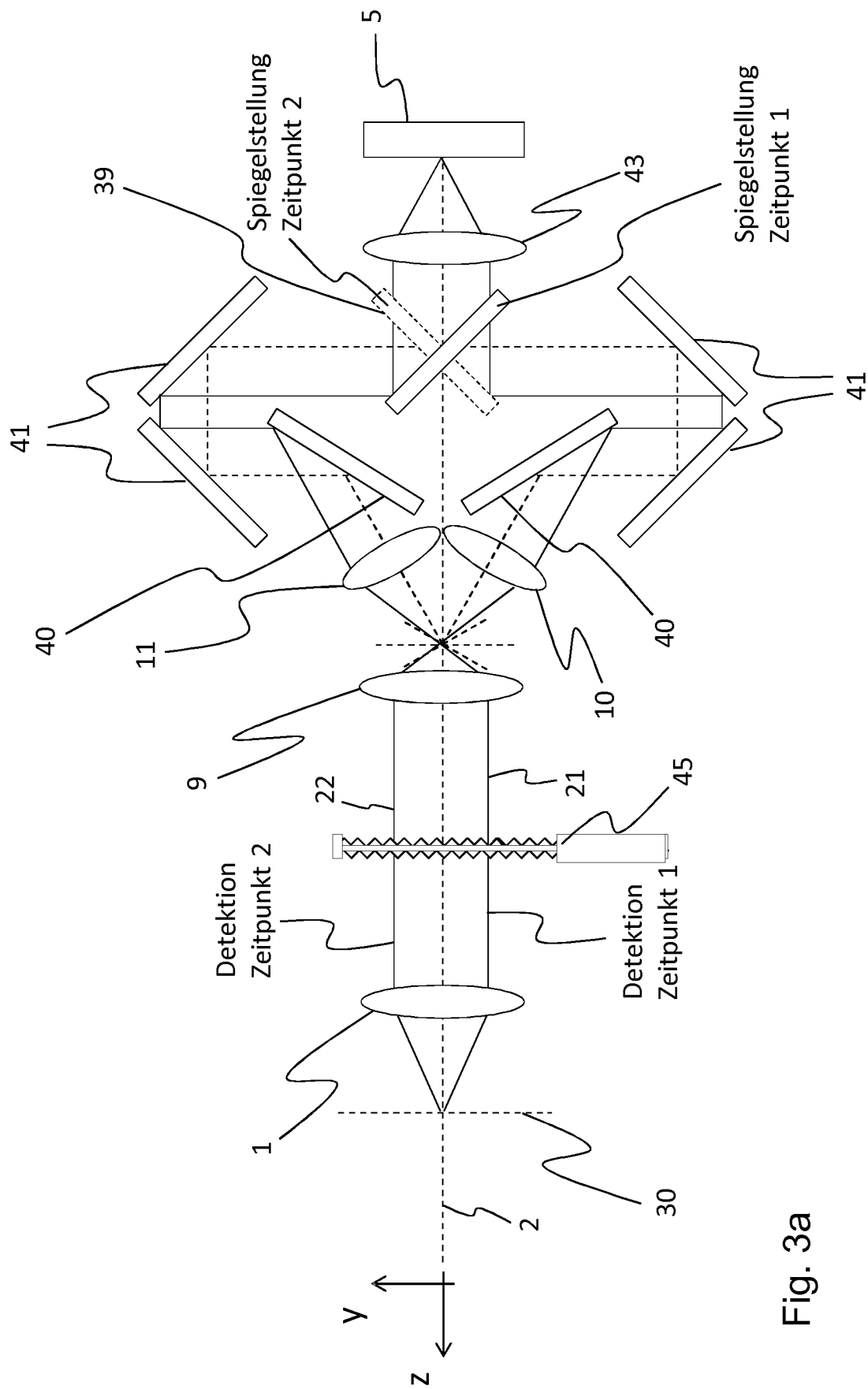


Fig. 3a

Die Abbildung
der beiden Ansichten
erfolgt auf den gleichen
Bereich des Sensors 5
(bspw. abwechselnd)

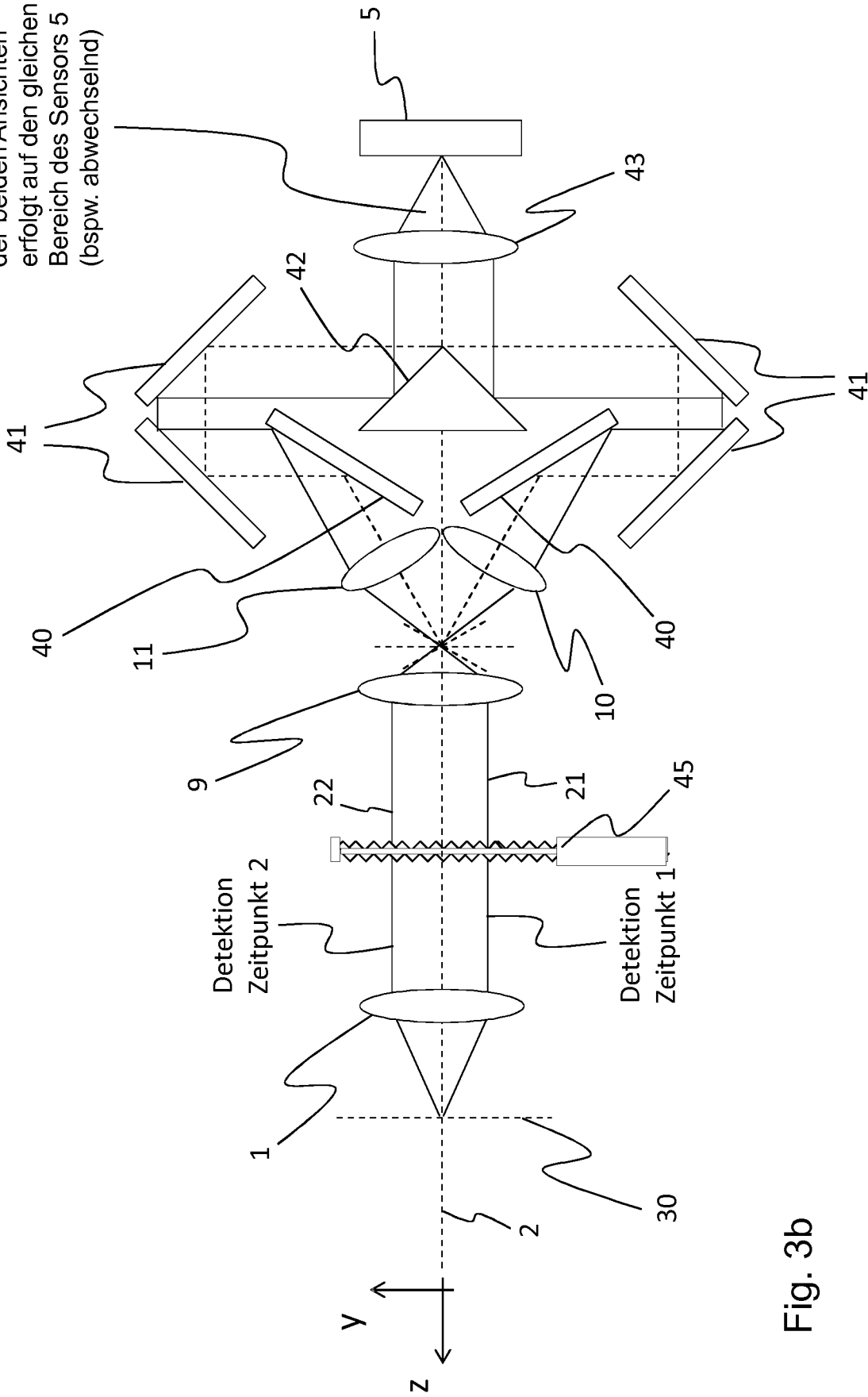


Fig. 3b

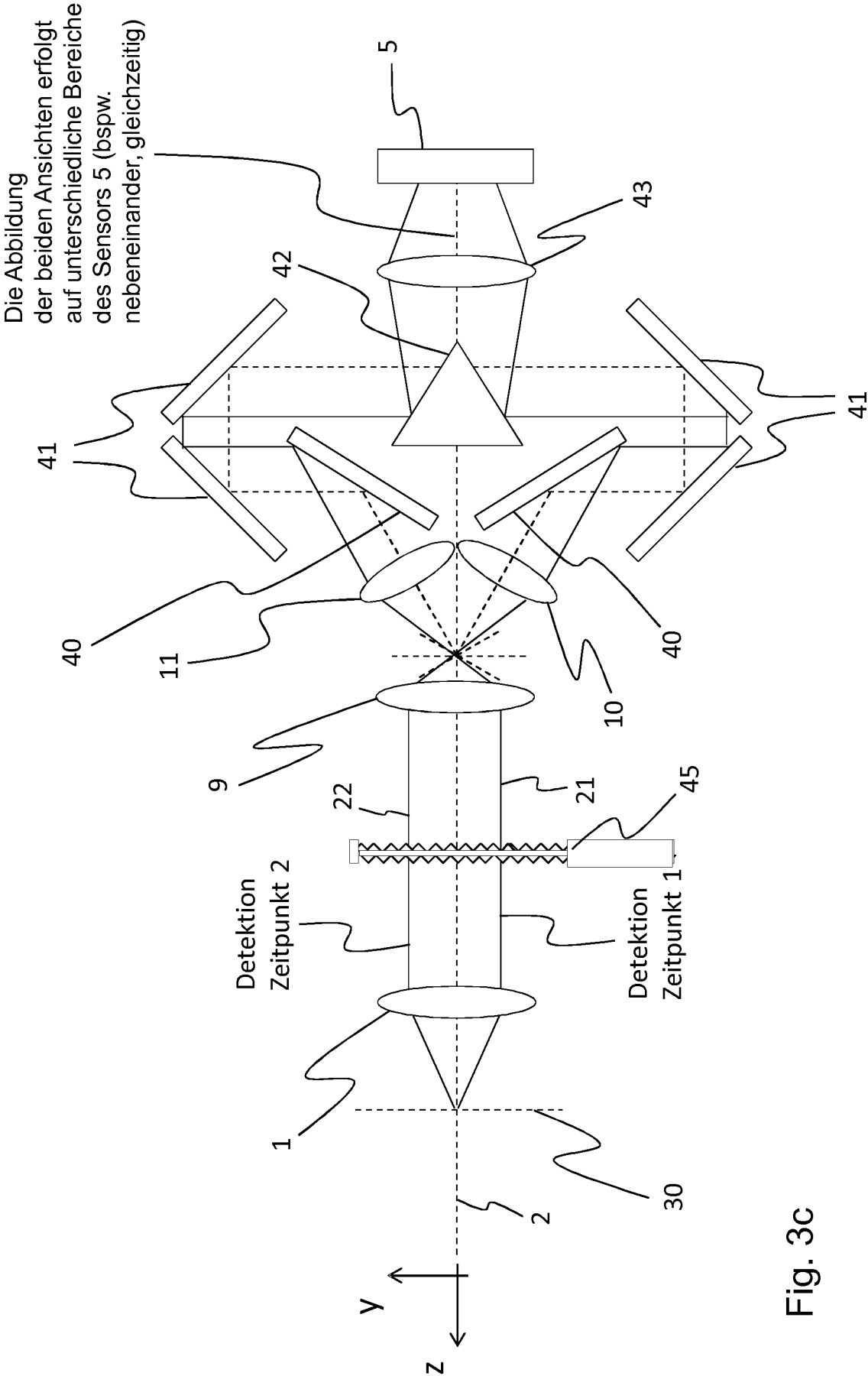


Fig. 3c

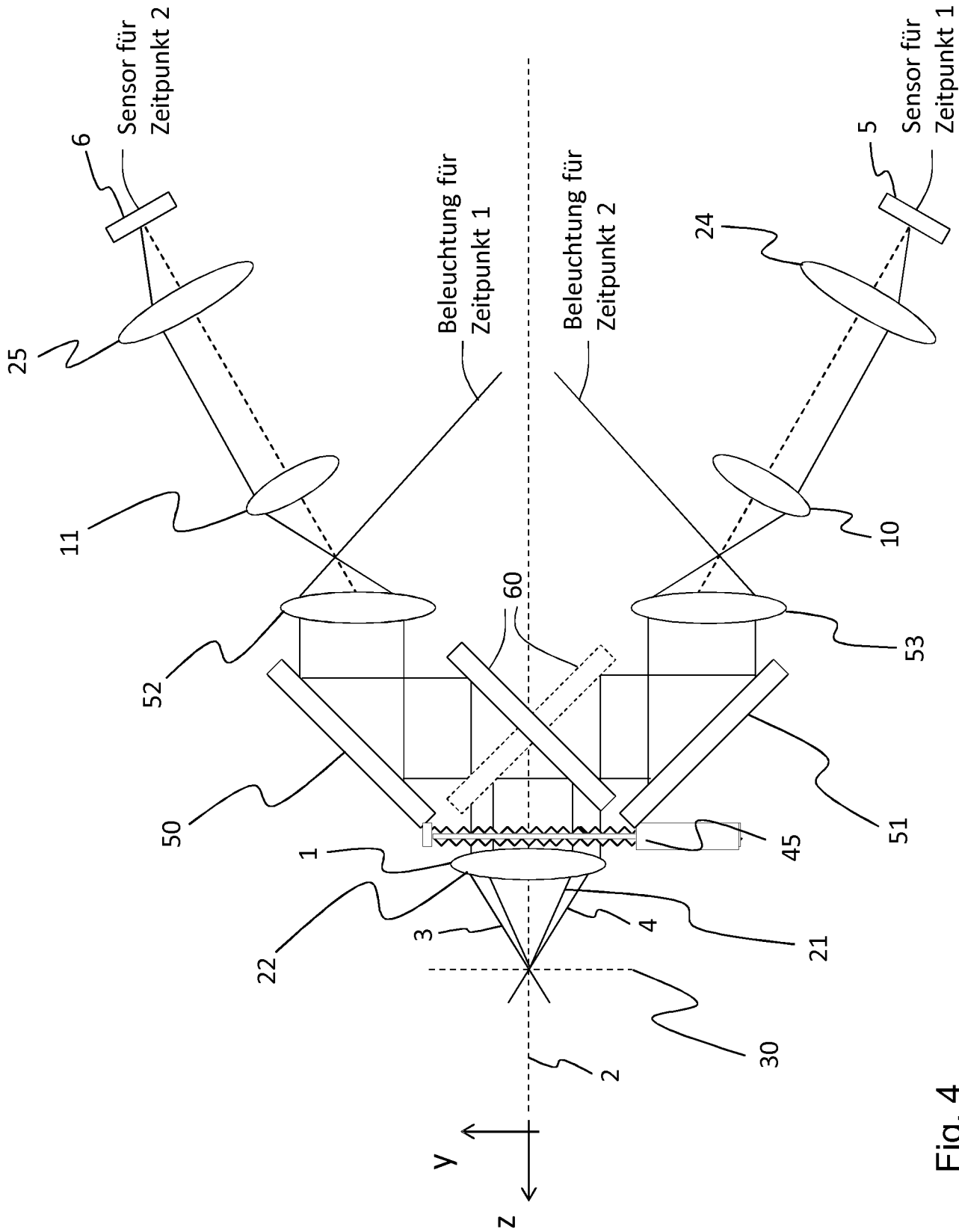


Fig. 4

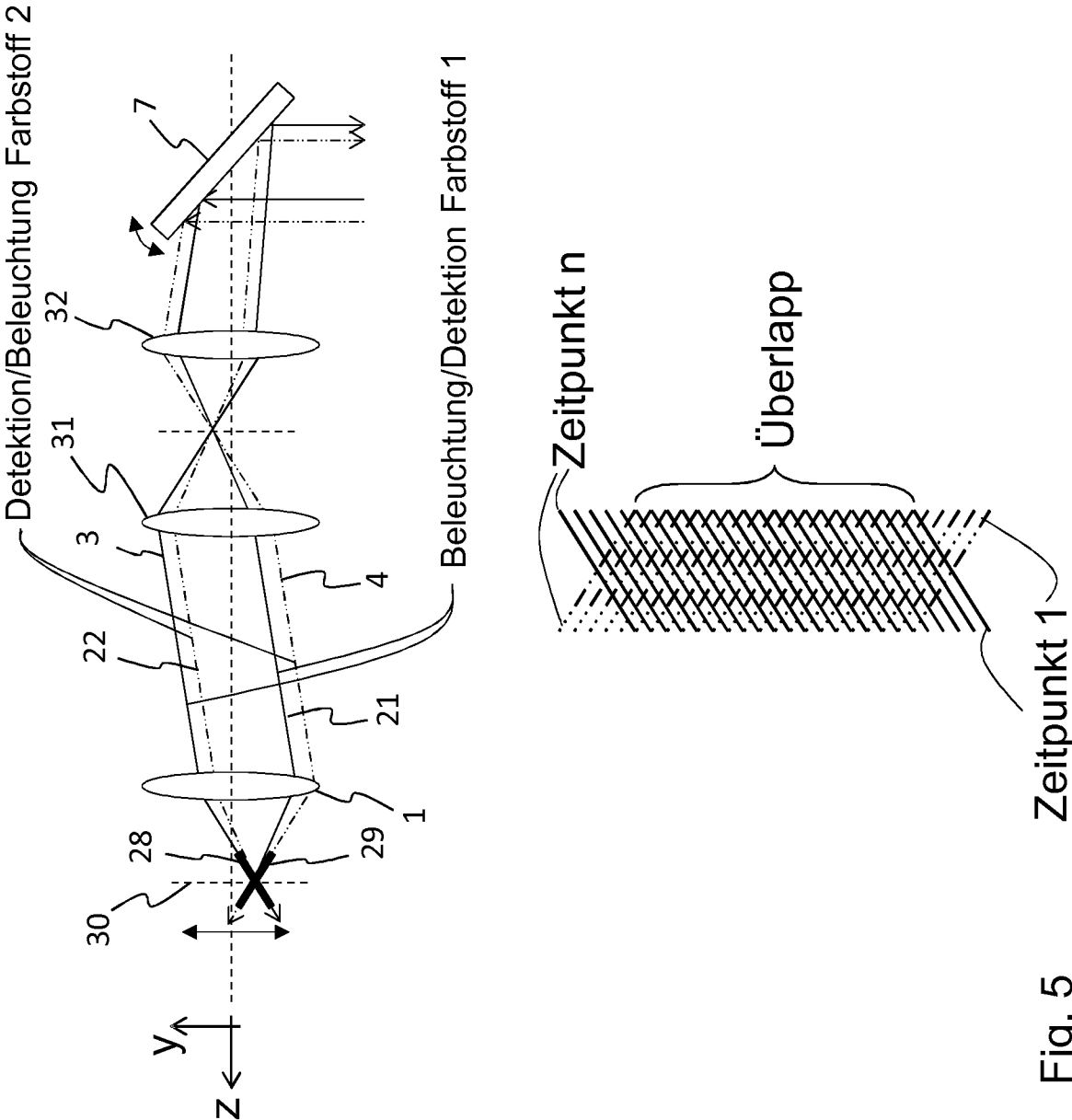


Fig. 5

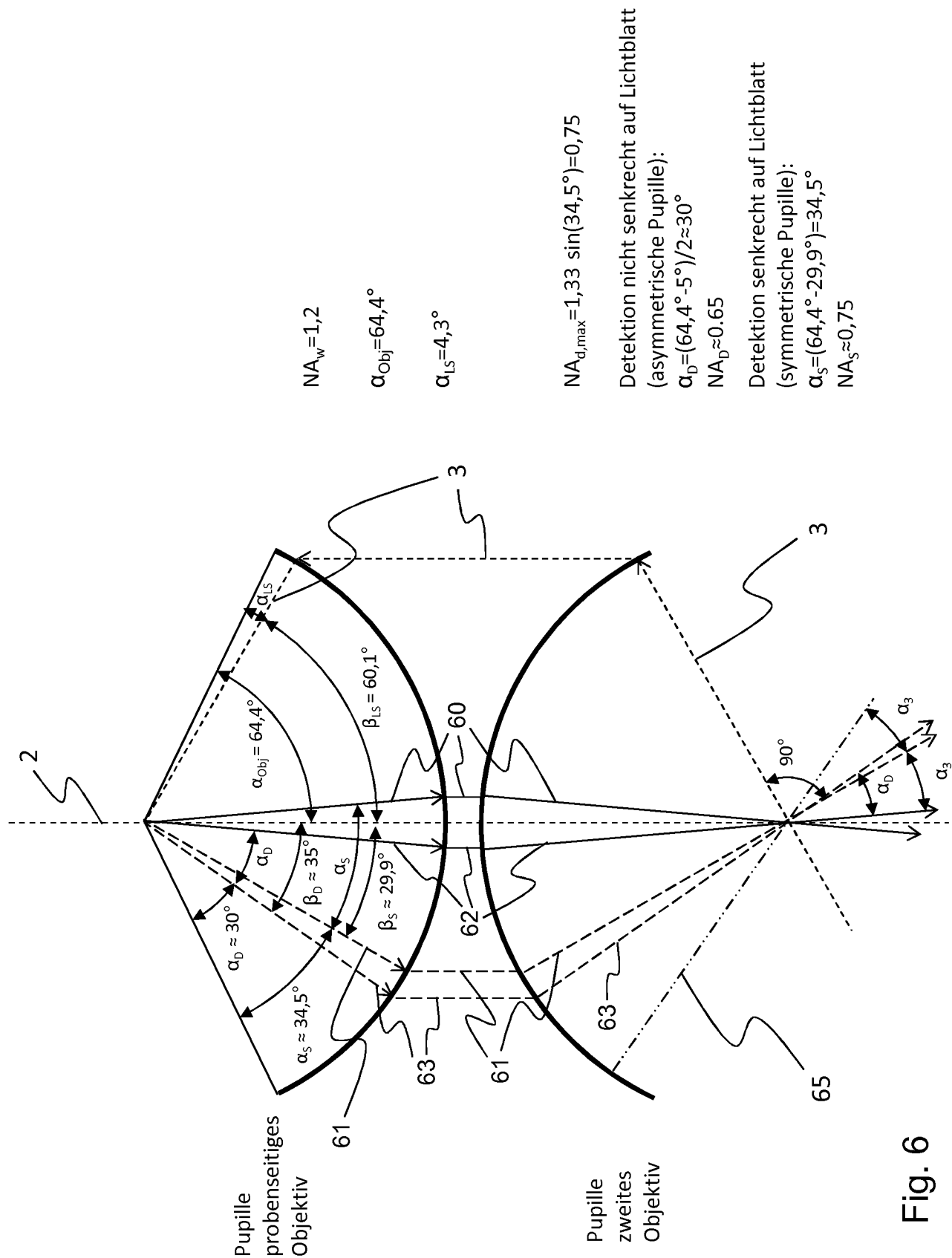


Fig. 6

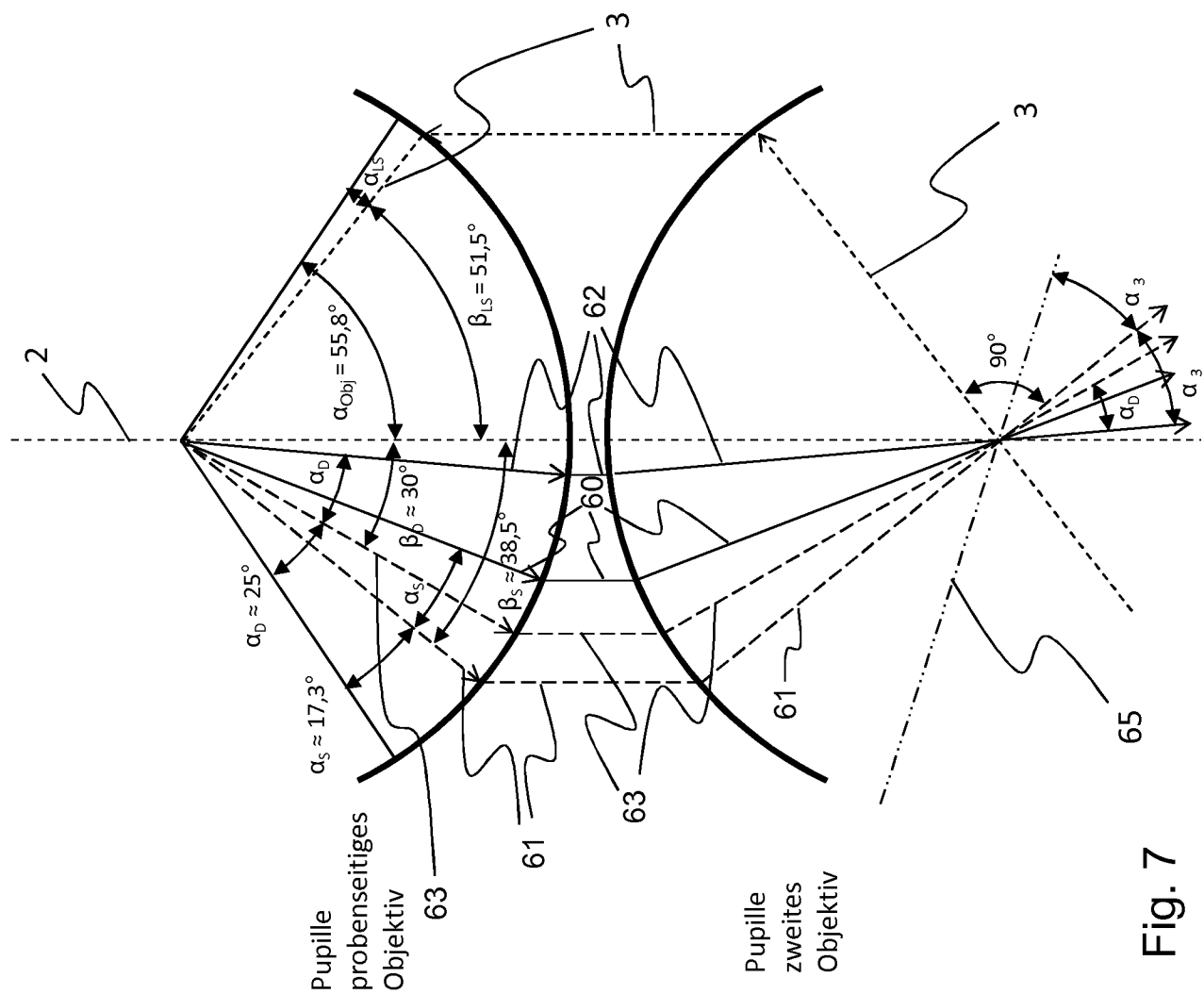


Fig. 7

$NA_w=1,1$

$\alpha_{Obj}=55,8^\circ$

$\alpha_{LS}=4,3^\circ$

Winkel zwischen Lichtblatt und Detektion:
 $\gamma = \beta_D + \beta_{LS} \approx 30^\circ + 52^\circ = 82^\circ$,
entspricht 8° Abweichung von 90°

Detektion nicht senkrecht auf Lichtblatt
(asymmetrische Pupille):
 $\alpha_D = (55,8^\circ - 5^\circ) / 2 \approx 25^\circ$
 $NA_D \approx 0,56$

Detektion senkrecht auf Lichtblatt
(symmetrische Pupille):
 $\alpha_s = (55,8^\circ - 38,5^\circ) = 17,3^\circ$
 $NA_s \approx 0,40$

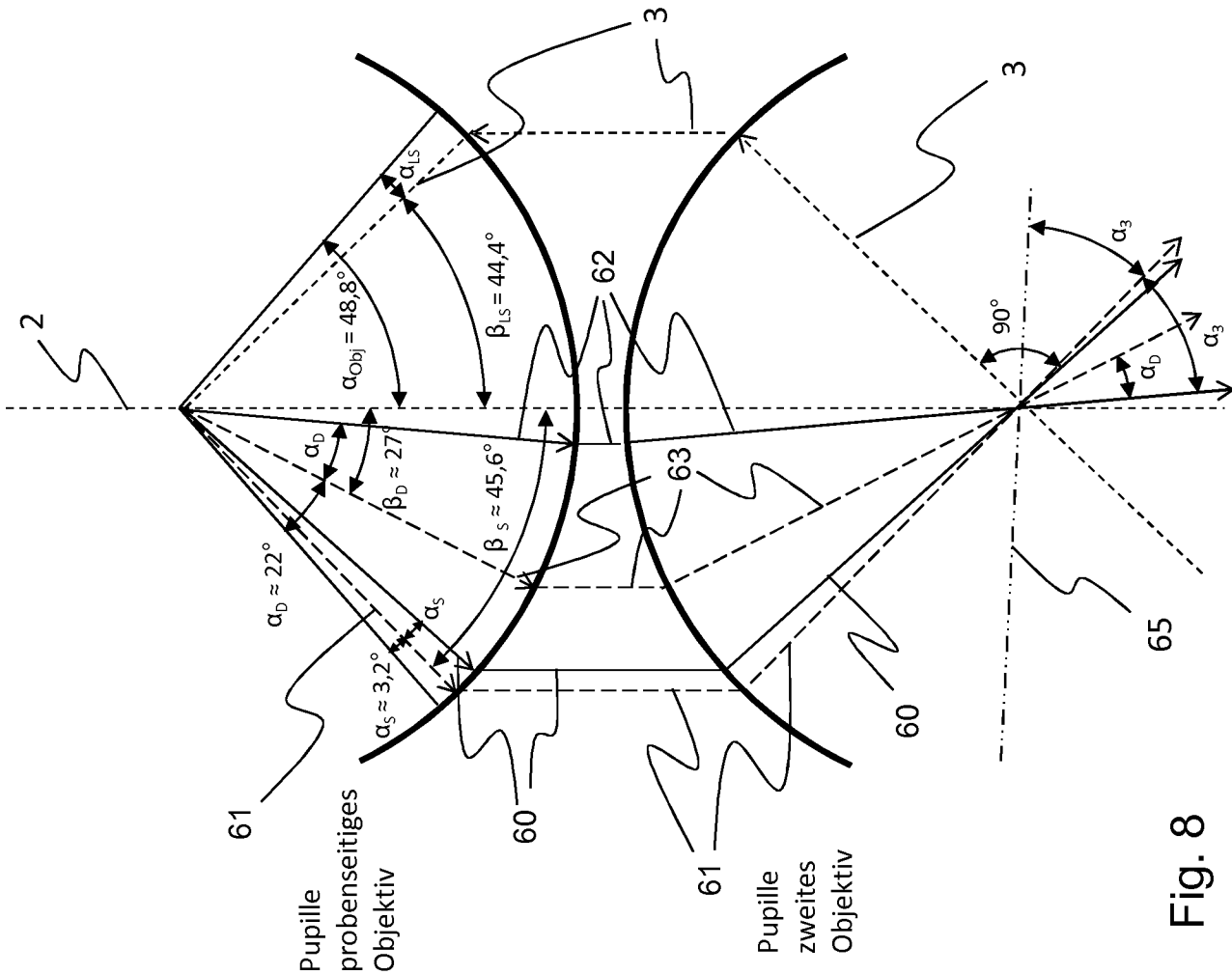


Fig. 8

$NA_w=1,0$

$\alpha_{Obj}=48,8^\circ$

$\alpha_{LS}=4,3^\circ$

Winkel zwischen Lichtblatt und Detektion:
 $\gamma = \beta_o + \beta_{LS} \approx 27^\circ + 44^\circ = 71^\circ$,
entspricht 19° Abweichung von 90°

Detektion nicht senkrecht auf Lichtblatt
(asymmetrische Pupille):
 $\alpha_o = (48,8^\circ - 5^\circ) / 2 \approx 22^\circ$
 $NA_D \approx 0,50$

Detektion senkrecht auf Lichtblatt
(symmetrische Pupille):
 $\alpha_s = (48,8^\circ - 45,6^\circ) = 3,2^\circ$
 $NA_S \approx 0,07$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/063576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G02B21/00 G02B21/18 G02B21/36
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 2013/335818 A1 (KNEBEL WERNER [DE] ET AL) 19 December 2013 (2013-12-19) paragraphs [0053], [0059]; figures 2,3 paragraph [0030] paragraph [0044]; figure 5 paragraph [0004]	1-12
A	SWOGER J ET AL: "Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy", OPTICS EXPRESS, OSA PUBLISHING, US, vol. 15, no. 13, 13 June 2007 (2007-06-13) , pages 8029-8042, XP002508396, ISSN: 1094-4087, DOI: 10.1364/OE.15.008029 Abstract ----- -/-	12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

28 September 2017

Date of mailing of the international search report

09/10/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Linke, Felix

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/063576

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 2012 218920 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 17 April 2014 (2014-04-17) paragraphs [0007], [0008]; figure 2 -----	10
A	EP 2 369 401 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]) 28 September 2011 (2011-09-28) figure 1 -----	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/063576

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013335818 A1	19-12-2013	CN 103339547 A	02-10-2013
		DE 102011000835 A1	23-08-2012
		JP 5642301 B2	17-12-2014
		JP 2014508326 A	03-04-2014
		US 2013335818 A1	19-12-2013
		WO 2012113752 A1	30-08-2012

DE 102012218920 A1	17-04-2014	DE 102012218920 A1	17-04-2014
		WO 2014060271 A1	24-04-2014

EP 2369401 A1	28-09-2011	EP 2369401 A1	28-09-2011
		JP 5715684 B2	13-05-2015
		JP 2013522684 A	13-06-2013
		US 2013063586 A1	14-03-2013
		WO 2011116904 A1	29-09-2011

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G02B21/00 G02B21/18 G02B21/36 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 2013/335818 A1 (KNEBEL WERNER [DE] ET AL) 19. Dezember 2013 (2013-12-19) Absätze [0053], [0059]; Abbildungen 2,3 Absatz [0030] Absatz [0044]; Abbildung 5 Absatz [0004]	1-12
A	----- SWOGER J ET AL: "Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy", OPTICS EXPRESS, OSA PUBLISHING, US, Bd. 15, Nr. 13, 13. Juni 2007 (2007-06-13) , Seiten 8029-8042, XP002508396, ISSN: 1094-4087, DOI: 10.1364/OE.15.008029 Abstract ----- -/--	12
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ 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
28. September 2017		09/10/2017
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Linke, Felix

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 10 2012 218920 A1 (ZEISS CARL MICROSCOPY GMBH [DE]) 17. April 2014 (2014-04-17) Absätze [0007], [0008]; Abbildung 2 -----	10
A	EP 2 369 401 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]) 28. September 2011 (2011-09-28) Abbildung 1 -----	8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/063576

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2013335818	A1	19-12-2013	CN 103339547 A 02-10-2013
			DE 102011000835 A1 23-08-2012
			JP 5642301 B2 17-12-2014
			JP 2014508326 A 03-04-2014
			US 2013335818 A1 19-12-2013
			WO 2012113752 A1 30-08-2012

DE 102012218920	A1	17-04-2014	DE 102012218920 A1 17-04-2014
			WO 2014060271 A1 24-04-2014

EP 2369401	A1	28-09-2011	EP 2369401 A1 28-09-2011
			JP 5715684 B2 13-05-2015
			JP 2013522684 A 13-06-2013
			US 2013063586 A1 14-03-2013
			WO 2011116904 A1 29-09-2011
