

(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
5. März 2015 (05.03.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/028453 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61B 5/00 (2006.01) A61B 18/14 (2006.01)
A61N 7/02 (2006.01) A61B 19/00 (2006.01)

(74) Anwalt: BRADL, Joachim; Leica Microsystems CMS
GmbH, CPTD, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/068045

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. August 2014 (26.08.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2013 216 934.5
26. August 2013 (26.08.2013) DE

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

(72) Erfinder: SÄGMÜLLER, Bernd; Am Holderbusch 12,
69514 Laudenbach (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, LT, 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,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR INCREASING THE OPTICAL TRANSPARENCY OF REGIONS OF A TISSUE
SAMPLE

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ERHÖHUNG DER OPTISCHEN TRANSPARENZ VON
BEREICHEN EINER GEWEBEPROBE

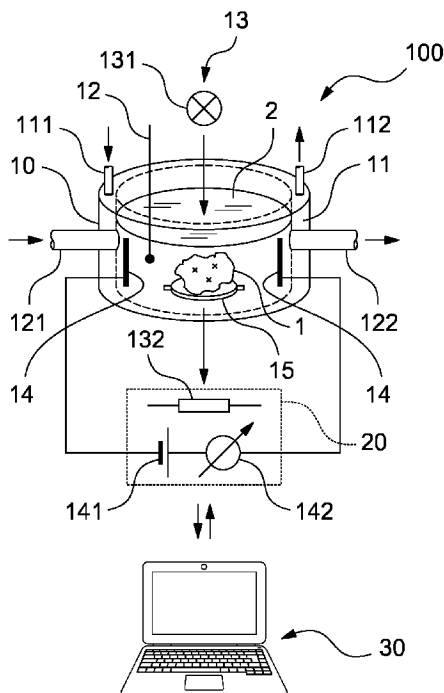


Fig. 2

(57) Abstract: The invention relates to a method for increasing the optical transparency of regions of a tissue sample (1), wherein the tissue sample (1) is placed in a process chamber (10) and is infiltrated with at least one process fluid (2) in the process chamber (10), and wherein light-scattering structures in the tissue sample (1) are removed. The method comprises monitoring the optical transparency of the tissue sample (1) at least during a clarification time period, in which the tissue sample (1) is placed in the process chamber (10) and in which the light-scattering structures in the tissue sample (1) are removed, by means of an optical transparency-measuring assembly (13) associated with the process chamber (10). The invention further relates to a device (100) for performing the method.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe (1) vorgeschlagen, bei dem die Gewebeprobe (1) in eine Prozesskammer (10) eingebracht und in der Prozesskammer (10) mit zumindest einem Prozessfluid (2) infiltriert wird, und bei dem eine Entfernung lichtstreuender Strukturen in der Gewebeprobe (1) durchgeführt wird. Das Verfahren umfasst, die optische Transparenz der Gewebeprobe (1) zumindest während eines Klärungszeitraums, in dem die Gewebeprobe (1) in die Prozesskammer (10) eingebracht ist und in dem die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen in der Gewebeprobe (1) durchgeführt wird, mittels einer der Prozesskammer (10) zugeordneten optischen Transparenzmessanordnung (13) zu überwachen. Eine Vorrichtung (100) zur Durchführung des Verfahrens ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.



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)

Verfahren und Vorrichtung zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der optischen
10 Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe und eine zur Durchführung eines
entsprechenden Verfahrens eingerichtete Vorrichtung gemäß den Oberbegriffen
der unabhängigen Patentansprüche.

Stand der Technik

15

Die Identifizierung dreidimensionaler Strukturbeziehungen in intakten biologi-
schen Gewebeproben durch mikrooptische Techniken ist aufgrund der häufig
weitgehend fehlenden optischen Transparenz solcher Gewebeproben herkömmli-
cherweise mit Problemen behaftet. Insbesondere betrifft dies die Untersuchung
20 von Strukturbeziehungen zwischen den Neuronen in Nerven- bzw. Hirngewebe.
Herkömmliche Verfahren sehen zu diesem Zweck die Erfassung mikroskopischer
Serienschnitte in Form von digitalen Bildern vor, aus denen dann eine Rekonstruk-
tion der dreidimensionalen Beziehungen vorgenommen wird. Dies ist jedoch zu-
mindest sehr aufwendig und gegebenenfalls fehlerbehaftet.

25

Eine neuere Veröffentlichung (K. Chung et al.: Structural and molecular interroga-
tion of intact biological systems, Nature 497, 332–337, 2013) schlägt vor diesem
Hintergrund ein Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Berei-
chen einer entsprechenden Gewebeprobe vor. Wie dort erläutert, ist die fehlende
30 optische Transparenz im Wesentlichen auf Lipiddoppelschichten zurückzuführen.
An den durch diese gebildeten Grenzflächen wird eindringendes Licht gestreut. Die

– 2 –

erwähnte Veröffentlichung schlägt daher die nichtdestruktive Entfernung derartiger Lipiddoppelschichten vor, d.h. eine Entfernung, bei der die übrige Gewebeprobe strukturell möglichst weitgehend erhalten bleibt.

- 5 Hierzu wird die Gewebeprobe beispielsweise mit Hydrogelmonomeren (z.B. Acrylamid und Bisacrylamid), Formaldehyd und thermoreaktiven Initiatoren getränkt. Das Formaldehyd sorgt dabei einerseits für eine Quervernetzung des Gewebes und koppelt andererseits die Hydrogelmonomere kovalent mit Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren. Anschließend wird thermisch eine Polymerisation der entsprechend gekoppelten Monomere zu einem Hydrogelnetz eingeleitet. Die genannten Biomoleküle werden in das hierdurch geschaffene dreidimensionale Hydrogel eingebunden und damit stabilisiert.
- 10

- 15 Moleküle ohne koppelbare funktionelle Gruppen, insbesondere Lipide der Lipiddoppelschichten, bleiben ungebunden und können daher aus der geschaffenen Struktur extrahiert werden. Zweckmäßigerweise kommt hierzu ein ionisches Extraktionsverfahren zum Einsatz, weil hierdurch die mikrooptische Untersuchung, z.B. durch Fluoreszenzmikroskopie, nicht beeinflusst wird.

- 20 Zur Extraktion der Lipide können beispielsweise Natriumdodecylsulfat-(SDS-) Micellen in wässrigen Lösungsmitteln zum Einsatz kommen, die aufgrund ihrer negativen Gesamtladung unter neutralen bis alkalischen Bedingungen in einem angelegten elektrischen Feld migrieren und hierdurch durch die entsprechend vorbereitete Gewebeprobe getrieben werden können.

- 25 Zu weiteren Details eines entsprechenden Verfahrens sei auf die erwähnte Veröffentlichung verwiesen. Es sei jedoch betont, dass die vorliegende Erfindung nicht nur in der dort offenbarten spezifischen Verfahrensvariante zum Einsatz kommen kann, sondern auch in anderen Verfahren Verwendung finden kann, in welchen
- 30 zumindest in bestimmten Verfahrensschritten eine graduelle Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe beobachtet werden kann.

Derartige Verfahren werden herkömmlicherweise rein manuell durchgeführt, d.h. die Kontrolle des Erfolgs eines entsprechenden Verfahrens erfolgt visuell durch einen Experimentator. Derartige Verfahren sind damit in der Praxis arbeitsauf-
5 wändig und schlecht reproduzierbar. Insbesondere im Umfeld medizinischer Forschungsvorhaben erweist sich letzterer Umstand als Nachteil, weil hierdurch keine standardisierte Probenvorbereitung möglich ist.

Die Erfindung will hier Abhilfe schaffen und entsprechende Verfahren zur Erhö-
10 hung der optischen Transparenz von Bereichen von Gewebeproben erleichtern und insbesondere im Sinne einer erhöhten Reproduzierbarkeit verbessern.

Offenbarung der Erfindung

15 Vor diesem Hintergrund schlägt die vorliegende Erfindung ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erhöhung der optischen Transparenz (also einer sogenannten Klärung, engl. Clearing) von Bereichen einer Gewebeprobe mit den Merkmalen der unabhängigen Patentansprüche vor. Bevorzugte Ausgestaltungen sind Gegenstand der abhängigen Patentansprüche sowie der nachfolgenden Beschreibung.

20

Die vorliegende Erfindung geht von einem Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe aus, wie es grundsätzlich zuvor erläutert wurde. In einem derartigen Verfahren wird die Gewebeprobe in eine Prozesskammer eingebracht und in der Prozesskammer mit zumindest einem Pro-
25 zessfluid getränkt (infiltriert). Wie erläutert, kann ein derartiges Verfahren insbesondere auch die Verwendung mehrerer Prozessfluide umfassen, die, beispielsweise thermisch, zur Reaktion gebracht werden können und Strukturen der Gewebeprobe miteinander vernetzen und diese damit stabilisieren.

30 Nach der Vernetzung bzw. Stabilisierung wird in einem derartigen Verfahren eine Entfernung lichtstreuender Strukturen in der Gewebeprobe bewirkt, wie eingangs

erläutert beispielsweise durch Verwendung von Tensidmicellen, die in einem elektrischen Feld migrieren. Wie erläutert, ist ein solches, herkömmlicherweise rein manuell durchgeführtes Verfahren aufwändig und fehlerbehaftet.

- 5 Wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung der Begriff Prozessfluid verwendet, sind hiervon sämtliche, in der Regel flüssige, Substanzen umfasst, die in Form von Einzelverbindungen oder Gemischen in entsprechenden Verfahren zum Einsatz kommen können. Insbesondere handelt es sich hierbei um die erwähnten Prozess-
- 10 fluide, die die optische Transparenz bewirken, indem sie störende Strukturen aus der Gewebeprobe ausspülen, jedoch auch um die zuvor verwendeten Stabilisierungs- bzw. Quervernetzungsmittel, die das anschließende störungsfreie Ausspülen erlauben. Prozessfluide können auch Lager- bzw. Einbettmedien sein. Bei Bereichen einer Probe, deren optische Transparenz erhöht wird, kann es sich beispielsweise um Membranstrukturen oder Vesikelstapel handeln. Die Transparenz
- 15 anderer Bereiche, beispielsweise der im Rahmen eines nachgeschalteten mikrooptischen Verfahrens zu untersuchenden Neuronen, bleibt hingegen unverändert oder zumindest teilweise unverändert.

- Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, die optische Transparenz der Gewebeprobe
- 20 zumindest während eines Klärungszeitraums, in dem die Gewebeprobe in die Prozesskammer eingebracht ist und die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen in der Gewebeprobe bewirkt wird, mittels einer der Prozesskammer zugeordneten optischen Transparenzmessanordnung zu überwachen.

- 25 Unter einem Klärungszeitraum wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung dabei der Zeitraum verstanden, in dem die eigentliche Entfernung der lichtstreuenden Strukturen erfolgt. In dem eingangs erläuterten Verfahren handelt es sich hierbei um den Verfahrensschritt, in dem die Lipiddoppelschichten mittels Tensidmicellen aufgelöst und aus der Probe heraustransportiert werden. Die vorab bereits erfolg-
- 30 ten Schritte, d.h. die Quervernetzung bzw. Stabilisierung der übrigen Gewebestandteile, zählt nicht zu dem eigentlichen Klärungszeitraum. Während dieser vor-

– 5 –

hergehenden Schritte, gegebenenfalls aber auch während nachfolgender Schritte nach dem Klärungszeitraum, kann zwar ebenfalls eine Überwachung erfolgen, jedoch wird während solcher Zeiträume typischerweise keine Erhöhung der Transparenz einer entsprechenden Gewebeprobe beobachtet.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch mehrere Klärungszeiträume umfassen, beispielsweise bei einer Klärung durch unterschiedliche chemisch-physikalische Verfahren, wie unten erläutert. Während eines jeden solchen Klärungszeitraums kann eine Überwachung erfolgen.

10

Insgesamt erlaubt die vorliegende Erfindung damit eine Standardisierung eines entsprechenden Verfahrens zur Erhöhung der optischen Transparenz. Durch die erläuterte Überwachung, die zusätzlich auch weitere Überwachungsverfahren einschließen kann, beispielsweise von chemischen und/oder physikalischen Parametern von Prozessfluiden und/oder der Gewebeprobe, werden gegenüber dem Stand der Technik insbesondere reproduzierbarere Ergebnisse erzielt. Dies hilft dem Praktiker dabei, die bisher vorhandenen Unwägbarkeiten bei der Herstellung entsprechend transparenter Gewebeproben auszuschließen.

15

20

Die vorliegende Erfindung eignet sich beispielsweise im Zusammenhang mit mikrooptischen Verfahren auf Grundlage der Multiphotonentechnik (MP) bzw. entsprechender bildgebender Verfahren (sogenanntes MP-Imaging). Solche Verfahren eignen sich besonders für die Untersuchung altersbedingter degenerativer Erkrankungen (z.B. neurodegenerative Krankheiten) und degenerativer Erkrankungen, die auf den Lebensstil der betroffenen Patienten zurückzuführen sind (sogenannte Lifestyle-Related Diseases). Dies kann auch insbesondere am Tiermodell erfolgen, beispielsweise durch die Untersuchung der Gehirne entsprechend behandelte Mäuse, Ratten, Kaninchen usw.

25

30

Durch die Erhöhung der optischen Transparenz können in die Gewebeprobe eingebrachte Fluorophore besser sichtbar gemacht werden. Die Streuung durch um-

liegende Bereiche der Gewebeprobe, insbesondere die erläuterten Lipiddoppelschichten, wird minimiert bzw. eliminiert. Durch das erfindungsgemäße Verfahren können optische Eindringtiefen in die Gewebeprobe von bis zu 5 bis 6 mm, gegebenenfalls auch mehr, beispielsweise von bis zu 10 mm, realisiert werden.

5

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Transparenzmessanordnung umfasst vorteilhafterweise eine Lichtquelle und einen lichtsensitiven Detektor, wobei die Gewebeprobe zwischen der Lichtquelle und dem lichtsensitiven Detektor angeordnet wird. Ein entsprechender Detektor misst dabei
10 beispielsweise das Licht, das ausgehend von der Lichtquelle die Probe durchsetzt und auf den Detektor auftrifft, d.h. dessen transmittierten Anteil.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens können jedoch auch mehrere Lichtquellen und/oder lichtsensitive Detektoren eingesetzt werden. Entsprechende Detektoren können beispielsweise dazu verwendet werden, Streulicht, das von
15 der Probe bzw. von in dieser verbliebenen lichtstreuenden Strukturen reflektiert bzw. gestreut wird, zu erfassen. Ein entsprechender weiterer lichtsensitiver Detektor ist dabei vorteilhafterweise entgegen der Lichtabstrahlrichtung der Lichtquelle ausgerichtet oder außeraxial zur optischen Achse dieser Lichtquelle angeordnet.
20 Er kann dabei entweder nur einen reflektierten, nur einen gestreuten und/oder beide Anteile des eingestrahnten Lichts erfassen.

Auch mehrere Lichtquellen können verwendet werden, beispielsweise Lichtquellen, die mit unterschiedlichen Wellenlängen arbeiten, beispielsweise mit Infrarot-,
25 UV- und/oder, ggf. farbigem, Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich. Auf diese Weise kann eine wellenlängenselektive Messung der Transparenz erfolgen, die auch insbesondere mit einem nachgeschalteten Untersuchungsverfahren abgestimmt werden kann. Beispielsweise kann auch ein Verhältnis einer Transmission im infraroten zu einer Transmission im ultravioletten bzw. jeweils zu einer
30 Transmission im sichtbaren Wellenlängenbereich verwendet werden.

- 7 -

In dem Verfahren kann vorteilhafterweise auch zumindest eine Lichteigenschaft des durch die Lichtquelle bereitgestellten Lichts und/oder zumindest eine Detektionseigenschaft des lichtsensitiven Detektors beeinflusst werden. Beispielsweise können in beiden Fällen geeignete Filter zum Einsatz kommen. Ist eine selektive Erfassung nur des ungehindert transmittierten Anteils des Lichts erwünscht, kann beispielsweise ein erster Polarisationsfilter vor der Lichtquelle und ein zweiter, identisch ausgerichteter Polarisationsfilter vor dem lichtsensitiven Detektor angebracht werden. Durch die Streuung verliert das Licht seine Polarisation, so dass in diesem Fall nur das transmittierte Licht mittels des lichtsensitiven Detektors detektiert wird. Ein weiterer Detektor kann ohne einen entsprechenden Filter ausgebildet werden, so dass dieser einen Summenparameter aus transmittiertem und gestreutem Licht erfassen kann. Das erfindungsgemäße Verfahren kann in diesem Fall auch beispielsweise eine Differenzbildung zwischen transmittierten und gestreuten Lichtanteilen umfassen.

Wiederum kann die Beeinflussung des durch die Lichtquelle bereitgestellten Lichts und/oder der Detektionseigenschaft des lichtsensitiven Detektors mit einem nachgeschalteten Untersuchungsverfahren abgestimmt werden. Soll beispielsweise eine Fluoreszenz in einem bestimmten Wellenbereich erfasst werden, kann ein entsprechender Detektor hieran angepasst und das erfindungsgemäße Verfahren gerade so lange durchgeführt werden, bis das detektierte Licht ein akzeptables Maximum erreicht, um die Hintergrundstrahlung im nachgeschalteten Fluoreszenzverfahren zu reduzieren, jedoch ohne die Gewebeprobe übermäßig zu belasten. Entsprechendes gilt für das durch die Lichtquelle bereitgestellte Licht.

Wie zu dem eingangs erläuterten Verfahren ausgeführt, umfassen Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen von Gewebeproben typischerweise, die Gewebeprobe während des erläuterten Klärungszeitraums in einer Prozesskammer zwischen zwei zumindest zeitweise strombeaufschlagten Elektroden anzuordnen. Die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen wird in diesem Fall zumindest teilweise durch Migrierenlassen von Tensidmicellen durch die Ge-

webeprobe bewirkt, in denen sich beispielsweise die Lipide der Lipiddoppelschichten anreichern. Wie erläutert, ist ein derartiges Verfahren besonders vorteilhaft, weil hierdurch ein nachgeschaltetes Fluoreszenzverfahren nicht oder kaum beeinflusst wird.

5

Wird eine derartige Klärung mittels Tensidmicellen eingesetzt, kann das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere umfassen, zumindest zeitweise einen Stromfluss zwischen den genannten Elektroden zu überwachen. Beispielsweise kann über Veränderungen im Stromfluss, der Veränderungen im Migrationsverhalten der Tensidmicellen entspricht, der Verlauf eines entsprechenden Klärungsverfahrens beurteilt werden. Ferner kann über einen derartigen Stromfluss eine definierte Migrationsgeschwindigkeit der Micellen eingestellt werden, indem die an den Elektroden anliegende Spannung in geeigneter Weise beeinflusst wird. Ein derartiges Verfahren kann vollautomatisch in Form eines Regelkreises ablaufen, so dass eine besonders reproduzierbare und für den Benutzer einfach durchzuführende Erhöhung der Transparenz (Klärung) erfolgen kann.

Alternativ oder zusätzlich kann auch vorgesehen sein, die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen zumindest teilweise durch Herauslösen mittels wenigstens eines organischen Lösungsmittels durchzuführen. Eine derartige Herauslösung vereinfacht ein entsprechendes Verfahren, weil keine Elektrodenanordnung zum Einsatz kommen muss. Besondere Vorteile bieten entsprechende Verfahrensschritte in Kombination; so können sich beispielsweise Anteile der lichtstreuenden Strukturen, die sich mittels der Tensidmicellen nicht aus dem Gewebeverband herauslösen lassen, durch das organische Lösungsmittel entfernen lassen.

In den zuvor erläuterten Verfahren kann es besonders vorteilhaft sein, zumindest eine Temperatur des zumindest einen Prozessfluids in der Prozesskammer zu überwachen. Auch eine derartige Überwachung trägt zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit eines entsprechenden Verfahrens bei. Beispielsweise wird, wie eingangs erläutert, insbesondere die Vernetzung der nicht zu entfernenden Struktu-

ren der Probe häufig durch thermoaktivierte Polymerisation durchgeführt. Durch exakte Überwachung eines hierbei auftretenden bzw. verwendeten Temperaturverlaufs lassen sich eine reproduzierbare Vernetzung und damit eine weitgehende Erhaltung der erwünschten Probenstrukturen erzielen.

5

In allen Fällen kann die vorliegende Erfindung auch die Verwendung einer Vakuum- oder Druckinfiltration umfassen, bei der die entsprechenden Prozessfluide in die Probe durch ein (voriges) Anlegen eines Vakuums oder mithilfe von Druck eingebracht werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann die Überwachung eines
10 entsprechenden Vakuums bzw. Drucks mit entsprechenden hierzu vorgesehenen Mitteln umfassen. In einem solchen Fall ist die Prozesskammer vakuum- bzw. druckfest ausgebildet und weist eine zumindest teilweise vakuum- bzw. druckdichte Abdichtung auf. Nach Einbringung der Probe in diese Prozesskammer kann diese beispielsweise mittels eines entsprechend ausgebildeten Deckels verschlos-
15 sen werden und die weitere Bearbeitung im geschlossenen Zustand erfolgen.

Es kann auch vorteilhaft sein, zumindest zeitweise zumindest eine optische Eigenschaft des zumindest einen Prozessfluids mit der optischen Transparenzmessanordnung und/oder einer weiteren optischen Anordnung zu überwachen. Hierbei
20 kann es sich beispielsweise um ein Absorptionsverhalten bei bestimmten Wellenlängen handeln. Eine Änderung der Absorption kann hierbei beispielsweise dadurch zustande kommen, dass eine vorzunehmende Reaktion abgeschlossen ist und/oder dass die lichtstreuenden Strukturen aus der Gewebeprobe herausgelöst sind. Beispielsweise um einen für die jeweilige Reaktion erforderlichen pH-Wert
25 möglichst exakt einzuhalten, kann in dem zumindest einen Prozessfluid auch beispielsweise ein pH-Indikator gelöst werden, dessen Farbumschlag mittels der optischen Transparenzmessanordnung und/oder einer weiteren optischen Anordnung überwacht werden kann.

30 Auch weitere physikalische und/oder chemische Eigenschaften der Gewebeprobe und/oder des zumindest einen Prozessfluids können im Rahmen des erfindungs-

gemäßen Verfahrens überwacht werden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um pH-Werte, Leitfähigkeiten, Ionenstärken, Viskositäten und dergleichen.

5 Eine im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Prozesskammer kann auch insbesondere Mittel zum Austausch des oder der verwendeten Prozessfluide aufweisen. Beispielsweise können hierzu geeignete Speicherbehälter vorgesehen sein, die mittels Leitungen mit der Prozesskammer gekoppelt sind. Mittels geeigneter Pumpen und/oder Ventile, die durch eine der Prozesskammer zugeordnete Steuereinheit automatisch angesteuert werden können, lassen sich derartige
10 Prozessfluide automatisch, beispielsweise entsprechend einem vorgegebenen Bearbeitungsprotokoll, mischen, temperieren und/oder in oder durch die Prozesskammer führen. Insgesamt ermöglicht die Erfindung damit die vollautomatische Durchführung eines Klärungsverfahrens.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders vorteilhaft, wenn hierbei die Gewebeprobe unter Verwendung von lagedefinierenden Mitteln in der Prozesskammer angeordnet wird. Unter lagedefinierenden Mitteln werden hier Strukturen verstanden, die eine definierte Ausrichtung der Probe in der Prozesskammer vorgeben bzw. sicherstellen. Beispielsweise kann eine entsprechende Probe mit Bezugspunkten oder Bezugsstrukturen versehen sein, die mit entsprechenden Bezugspunkten oder Bezugsstrukturen in der Prozesskammer bzw. einer entsprechenden Aufnahme ausgerichtet werden können. Auch bei einer verdrehsicheren Aufnahme für eine Gewebeprobe handelt es sich um lagedefinierende Mittel.
20

25 Auch die erfindungsgemäße Vorrichtung profitiert von den zuvor erläuterten Vorteilen. Eine derartige Vorrichtung weist eine Prozesskammer zur Aufnahme einer Gewebeprobe in zumindest einem Prozessfluid zur Entfernung lichtstreuender Strukturen in der Gewebeprobe auf. Erfindungsgemäß zeichnet sich die Vorrichtung dadurch aus, dass sie eine Transparenzmessanordnung zum Überwachen der optischen Transparenz der Gewebeprobe zumindest während eines Klärungszeitraums, in dem die Gewebeprobe in die Prozesskammer eingebracht ist und die
30

– 11 –

Entfernung der lichtstreuenden Strukturen in der Gewebeprobe vorgenommen wird, aufweist. Die Transparenzmessanordnung ist wie erläutert ausgebildet.

Insbesondere ist die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche eingerichtet.

Vorteilhafterweise umfasst eine derartige Vorrichtung ferner eine Steuereinheit zum Ansteuern der Transparenzmessanordnung und eine Auswerteeinheit zum Auswerten zumindest eines durch die Transparenzmessanordnung bereitgestellten Messsignals. Die Ansteuerung und Auswertung erfolgt vorzugsweise vollautomatisch, so dass sich eine besonders einfache und reproduzierbare Durchführung eines entsprechenden Verfahrens ergibt.

Wie ebenfalls bereits teilweise erläutert, umfasst eine derartige Vorrichtung ferner strombeaufschlagbare Elektroden innerhalb der Prozesskammer und eine Stromquelle zum Beaufschlagen dieser Elektroden. Auch diese kann durch die Steuereinheit bzw. die Auswerteeinheit angesteuert bzw. ausgewertet werden. Die Elektroden können in unterschiedlicher Weise, beispielsweise platten-, gitter- und/oder halbzylinderförmig, ausgebildet sein, so dass sich bei ihrer Bestromung ein optimiertes elektrisches Feld ergibt.

Eine derartige Vorrichtung umfasst vorteilhafterweise ferner Messmittel zum Bestimmen zumindest einer physikalischen und/oder chemischen Eigenschaft der Gewebeprobe und/oder des zumindest einen Prozessfluids und/oder lagedefinierende Mittel zum Anordnen der Gewebeprobe in der Prozesskammer. Auch Druck- und/oder Vakuummittel zur Druck- bzw. Vakuuminfiltration können, wie bereits erläutert, vorgesehen sein.

Die Erfindung und Ausführungsformen der Erfindung werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die beigelegten Zeichnungen weiter erläutert.

Figurenbeschreibung

Figur 1 veranschaulicht ein Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe gemäß dem Stand der Technik und gemäß einer
5 Ausführungsform der Erfindung in Form eines schematischen Ablaufplans.

Figur 2 zeigt eine Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der Erfindung in schematischer Darstellung.

10 Ausführliche Beschreibung der Zeichnungen

In Figur 1 ist zunächst ein Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe gemäß dem Stand der Technik in Form eines schematischen Ablaufplans, der insgesamt mit 210 bezeichnet ist, veranschaulicht.

15

Es sei betont, dass entsprechende Verfahren 210, insbesondere unter Berücksichtigung der jeweils verwendeten Reaktionsprinzipien, Prozessmedien usw., auch in abweichender Form durchgeführt werden können. Die Anzahl und Reihenfolge der in der Figur 1 dargestellten Verfahrensschritte ist daher nicht einschränkend.

20

Ein entsprechendes Verfahren 210 wird jedoch stets vor der Durchführung eines nachgeschalteten bildgebenden Verfahrens durchgeführt. Zwischen den Verfahren 210 und nachgeschalteten Verfahrensschritten der Bildgebung können beliebige weitere Verfahrensschritte vorgesehen sein, beispielsweise zur Stabilisierung einer entsprechenden Gewebeprobe für die Lagerung und dergleichen. Weitere Verfahrensschritte, die vor dem Verfahren 210 oder nach diesem durchgeführt werden, umfassen beispielsweise die Färbung, immunhistochemische Markierung oder Einbettung entsprechender Gewebeproben.

25

30 Das dargestellte Verfahren 210 wird an Gewebeproben vorgenommen, wie sie grundsätzlich zuvor erläutert wurden, beispielsweise an Gewebeproben von Ner-

ven- oder Hirngewebe. Entsprechende Verfahren können auch an Gewebeproben vorgenommen werden, die in eingelagerter Form vorliegen, beispielsweise an formalinfixierten Dauerpräparaten, forensischen Gewebeproben usw.

- 5 Das Verfahren beginnt mit einem Schritt 201, in dem eine entsprechende Gewebeprobe bereitgestellt wird. Beispielsweise wird eine derartige Gewebeprobe in Schritt 201 in eine Prozesskammer eingelegt und dort befestigt.

- 10 In einem nachfolgenden Schritt 202 erfolgt die Zugabe zumindest eines Prozessfluids, beispielsweise zur Stabilisierung von Strukturen der Gewebeprobe, wie zuvor erläutert. Es können auch mehrere entsprechender Schritte 202, nacheinander oder jeweils optional, durchgeführt werden, beispielsweise um eine entsprechende Gewebeprobe für die nachfolgenden Verfahrensschritte vorzubereiten. Bestimmte Gewebeproben, beispielsweise formalinfixierte Dauerpräparate, erfordern ggf.
15 eine längere und/oder mehrschrittigere Probenvorbereitung als andere, beispielsweise Frischproben.

- 20 In einem Schritt 203 erfolgt beispielsweise eine Fixierung bzw. Stabilisierung der Gewebeprobe durch Quervernetzung. Beispielsweise erfolgt hierbei eine Erwärmung, um eine Reaktion des oder der in Schritt 202 zugegebenen Prozessfluide zu bewirken. Eine entsprechende Fixierung bzw. Stabilisierung kann auch das Einwirkenlassen weiterer Prozessfluide und/oder das Einstellen bestimmter Reaktionsbedingungen (Temperaturen, pH-Werte, Ionenstärken usw.) handeln.

- 25 In einem nachfolgenden Schritt 204 wird anhand bekannter Kriterien überprüft, ob Schritt 203 erfolgreich war und/oder ausreichend lange durchgeführt wurde. Ist dies nicht der Fall (Nein, N), erfolgt beispielsweise in Schritt 205 der Austausch des oder der Prozessfluide, eine Änderung der Reaktionsbedingungen usw. Das Verfahren wird entsprechend Schritt 203 weiter durchgeführt, und zwar so lange,
30 bis in Schritt 204 ein Erfolg festgestellt wurde (Ja, Y).

- 14 -

In diesem Fall wird das Verfahren mit Schritt 206 fortgesetzt, in dem beispielsweise die Gewebeprobe gespült und/oder lichtstreuende Strukturen aus dieser entfernt werden. Insbesondere der Schritt 206 wird in herkömmlichen Verfahren 210 rein manuell durchgeführt und kontrolliert, d.h. es wird beispielsweise visuell be-
5 urteilt, ob die Transparenz der Probe ausreichend erhöht wurde.

Es folgt ein Schritt 207, in dem die Gewebeprobe beispielsweise in ein geeignetes Lagerfluid eingebracht wird, um diese zur anschließenden Untersuchung struktu-
rell möglichst unverändert lagern zu können.

10

Das Verfahren 210 kommt mit Schritt 208 zum Abschluss, in welchem eine entsprechend vorbereitete Gewebeprobe vorliegt.

15

In Figur 1 ist auch ein Verfahren gemäß einer Ausführungsform der Erfindung in Form eines schematischen Ablaufplans dargestellt und mit 200 bezeichnet.

20

Das Verfahren 200 unterscheidet sich von dem zuvor erläuterten Verfahren 210 im Wesentlichen durch einen weiteren Verfahrensschritt 209, der im Rahmen der Erfindung umfasst, mittels einer optischen Transparenzmessanordnung, die einer
Prozesskammer zugeordnet ist, in welcher die Gewebeprobe vorliegt, die Entfernung lichtstreuender Strukturen in der Gewebeprobe zu überwachen. Während
der Durchführung des Verfahrensschritts 210, beispielsweise während eines Spü-
lens einer entsprechenden Gewebeprobe und/oder der Durchführung eines zuvor
erläuterten Verfahrens unter Verwendung von Tensidmicellen, erhöht sich die
25 Transparenz der Gewebeprobe. Ergibt eine Überwachung bzw. eine Überprüfung
in Schritt 209, dass noch keine ausreichende Transparenz vorliegt (N), wird das
Verfahren mit Schritt 206 weiter durchgeführt. Wird eine ausreichende Transpa-
renz hergestellt (Y) wird das Verfahren wie erläutert mit Schritt 207 fortgesetzt.

30

In Figur 2 ist eine Vorrichtung gemäß einer Ausführungsform der Erfindung schematisch dargestellt und insgesamt mit 100 bezeichnet.

Die Vorrichtung 100 umfasst im dargestellten Beispiel eine Prozesskammer 10, in die ein Prozessfluid 2 eingebracht ist. Eine Gewebeprobe 1 ist in dem Prozessfluid 2 in der Prozesskammer 10 angeordnet. Das Prozessfluid 2 kann über geeignete
5 Fluideinlässe 121 und Fluidauslässe 122 durch die Prozesskammer geführt werden, wie durch die entsprechenden Pfeile in Figur 2 veranschaulicht.

Im dargestellten Beispiel ist die eigentliche Prozesskammer 10 von einem Mantelbereich 11 umgeben, welcher mit einem geeigneten Temperierfluid, beispielsweise
10 einem Kühlmittel und/oder einem flüssigen oder gasförmigen Heizmedium, beschickt werden kann. Dies ermöglicht die Temperierung des Prozessfluids 2 in der Prozesskammer 10. Zum Einspeisen bzw. Entnehmen eines derartigen Temperierfluids sind Einlässe 111 und Auslässe 112 vorgesehen. Alternativ zur Verwendung eines Temperierfluids kann auch eine Temperierung mit physikalischen Mitteln
15 erfolgen, z.B. mittels einer Widerstandsheizung und/oder mit Peltierelementen.

Der Prozesskammer ist eine Transparenzmessanordnung 13 zugeordnet, die hier stark vereinfacht dargestellt ist. Die Transparenzmessanordnung 13 umfasst zumindest eine Lichtquelle 131 und einen lichtsensitiven Detektor 132. Abweichend
20 zu der Darstellung in Figur 2 können die Lichtquelle 131 und der licht sensitive Detektor 132 insbesondere auch vor bzw. hinter einer entsprechenden Prozesskammer 10 angeordnet sein, so dass eine entsprechende Gewebeprobe von dem Licht der Lichtquelle 131 horizontal durchstrahlt werden kann. Wie erläutert, können mehrere Lichtquellen 131 und/oder licht sensitive Detektoren 132, Filter,
25 Optiken und dergleichen vorgesehen sein.

Die Vorrichtung 100 umfasst ferner zwei Elektroden 14. Zur Bestromung der Elektroden 14 ist eine Stromquelle 141, ggf. mit entsprechenden Spannungs- und/oder Stromstellmitteln 142, vorgesehen. Wie mehrfach erläutert, kann hier
30 durch ein durchgeführtes Elektrophoreseverfahren besser kontrolliert werden.

– 16 –

Der lichtensitive Detektor 132 und die zuletzt erläuterten Elemente können in einer Steuereinheit 20, hier gestrichelt veranschaulicht, angeordnet sein, die beispielsweise mit einem Rechner 30 gekoppelt sein kann. Es versteht sich, dass Teile der Steuereinheit 20 auch in dem Rechner integriert sein können oder umgekehrt.

5 Mittels der Steuereinheit 20 und/oder des Rechners 30 können jeweils Parameter des durchzuführenden Verfahrens 200 eingestellt werden.

Die Vorrichtung 100 weist ferner innerhalb der Prozesskammer 10 lagedefinierende Mittel 15 auf, die zum Anordnen der Gewebeprobe in der Prozesskammer
10 10 eingerichtet sind, insbesondere zu deren Ausrichtung wie zuvor erläutert.

Innerhalb der Prozesskammer 10 und/oder extern zu dieser können auch weitere Erfassungsmittel 12 vorgesehen sein, beispielsweise um eine Temperatur, einen pH-Wert, eine Leitfähigkeit, eine Ionenstärke, eine Sauerstoffsättigung, eine Fluss-
15 rate, eine Trübung, eine Viskosität und dergleichen des Prozessfluids 2 und/oder der Gewebeprobe 1 zu erfassen und in entsprechender Weise auf ein durchgeführtes Verfahren einwirken zu können.

5

Patentansprüche

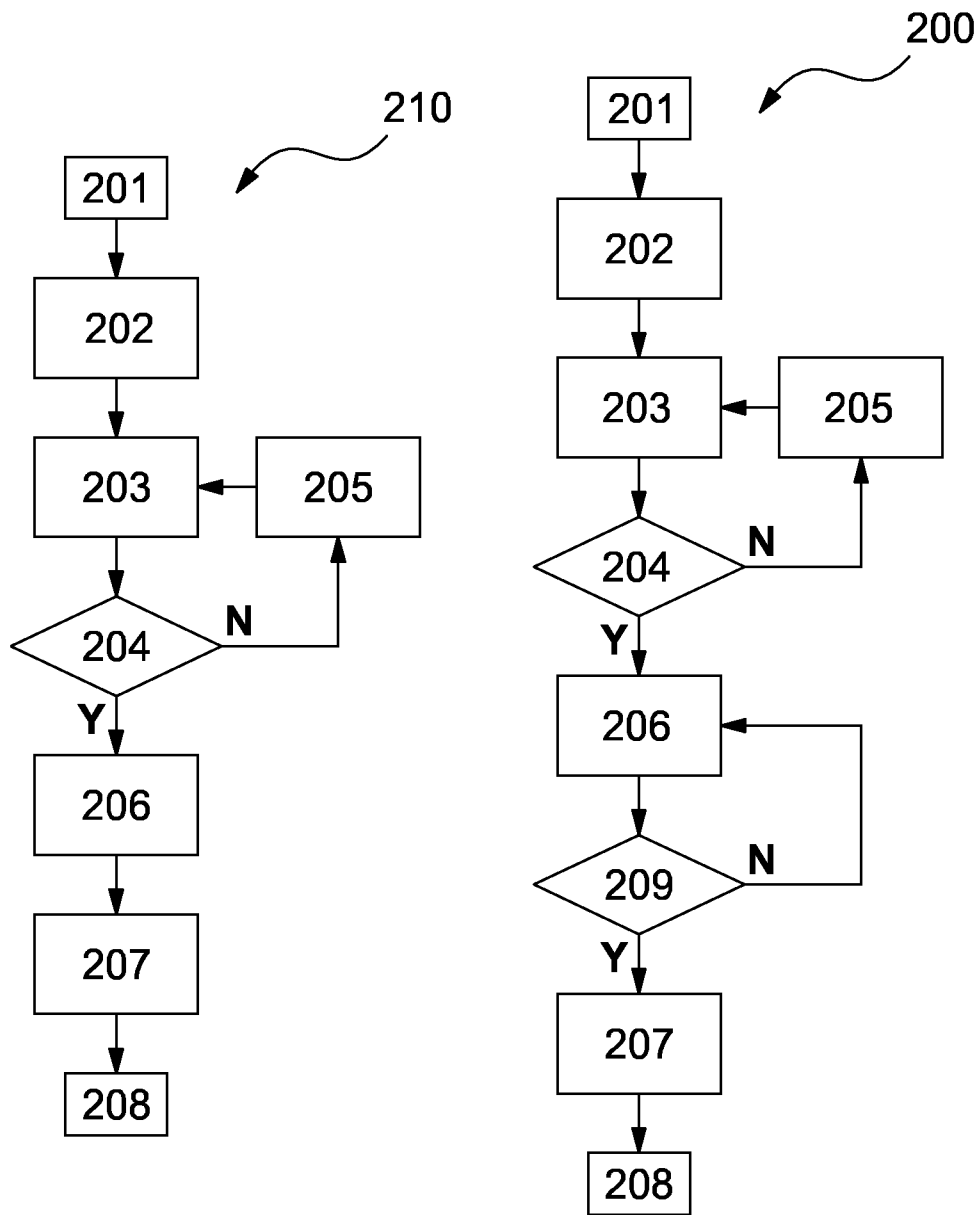
1. Verfahren zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe (1), bei dem die Gewebeprobe (1) in eine Prozesskammer (10) eingebracht und in der Prozesskammer (10) mit zumindest einem Prozessfluid (2) infiltriert wird, und bei dem eine Entfernung lichtstreuender Strukturen in der Gewebeprobe (1) durchgeführt wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren umfasst, die optische Transparenz der Gewebeprobe (1) zumindest während eines Klärungszeitraums, in dem die Gewebeprobe (1) in die Prozesskammer (10) eingebracht ist und die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen in der Gewebeprobe (1) durchgeführt wird, mittels einer der Prozesskammer (10) zugeordneten optischen Transparenzmessanordnung (13) zu überwachen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei der eine optische Transparenzmessanordnung (13) mit einer Lichtquelle (131) und einem lichtsensitiven Detektor (132) verwendet wird, wobei die Gewebeprobe zwischen der Lichtquelle (131) und dem lichtsensitiven Detektor (132) angeordnet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem zumindest eine Lichteigenschaft durch die Lichtquelle (131) bereitgestellten Lichts und/oder zumindest eine Detektionseigenschaft des lichtsensitiven Detektors (132) beeinflusst wird.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Gewebeprobe (1) in der Prozesskammer (10) während des Klärungszeitraums zwischen Elektroden (14) angeordnet wird und die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen zumindest das Migrierenlassen von Tensidmicellen durch die Gewebeprobe mittels der Elektroden (14) umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 4, das ferner umfasst, zumindest zeitweise einen Stromfluss zwischen den Elektroden (14) zu überwachen.
- 5 6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen zumindest teilweise durch Herauslösen mittels wenigstens eines organischen Lösungsmittels erfolgt.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, das ferner umfasst,
10 zumindest zeitweise zumindest eine Temperatur des zumindest einen Prozessfluids (2) in der Prozesskammer zu überwachen.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, das ferner umfasst, zumindest zeitweise zumindest eine optische Eigenschaft des zumindest einen
15 Prozessfluids (2) mittels der optischen Transparenzmessanordnung (13) und/oder einer weiteren optischen Anordnung zu überwachen.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem zumindest zeitweise eine weitere physikalische und/oder chemische Eigenschaft der Gewebeprobe (1) und/oder des zumindest einen Prozessfluids überwacht wird.
20
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem die Gewebeprobe (1) unter Verwendung von lagedefinierenden Mitteln (15) in der Prozesskammer (10) angeordnet wird.
25
11. Vorrichtung zur Erhöhung der optischen Transparenz von Bereichen einer Gewebeprobe (1), mit einer Prozesskammer (10) zur Aufnahme einer Gewebeprobe (1) in zumindest einem Prozessfluid (2) zur Entfernung lichtstreuender Strukturen in der Gewebeprobe (10), **dadurch gekennzeichnet**, dass die Vorrichtung
30 (100) eine Transparenzmessanordnung (13) zum Überwachen der optischen Transparenz der Gewebeprobe (1) zumindest während eines Klärungszeitraums,

in dem die Gewebeprobe (1) in die Prozesskammer (10) eingebracht ist und die Entfernung der lichtstreuenden Strukturen in der Gewebeprobe (1) vorgenommen wird, aufweist.

- 5 12. Vorrichtung, die zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10 eingerichtet ist.
13. Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, die ferner zumindest eine Steuer-
einheit (20) zum Ansteuern der Transparenzmessanordnung (13) und/oder eine
10 Auswerteeinheit zum Auswerten zumindest eines durch die Transparenzmessan-
ordnung (13) bereitgestellten Messsignals aufweist.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, die ferner strombeauf-
schlagbare Elektroden (14) innerhalb der Prozesskammer (10) und eine Strom-
15 quelle (141) zum Beaufschlagen der Elektroden (14) aufweist.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 14, die ferner Messmittel
zum Bestimmen zumindest einer physikalischen und/oder chemischen Eigen-
schaft der Gewebeprobe (1) und/oder des zumindest einen Prozessfluids
20 und/oder lagedefinierende Mittel (15) zum Anordnen der Gewebeprobe (1) in der
Prozesskammer (10) aufweist.

1/2

**Fig. 1**

2/2

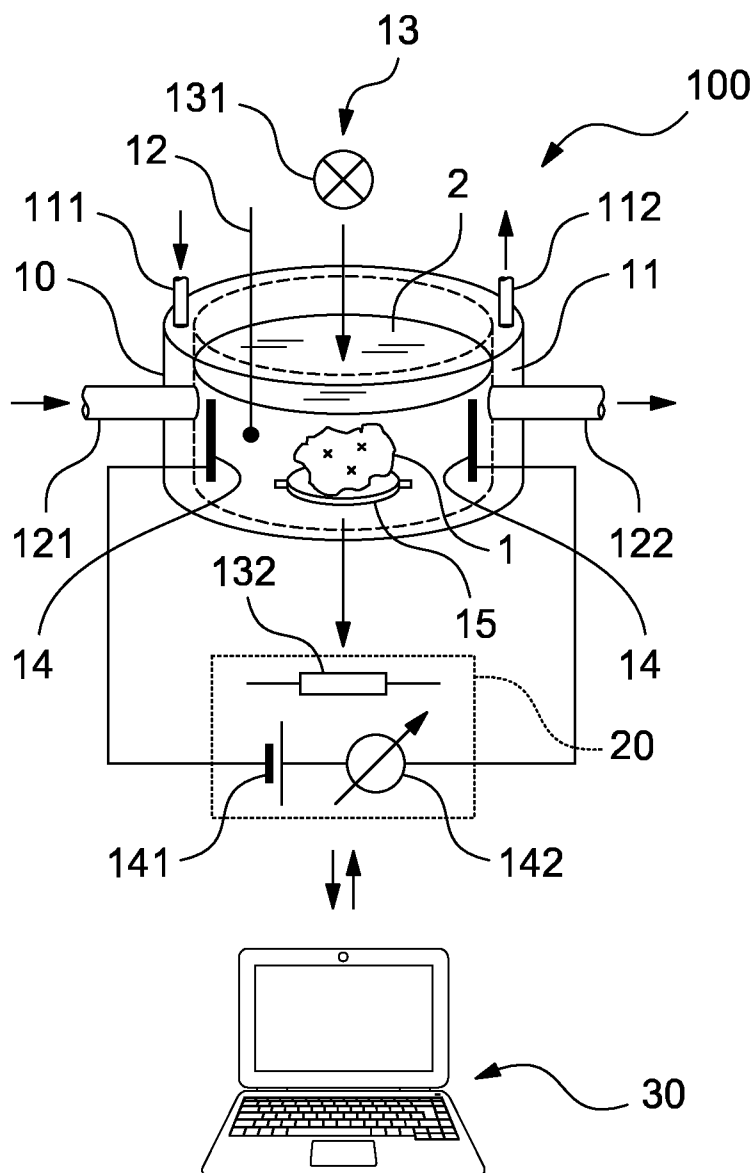


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/068045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61B5/00 A61N7/02 A61B18/14 A61B19/00
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)

A61B A61N

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, BIOSIS, EMBASE, FSTA, INSPEC, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/24454 A1 (NEMATI BABAK [US]) 4 May 2000 (2000-05-04)	1-3,6, 11-15
Y	page 1, paragraph 3 page 2, paragraph 2 page 4, paragraph 1-3 page 8, last paragraph page 9, paragraph 2-3 claims 1-5	4,5,7-10
X	US 2012/296238 A1 (CHERNOV BORIS [RU] ET AL) 22 November 2012 (2012-11-22)	1-3,6, 11-15
Y	paragraph [0012] paragraph [0015] paragraph [0018] paragraphs [0028] - [0030] paragraphs [0055] - [0058] ----- -/-	4,5,7-10



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

18 November 2014

Date of mailing of the international search report

25/11/2014

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

Michalitsch, Richard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/068045

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2 377 757 A (CHIANG ANN-SHYN [TW]) 22 January 2003 (2003-01-22) page 2, lines 20-22 page 4, last paragraph - page 5, paragraph 1 claims 1-8	4,5,7-10
X,P	----- US 2013/274837 A1 (NEMATİ BABAK [US]) 17 October 2013 (2013-10-17) paragraph [0008] paragraph [0037] paragraphs [0052], [0053] -----	1-3, 11-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/068045

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0024454	A1	04-05-2000	AT 548069 T 15-03-2012
		AU 753574 B2 24-10-2002	
		AU 6422899 A 15-05-2000	
		EP 1045717 A1 25-10-2000	
		US 6219575 B1 17-04-2001	
		US 2001008959 A1 19-07-2001	
		US 2001009984 A1 26-07-2001	
		US 2006178614 A1 10-08-2006	
		US 2012184947 A1 19-07-2012	
		WO 0024454 A1 04-05-2000	
US 2012296238	A1	22-11-2012	EP 2709549 A1 26-03-2014
			US 2012296238 A1 22-11-2012
			WO 2012158777 A1 22-11-2012
GB 2377757	A	22-01-2003	NONE
US 2013274837	A1	17-10-2013	NONE

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. A61B5/00 A61N7/02 A61B18/14 A61B19/00
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A61B A61N

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, BIOSIS, EMBASE, FSTA, INSPEC, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/24454 A1 (NEMATI BABAK [US]) 4. Mai 2000 (2000-05-04)	1-3,6, 11-15
Y	Seite 1, Absatz 3 Seite 2, Absatz 2 Seite 4, Absatz 1-3 Seite 8, letzter Absatz Seite 9, Absatz 2-3 Ansprüche 1-5	4,5,7-10
X	US 2012/296238 A1 (CHERNOV BORIS [RU] ET AL) 22. November 2012 (2012-11-22)	1-3,6, 11-15
Y	Absatz [0012] Absatz [0015] Absatz [0018] Absätze [0028] - [0030] Absätze [0055] - [0058] ----- -/-	4,5,7-10

☒ 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

18. November 2014

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25/11/2014

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

Michalitsch, Richard

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	GB 2 377 757 A (CHIANG ANN-SHYN [TW]) 22. Januar 2003 (2003-01-22) Seite 2, Zeilen 20-22 Seite 4, letzter Absatz - Seite 5, Absatz 1 Ansprüche 1-8 -----	4,5,7-10
X,P	US 2013/274837 A1 (NEMATI BABAK [US]) 17. Oktober 2013 (2013-10-17) Absatz [0008] Absatz [0037] Absätze [0052], [0053] -----	1-3, 11-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/068045

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0024454	A1	04-05-2000	AT 548069 T 15-03-2012
		AU 753574 B2 24-10-2002	
		AU 6422899 A 15-05-2000	
		EP 1045717 A1 25-10-2000	
		US 6219575 B1 17-04-2001	
		US 2001008959 A1 19-07-2001	
		US 2001009984 A1 26-07-2001	
		US 2006178614 A1 10-08-2006	
		US 2012184947 A1 19-07-2012	
		WO 0024454 A1 04-05-2000	
US 2012296238	A1	22-11-2012	EP 2709549 A1 26-03-2014
		US 2012296238 A1 22-11-2012	
		WO 2012158777 A1 22-11-2012	
GB 2377757	A	22-01-2003	KEINE
US 2013274837	A1	17-10-2013	KEINE

专利名称(译)	用于增加组织样本的区域的光学透明度的方法和设备		
公开(公告)号	EP3041403A1	公开(公告)日	2016-07-13
申请号	EP2014771792	申请日	2014-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	徕卡显微系统复合显微镜有限公司		
申请(专利权)人(译)	徕卡CMS GMBH		
当前申请(专利权)人(译)	徕卡CMS GMBH		
[标]发明人	SAGMULLER BERND		
发明人	SÄGMÜLLER, BERND		
IPC分类号	A61B5/00		
CPC分类号	G01N1/4044 G01N1/30 G01N1/31 G01N21/272 G01N21/47 G01N21/55 G01N21/59 G01N21/5907 G01N2001/4038 G01N2201/061 G01N2201/068		
代理机构(译)	BRADL约阿希姆		
优先权	102013216934 2013-08-26 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于增加组织样本 (1) 的区域的光学透明度的方法，其中将组织样本 (1) 放置在处理室 (10) 中并且用至少一种处理流体 (2) 渗透。处理室 (10)，并且其中移除组织样本 (1) 中的光散射结构。该方法包括至少在澄清时间段期间监测组织样本 (1) 的光学透明度，其中组织样本 (1) 被放置在处理室 (10) 中并且其中组织中的光散射结构通过与处理室 (10) 相关的光学透明度测量组件 (13) 去除样品 (1)。本发明还涉及用于执行该方法的设备 (100)。