



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104541153 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201380035488. 5

代理人 余明伟 郭婧婧

(22) 申请日 2013. 07. 02

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

1307338. 2 2013. 04. 23 GB

61/667, 384 2012. 07. 02 US

G01N 21/65(2006. 01)

A61B 5/00(2006. 01)

G01J 3/44(2006. 01)

A61B 6/00(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014. 12. 31

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2013/000273 2013. 07. 02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/007759 EN 2014. 01. 09

(71) 申请人 新加坡国立大学
地址 新加坡肯特岗路下段 21 号

(72) 发明人 黄志伟 何凯俞
马兹·西尔维斯特·博格霍尔特
郑伟 杨凯关
西亚马拉·杜莱潘点

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

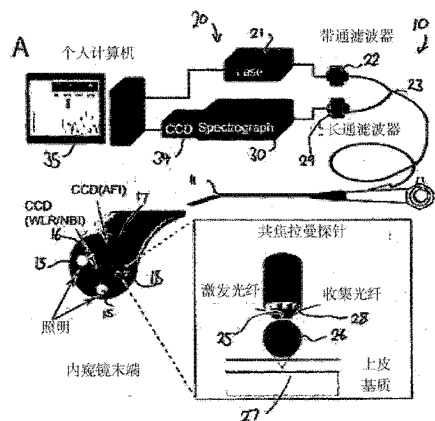
权利要求书3页 说明书24页 附图49页

(54) 发明名称

涉及利用光纤拉曼光谱的内窥镜进行实时癌症诊断的方法

(57) 摘要

本发明公开一种实现用于光纤拉曼光谱系统的定量分析的仪器独立测量的方法,该系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,该光纤探针将光从激光源发送光到目标,并且将散射光返回到光谱仪,该方法包括从激光源发送光到具有已知光谱的标准目标,记录来自标准目标的散射光的校准光谱,比较已知的光谱和校准系统,并且生成探针和/或探针系统传递函数,以及存储传递函数。本发明还提供了结合其它公开方法可选地执行实时诊断拉曼光谱的方法。



1. 一种用于癌症的光谱鉴定的计算机实施的方法,其特征在于,包括:
接收与组织相关联的至少一个光谱;
在使用所述光谱的模型中分析所述至少一个光谱以确定得分,其中所述得分指示所述组织是癌性的可能性;以及
输出所述得分。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述模型使用解释函数来生成,所述解释函数选自自由偏最小二乘判别分析、主成分分析线性判别分析、蚁群优化线性判别分析、分类和回归树、支持向量机和自适应增强组成的群组。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述至少一个光谱由拉曼光谱生成。
4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述分析模型中的至少一个光谱包括分析第一模型和第二模型中的至少一个光谱。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述模型基于组织来选择。
6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述得分指示所述组织是否正常、异常增生或瘤形成。
7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,分析所述至少一个光谱包括:
执行异常分析;以及
响应于确定所述至少一个光谱是异常的所述异常分析,抑制所述光谱。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,执行异常分析包括主成分分析。
9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,还包括指示音频发射装置发射音频信号,所述音频信号响应于所述异常分析,所述异常分析确定所述至少一个光谱为异常。
10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,还包括指示光谱仪获得至少一个附加光谱,所述至少一个附加光谱响应于所述异常分析,所述异常分析确定所述至少一个光谱为异常并接收所述至少一个附加光谱。
11. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,还包括指示音频发射装置发射音频信号,所述音频信号识别所述组织为正常的、异常增生或瘤形成。
12. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,与正常的、异常增生或瘤形成的每个相关联的所述音频信号是不同的。
13. 根据权利要求12所述的方法,其特征在于,与正常的、异常增生或瘤形成的每个相关联的所述音频信号还与异常光谱相关联的音频信号不同。
14. 一种校准光纤拉曼光谱系统的方法,其特征在于,
所述系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,所述光纤探针将光从所述激光源发送到目标,并且将散射光返回到所述光谱仪,
所述方法包括将光从所述激光源发送到具有已知光谱的标准目标,
记录来自所述标准目标的散射光的校准光谱,
比较所述已知光谱和校准系统,并且生成传递函数,以及
存储所述传递函数。
15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,包括记录多个光纤探针的每个的校准光谱,计算包括每个所述探针的系统的传递函数,并且将所述传递函数与对应探针相关联。
16. 根据权利要求14或15所述的方法,其特征在于,包括随后照射测试对象、记录光谱

并且根据存储的传递函数校准所述光谱的步骤。

17. 根据权利要求 14 ~ 16 中任一项所述的方法,其特征在于,所述光谱仪具有相关联的光谱仪传递函数,所述探针具有相关联的探针传递函数,所述传递函数是光谱仪传递函数和探针传递函数中的一种函数。

18. 根据权利要求 14 ~ 17 中任一项所述的方法,其特征在于,包括:在主光谱仪系统上计算主光纤探针的第一传递函数、次级光纤探针的第二传递函数、以及计算基于所述第一传递函数和第二传递函数的校准函数。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其特征在于,包括将所述校准函数与所述次级光纤探针相关联。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的方法,其特征在于,包括:在次级光谱仪系统上使用所述主光纤探针、生成次级系统传递函数、以及存储所述次级系统传递函数。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其特征在于,包括使用具有所述次级光谱仪系统的次级光纤探针,以及根据所述校准函数修正存储的次级系统传递函数。

22. 根据权利要求 18 ~ 21 中任一项所述的方法,其特征在于,包括根据所述主光谱仪系统执行所述次级光谱仪系统的波长轴校准的初始步骤。

23. 一种操作拉曼光谱系统的方法,其特征在于,

所述系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,所述光纤探针将光从所述激光源发送到目标,并且将散射光返回到所述光谱仪,

所述方法包括从所述激光源发送光到具有已知光谱的目标,

记录来自所述目标的散射光的光谱,以及

根据存储的传递函数修正记录的光谱。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其特征在于,所述存储的传递函数与所述光谱仪和所述光纤探针对应。

25. 根据权利要求 23 所述的方法,其特征在于,所述存储的传递函数与所述光谱仪和主光纤探针对应,所述方法还包括根据与所述光纤探针相关联的存储校准函数来修正存储的传递函数。

26. 一种拉曼光谱系统,其特征在于,包括激光源、光谱仪、光纤探针和存储的传递函数,所述光纤探针将光从所述激光源发送到目标并且将散射光返回到所述光谱仪,

所述系统可操作将光从所述激光源发送到具有已知光谱的目标,

记录来自所述目标的散射光的光谱,以及

根据所述存储的传递函数修正记录的光谱。

27. 根据权利要求 26 所述的系统,其特征在于,所述存储的传递函数与所述光谱仪和所述光纤探针对应。

28. 根据权利要求 26 所述的系统,其特征在于,所述存储的传递函数与所述光谱仪和主光纤探针对应,并且所述方法还包括根据与所述光纤探针相关联的存储的校准函数来修正存储的传递函数。

29. 一种预测在光纤拉曼光谱系统中发送的激光功率的方法,其特征在于,

所述系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,所述光纤探针将光从所述激光源发送到目标,并且将散射光返回到所述光谱仪,

所述方法包括从所述激光源发送光到多个目标，

对于每个测试目标，测量来自所述激光源的光的发送功率、和所述光谱仪处散射光的光谱，

执行所述捕捉光谱的多变量分析，测量的发送功率作为因变量，以及存储所得的模型。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其特征在于，包括如下步骤，

发送激光到测试目标，

向所述模型供应捕捉光谱，以及

计算所述发送功率的估量。

31. 一种从具有光纤探针的光纤拉曼光谱系统减去背景信号的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

a) 存储背景光谱，

b) 接收测试光谱，

c) 使用一个或多个参考峰来估计背景影响，

d) 基于估计的背景影响，将所述背景光谱与校准因子相乘，并将其从所述测试光谱减去，

e) 检查所述测试光谱余留的背景影响，以及

f) 如果所述背景贡献可忽略不计，则输出所述测试光谱，否则重复步骤 (c) 到 (e)。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其特征在于，所述一个或多个参考峰包括与所述光纤探针中二氧化硅或蓝宝石对应的一个或多个峰。

33. 根据紧随权利要求 1 至 13 中任一项方法的权利要求 14 至 18 中任一项所述的校准方法。

涉及利用光纤拉曼光谱的内窥镜进行实时癌症诊断的方法

[0001] 本申请要求 2012 年 7 月 2 日提交的美国临时申请 61/667,384 和在 2013 年 4 月 23 日提交的 GB 申请 No. 1307338.2 的权益,其两者通过引用整体在此并入此案以供用于所有目的之参考。

技术领域

[0002] 本公开涉及用于在内窥镜实时癌症诊断的在线生物光谱软件平台,和用于在光纤拉曼光谱中用于定量分析的与仪器无关的测量方法。

背景技术

[0003] 拉曼光谱术是使用单色光的非弹性或拉曼散射的技术。传统地,单色光源是在可见或近红外(“NIR”)范围中的激光。散射光子的能量响应于与在照射材料中的振动模式或激发的相互作用,向上或向下移动,改变散射光子的波长。因此,来自散射光的光谱可提供关于散射材料的信息。

[0004] NIR 拉曼光谱术已知为用于在若干器官中体内癌前病变和癌性细胞和组织的表征和诊断。该技术是理想的,因为它可以无创或微创,不需要活组织检查或组织的其它去除。已知的是使用在两个波长范围中的 NIR 拉曼光谱。第一个是所谓的指纹(“FP”)范围,其中由于例如来自在用于组织表征和诊断的该光谱区域中包含的蛋白质、DNA 和脂质内容的高度特异性生物分子信息的丰富度,波长数从 800 到 1800 cm^{-1} 。该波长范围的缺点在于当与通常使用的 785nm 激光源一起使用时,可生成强烈的组织自发荧光背景信号。此外,在探针使用光纤时,拉曼信号从在光纤中的熔融二氧化硅散射。特别地,在电荷耦合器件(“CCD”)用于测量散射光谱时,自发荧光信号可使 CCD 饱和并且与在该波长范围中固有的非常弱的拉曼信号的检测干扰。

[0005] 采用光纤拉曼光谱术作为一种技术的另一个问题在于仪器的标准化。光纤拉曼光谱技术已经主要限制为单个系统,并且尚未有转用于多中心临床试验或常规医疗诊断中的相关尝试。这主要是因为拉曼光谱仪仪器通常存在差异(即光学、响应函数、对准、通量等)并且一般产生非常不同的拉曼光谱。此外,光纤拉曼探针的使用寿命有限并且必须定期更换或互换。不幸地,使用不同的光纤探针采集的拉曼数据无法进行比较,因为每个光纤探针具有其本身的独特背景,以及与不同的透射光谱特性相关联。不同的透射特性显著地使光谱强度失真,使采用不同光纤探针获得的组织拉曼光谱不可比较。因此,在主临床平台上开发的多变量诊断算法不能施加到次级临床平台。特别地,组织拉曼强度的定量测量是在光纤生物医学拉曼应用中最具挑战性的问题之一。仪器/光纤探针独立强度校准和标准化对于在生物医学中光纤拉曼光谱的全球使用的实现至关重要。出于这个原因,使用“总”探针(‘master’ probe)构建的多变量统计诊断模型不能施加到采用“从属”探针(‘slave’ probe)测量的光谱。为了使得拉曼技术成为用于在全球范围的癌症筛查的广泛工具,有必要将拉曼光谱仪和光纤探针这两者进行标准化,特别是在生物医学应用中。大多数的报道研究已经聚焦在用于不具有光纤探针的简单化学混合物的测量的跨拉曼光谱仪

标准化。一般简单化学混合物的拉曼光谱不能与异种生物组织样本的光纤拉曼光谱比较。

[0006] 采用仪器间的标准化结果的进一步问题在于与激光激发功率相关联的光谱变化。传统地,拉曼光谱的标准化,其保留了通常光谱的形状,但这消除了绝对定量光谱特性。已知的是尝试监测在光纤拉曼探针中传送的激光功率,例如通过在光纤尖端中嵌入钻石或在激光路径中定位聚合物盖作为参考来进行监测。然而,这些解决方案不令人满意,并且可能导致在所需光谱区域中的干涉。

[0007] 在使用用于体内癌症和癌前病变条件诊断的光学光谱技术(包括反射荧光和拉曼)中的其它问题在于数据分析大多限于后处理和离线算法开发。对于内窥镜分析正是如此,因为在内窥镜期间收集的大量光谱是异常值。具有允许用于内窥镜的实时诊断的系统将是有益的。

发明内容

[0008] 根据第一方面,本发明提供了校准光纤拉曼光谱系统的方法,该系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,该光纤探针将光从激光源发送到目标,并将散射光返回到光谱仪;该方法包括从激光源发送光到具有已知光谱的标准目标,记录来自标准目标的散射光的校准光谱,比较已知的光谱和校准系统,并且生成传递函数,以及存储传递函数。

[0009] 本方法还可包括随后照射测试对象、记录光谱并且根据存储的传递函数校准光谱的步骤。

[0010] 该方法可包括记录用于多个光纤探针的每个的记录校准光谱,计算用于包括每个所述探针的系统的传递函数,并且将传递函数与对应探针相关联。

[0011] 所述光谱仪具有相关联的光谱仪传递函数,所述探针可具有相关联的探针传递函数,传递函数可以是光谱仪传递函数和探针传递函数中的一种函数。

[0012] 该方法可包括在主光谱仪系统上计算主光纤探针的第一传递函数,和次级光纤探针的第二传递函数,并且基于第一传递函数和第二传递函数计算(探针间)校准函数。

[0013] 该方法可包括将校准函数与次级光纤探针相关联。

[0014] 该方法可包括在次级光谱仪系统上使用主光纤探针,生成次级系统传递函数,以及存储所述次级系统传递函数。

[0015] 该方法可包括使用具有次级光谱仪系统的次级光纤探针,以及根据校准函数修正存储的次级系统传递函数。

[0016] 该方法可包括根据主光谱仪系统执行次级光谱仪系统的波长轴校准的初始步骤。

[0017] 根据第二方面,本发明提供了操作拉曼光谱仪系统的方法,该系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,所述光纤探针将光从激光源发送到目标,并且将散射光返回到光谱仪;该方法包括从激光源发送光到具有已知光谱的目标,记录来自目标的散射光的光谱,以及根据存储的传递函数修正记录光谱。

[0018] 所述存储的传递函数可将光谱仪和光纤探针相关联。

[0019] 所述存储的传递函数可将光谱仪和主光纤探针相关联,并且该方法还可包括根据与光纤探针相关联的存储校准函数来修正存储的传递函数。

[0020] 根据第三方面,本发明提供了一种拉曼光谱系统,其包括激光源、光谱仪和光纤探针,以及存储的传递函数;所述光纤探针将光从激光源发送到目标并且将散射光返回到光

谱仪；,该系统可操作地用于从激光源发送光到具有已知光谱的目标,记录来自目标的散射光的光谱,以及根据存储的传递函数修正记录光谱。

[0021] 所述存储的传递函数可将光谱仪和光纤探针相关联。

[0022] 所述存储的传递函数可将光谱仪和主光纤探针相关联,并且该方法还可包括根据与光纤探针相关联的存储校准函数来修正存储的传递函数。

[0023] 根据第四方面,本发明提供了估计拉曼光谱仪系统中发送的激光功率的方法,该系统包括激光源、光谱仪和光纤探针,该光纤探针将光从激光源发送到目标,并且将散射光返回到光谱仪;该方法包括从激光源发送光到多个目标,对于每个测试目标,测量来自激光源的光的发送功率和在光谱仪处散射光的光谱,执行捕捉光谱的多变量分析,其中测量的发送功率用作为因变量,,以及存储所得的模型。

[0024] 该方法可包括如下步骤:发送激光到测试目标,向模型供应捕捉的光谱,以及计算发送功率的估值。

[0025] 根据第五方面,本发明提供了从具有光纤探针的光纤拉曼光谱系统减去背景信号的方法,该方法包括如下步骤:

[0026] a) 存储背景光谱,

[0027] b) 接收测试光谱,

[0028] c) 使用一个或多个参考峰来估计背景影响,

[0029] d) 基于估计的背景影响将背景光谱与校准因子相乘,并将其从测试光谱减去,

[0030] e) 检查测试光谱余留的背景影响,以及

[0031] f) 如果背景影响可忽略不计,则输出测试光谱,否则重复步骤(c)到(e)。

[0032] 所述一个或多个参考峰可包括与光纤探针中的二氧化硅或蓝宝石对应的一个或多个峰。

[0033] 根据第六方面,本发明提供了在内窥镜期间使用拉曼光谱用于实时诊断的计算机实施方法。该方法包括接收与组织相关联的至少一个光谱;在使用光谱的模型中分析至少一个光谱以确定得分,其中所述得分指示组织是癌性的可能性;以及输出所述得分。

[0034] 在一些实施例中,模型使用解读函数来生成,所述解读函数选自自由偏最小二乘判别分析、主成分分析线性判别分析、蚁群优化线性判别分析、分类和回归树、支持向量机和自适应增强组成的群组。

[0035] 在一些实施例中,所述至少一个光谱由拉曼光谱生成。分析模型中的至少一个光谱可包括分析在第一模型和第二模型中的至少一个光谱。在一些实施例中所述模型基于分析的组织来选择。在一些实施例中,得分指示组织是否为正常、异常增生或瘤形成。

[0036] 在某些方面中,分析至少一个光谱包括:执行异常分析;响应于确定至少一个光谱是异常的异常分析,抑制光谱。执行异常分析可包括主成分分析。

[0037] 在某些方面中,音频发射装置响应于确定至少一个光谱是异常的异常分析,来发射音频信号。响应于确定至少一个光谱是异常的异常分析来获得至少一个附加光谱,该获得的至少一个附加光谱由系统接收以用于分析。

[0038] 在一些实施例中,音频发射装置发射识别组织为正常的、异常增生或瘤形成的音频信号。在一些实施例中,与正常的、异常增生或瘤形成的每个相关联的音频信号是不同的。

[0039] 在一些实施例中,诊断在内窥镜程序期间发生。

[0040] 本发明还提供了用于执行计算机实施方法的系统以及具有在其上用于执行计算机实施方法的指令的非暂时性计算机可读介质。

附图说明

[0041] 本发明所公开的系统和方法的实施例通过仅参考附图的示例来描述。

[0042] 图 1 是根据一个实施例的拉曼光谱系统的示意图。

[0043] 图 1a 是在更大比例上图 1 的内窥镜端部视图。

[0044] 图 1b 是更详细的图 1a 的内窥镜拉曼探针的视图。

[0045] 图 2 是示出测量的荧光光谱与参考标准的比较的曲线图。该校准函数也被示出。

[0046] 图 3 是第一校准方法的示意图。

[0047] 图 4a 是示出作为第一校准方法使用的第一过程的流程图。

[0048] 图 4b 是示出作为第一校准方法使用的第二过程的第一部分的流程图。

[0049] 图 4c 是示出作为第一校准方法使用的第二过程的第二部分的流程图。

[0050] 图 5 是示出在主光谱仪和次级光谱仪之间氩气 / 汞灯的波长对准的曲线图。

[0051] 图 6 是示出使用第二校准方法的主光谱仪和次级光谱仪的光谱校准的图。

[0052] 图 7a 是示出作为第一校准方法使用的第一过程的流程图。

[0053] 图 7b 是示出作为第二校准方法使用的第二过程的第一部分的流程图。

[0054] 图 7c 是示出作为第二校准方法使用的第二过程的第二部分的流程图。

[0055] 图 8 是示出采用主探针和从属探针和探针校准传递函数测量的荧光标准的曲线图。

[0056] 图 9a 是分别比较使用主探针和从属探针的未校准的主光谱仪和次级光谱仪的组织拉曼光谱的曲线图。

[0057] 图 9b 是在使用第一校准方法的重新校准之后,分别来自使用主探针和从属探针的主光谱仪和次级光谱仪的组织拉曼光谱的曲线图。

[0058] 图 9c 是在使用第二校准方法的重新校准之后,分别来自使用主探针和从属探针的主光谱仪和次级光谱仪的光谱的曲线图。

[0059] 图 10 是在校准之前和之后在来自胃部的体内组织拉曼光谱上的主成分分析分散点图。

[0060] 图 11 是示出由于在拉曼光谱中的光纤探针导致的背景光谱峰的曲线图。

[0061] 图 12 是示出采用激发激光功率的拉曼光谱变化的曲线图。

[0062] 图 13a 是示出生成用于预测激光功率的模型的方法的流程图。

[0063] 图 13b 是示出预测激光功率的方法的流程图,

[0064] 图 14a 是示出用于任何数量的包括潜在变量的均方根误差的曲线图。

[0065] 图 14b 示出用于图 10 的方法的潜在变量的负载因子和回归因子,

[0066] 图 15 是示出在体内测试对象中测量激光功率对预测激光功率的的曲线图。

[0067] 图 16 是示出减去探针背景信号的方法的流程图。

[0068] 图 17 是示出从手掌和光纤二氧化硅和蓝宝石背景接收的光谱的曲线图。

[0069] 图 18 是比较图 16 的拉曼光谱和在背景消除之后的光谱的曲线图。

- [0070] 图 19 是示出方法组合的流程图。
- [0071] 图 20 是用于根据一个实施例的实时癌症诊断的光谱采集和处理流程的系统的架构图。
- [0072] 图 21 是示出用于根据一个实施例的光谱采集和处理流程的示意图的流程图。
- [0073] 图 22A 和 22B 是用于使用根据两个实施例的实时癌症诊断的图形用户界面 (GUI)。
- [0074] 图 23 是从 305 个胃部患者采集的正常 ($n = 2465$) 和癌症 ($n = 283$) 胃部组织的体内平均拉曼光谱。
- [0075] 图 24 示出从光谱训练数据库计算的主成分 (PC) 负荷。
- [0076] 图 25 是两个诊断显著的 PC 计分 (PC1VS PC2) 的散射点图。
- [0077] 图 26 是展示用于从 10 个预期癌症样本采集的 105 个拉曼光谱 (45 个正常, 30 个癌症, 30 个异常) 的 Hotelling' s T^2 与 Q- 残差。
- [0078] 图 27 是基于与留一交叉验证一起的 PLS-DA 建模, 属于预期正常 ($n = 45$) 和癌症 ($n = 30$) 胃部组织的后验概率值的散射点图。
- [0079] 图 28 示出从用于预期预测的光谱数据库计算的受试者工作特征曲线 (ROC) 以及用于正常和癌症胃部组织预期预测的曲线。
- [0080] 图 29 示出通过使用不同的 785-nm 激光激发功率 (即 10mW、30mW 和 60mW) 在内唇的体内组织拉曼光谱 $\pm 1SD$ 的减去自体荧光和强度校准平均值。
- [0081] 图 30a 示出基于留一交叉验证以及对数据的线性拟合, 在实际的和使用 PLS 回归模型的预测激光激发功率之间的关系。
- [0082] 图 30b 示出基于独立验证, 在实际的和使用 PLS 回归的预测激光激发功率之间的关系。
- [0083] 图 31 示出用在 60mW 激光激发功率处测量的制备的不同浓度的 (即以重量计 20%、25%、30%、35%、40%、45% 和 50%) 明胶组织模型 (phantom) 的拉曼光谱。
- [0084] 图 32 示出在采用预测激光功率的校准之后在实际的和在组织模型中预测的明胶浓度之间的相关关系。
- [0085] 图 33 示出在临床内窥镜检查期间从咽隐窝采用 0.1s 采集的代表性体内原始拉曼光谱。图 33 的插图是在去除强度自发荧光背景之后的处理组织拉曼光谱。
- [0086] 图 34 示出后鼻咽部 (PN) ($n = 521$)、咽隐窝 (FOR) ($n = 157$) 和喉头声带 (LVC) ($n = 196$) 的体内 (主体间) 平均拉曼光谱 ± 1 标准偏差 (SD)。应注意的是, 平均拉曼光谱垂直移动以便更好地观察。同样示出了在白光反射率 (WLR) 和窄带 (NB) 成像引导下来自后鼻咽部 (上)、咽隐窝 (中) 和喉头声带 (下) 的体内光纤拉曼内窥镜采集。
- [0087] 图 35 示出 PN ($n = 18$)、FOR ($n = 18$) 和 LVC ($n = 17$) 的体内 (主体内) 平均拉曼光谱 $\pm 1SD$ 。应注意的是, 平均拉曼光谱垂直移动以便更好地观察。
- [0088] 图 36 示出不同解剖组织类型 (主体间) 的差异光谱 $\pm 1SD$ 的比较: [后鼻咽部 (PN)-喉声带 (LVC)]; [后鼻咽部 (PN)-咽隐窝 (FOR)] 和 [喉声带 (LVC)-咽隐窝 (FOR)]。
- [0089] 图 37 示出来自人体体液的 (鼻涕、唾液和血液) 的可能混杂因素的体内拉曼光谱。
- [0090] 图 38 示出分辨在头部和颈部中不同组织之间生物分子变异的 PC 负荷, 表示光谱方差 57.41% (PC1 :22.86% ;PC2:16.16% ;PC3:8.13% ;PC4:6.22% ;PC5:4.05%) 的总

计。

[0091] 图 39 提供用于不同组织类型 (即 PN、FOR 和 LVC) 的 5 个 PCA 计分的方框图。在每个槽口箱内的线表示中位数,但箱子的下边界和上边界分别指示第一 (25.0%百分位数) 和第三 (75.0%百分位数) 四分位数。误差条 (须状物) 表示 1.5 倍四分范围。p 值同样在不同的组织类型之间给出。

[0092] 图 40A 示出在临床内窥镜检查期间采集的鳞状上皮层 (n = 165)、柱状上皮层 (n = 907)、巴雷特食管 (n = 318)、高度异型增生 (n = 77) 的平均体内共焦拉曼光谱。

[0093] 图 40B-E 示出 B) 与测量组织部位对应的代表性组织学切片 (苏木精和曙红 (H&E) 染色)。鳞状上皮层;(C) 在缺乏杯状细胞情况下的柱状层食管 (n = 907), ×200 ;(D) Barrett' s 食管,其中正常的复层鳞状上皮由包含杯状细胞的肠化生上皮取代, ×200 ;(E) 示出架构和细胞学异型两者以及具有分支和乳突状形成、细胞学 pleomorphism 和极性损失的高度异型增生, ×100。

[0094] 图 41A 示出使用共焦拉曼内窥镜技术、属于“正常”柱状上皮层 (CLE), (ii) “低风险”肠化生 (IM) (iii) ‘高风险’高度异型增生 (HGD) 的预测后验概率的二维三角图。

[0095] 图 41B 示出 ‘正常’ CLE, (ii) ‘低风险’ IM (iii) ‘高风险’ HGD 的二分法判别 (dichotomous discriminations) 的受试者工作特征曲线 (ROC) 曲线。在 ROC 曲线下方的面积 (AUC) 分别是 0.88、0.84 和 0.90。

具体实施方式

[0096] 本文所提供的是用于实现在内窥镜处在不同的器官 (例如,胃肠道 (胃、食道、结肠)、膀胱、肺、口腔、鼻咽、喉、子宫颈、肝、皮肤等) 中肿瘤性病变的实时检测的生物学光谱 (即,反射率、荧光和拉曼光谱) 的在线系统和方法。诊断方法整合了激发源的同步、积分时间调整、数据采集、预处理、异常分析和概率多变量诊断 (即,偏最小二乘 - 判别分析 (PLS-DA)、主成分分析 (PCA) - 线性判别分析 (LDA)、蚁群优化 (ACO) - LDA、分类和回归树 (CART)、支持向量机 (SVM)、自适应增强 (AdaBoost) 等), 包括基于不同器官的全面光谱数据库 (即,拉曼、荧光、反射率) 的多级诊断。

[0097] 在一个实施例中,所公开的系统和方法结合了在线诊断框架与最近开发的用于在内窥镜处在上消化道中癌前病变和癌症的早期诊断和检测的多模态图像引导 (WLR/NBI/AFI) 的拉曼光谱平台。组织拉曼光谱的积累和具有 0.5 秒预定义上限的积分时间的自动比例缩放允许具有改进的 SNR 的体内组织光谱的即时采集,同时防止 CCD 信号饱和。这是对于内窥镜诊断特别重要,其中自体荧光强度在由组织中不同内生荧光可能导致的不同解剖区域 (例如,在胃部中的胃窦和胃体,肺中的支气管) 之间显著改变。

[0098] 现在详细参考具体的附图,需要强调的是所示的细节是通过举例的方式,并且为了对优选实施例进行说明性讨论的目的,并且呈现出为了提供被认为是所公开的系统和方法的最有用和最容易理解描述。在这点上,没有尝试来比对于所公开系统和方法的基本理解所必要的公开所更为详细结构细节,采用附图的描述使得对于本领域技术人员而言,所公开的系统和方法的几种形式如何在时间中进行实施,是显而易见的。

[0099] 在详细解释所公开的系统和方法的至少一个实施例之前,应当理解的是,本公开并不将其应用限于在下面的描述中或在附图中示出的组件构造和布置的细节。所公开的系

统和方法适用于其它实施例或以各种方式实践或执行。此外,可以理解的是本文使用的措辞和术语是为了描述的目的,而不应被视为限制。

[0100] 现在参考图 1,诊断仪器包括根据一个实施例的内窥镜系统,在 10 处示出。内窥镜本身在 11 处示出,并且内窥镜 11 的测量头通常在图 1a 中示出。为提供引导和被测试区域的可见查看,内窥镜 11 装有合适的视频系统。来自氙灯光源的光被发送到在内窥镜 12 末端中的照明窗口 15。响应于白光反射成像、窄带成像或自发荧光成像的 CCD 16 和 17 接收反射光并发送视频数据,以允许所测试组织的可视检查和引导内窥镜至期望的位置。共焦拉曼探头在 18 处显示,并且在图 1b 中更详细。

[0101] 拉曼光谱系统通常在 20 处示出。在具有大约 785nm 的输出波长的二极管激光器的本示例中,单色激光源在 21 处示出。来自激光二极管 21 的光通过近端带通滤波器 22,其包括具有 $\pm 2.5\text{nm}$ 的半宽度而以在 785nm 处为中心的窄带通滤波器。该光通过穿过耦合件 23 而进入作为光纤束一部分的激发光纤 25 中。激发光纤 25 具有 $200\ \mu\text{m}$ 的直径和 0.22 的数值孔径 (numerical aperture, 'NA')。由激发光纤 25 传输的光进入在内窥镜 11 端部的球透镜 26,在本实施例中,包括具有约 1.0mm 直径和折射率 $n = 1.77$ 的蓝宝石球透镜。如在图 1b 中所示,从激发光纤 25 传输的光在球透镜 26 内被内部反射。在球透镜与被测试的组织接触时,如这里在 27 处示出,来自激发光纤 25 的透射光的至少一部分经过在组织 27 内的拉曼散射到约 $140\ \mu\text{m}$ 的深度。散射光再次在球透镜 26 中被内部反射,并在也提供为光纤束一部分的多个收集光纤 28 中接收。在本示例中 26 个 $100\ \mu\text{m}$ 的收集光纤被使用,其 NA 值为 0.22。收集光纤 28 可以任何适当的结构进行安置,例如在包围激发光纤 25 的圆形布置中。

[0102] 由收集光纤 28 返回的收集散射光穿过长波通内联收集滤波器 29,其类似地具有在约 800nm 处的截断值 (cutoff)。所述蓝宝石球透镜 26,激发和收集光纤 25、28,带通滤波器 22、长波通滤波器 29 的配置提供了用于从组织 27 选择性地收集反向散射的拉曼光子的好系统。

[0103] 散射返回光然后在光谱仪 30 处分开,并且所得光谱在感光阵列 34 处成像,在本示例中是电荷耦合器件 ("CCD")。在 35 处示出的计算机控制系统的操作、处理并存储光谱和控制数据,并且提供结果和数据给用户。

[0104] 在一个实施例中,计算机 35 包括至少一个耦合到芯片组的处理器。也耦合到芯片组的是内存、存储装置、键盘、图形适配器、指向装置、声音发射装置和网络适配器。显示器耦合到图形适配器。在一个实施例中,芯片组的功能由内存控制器集线器和 I/O 控制器集线器提供。在另一个实施例中,内存直接耦合到处理器,而不是芯片组。

[0105] 存储装置是能够保持数据的任何装置,例如硬盘驱动器、压缩光盘只读内存 (CD-ROM)、DVD 或固态存储器装置。所述存储器保持由处理器使用的指令和数据。指向装置可以是鼠标、轨迹球,或其它类型的指示装置,并且与键盘组合使用以输入数据到计算机系统中。图形适配器显示图像和在显示器上的其它信息。网络适配器耦合计算机系统到广域网或局域网。

[0106] 如本领域已知的,计算机 35 可具有除前面描述的不同和 / 或其它组件。此外,计算机可以缺少某些组件。另外,该存储装置可以是本地和 / 或远程计算机 (诸如在存储区域网 (SAN) 内实施)。

[0107] 如本领域已知的,该计算机适于执行用于提供本文所描述的功能性的计算机程序模块。如本文所使用的,术语“模块”是指用于提供特定功能性的计算机程序逻辑。因此,模块可以在硬件、固件和/或软件中来实现。在一个实施例中,程序模块被存储在存储装置上,加载到内存中,并且由处理器执行。

[0108] 本文这里所描述的实体的实施例可以包括除了在此描述的模块的其它和/或不同的模块。此外,归属于模块的功能性可以通过在其它实施例中其它或不同的模块来执行。此外,为了清楚和方便性,本说明书中偶尔省略了术语“模块”。

[0109] 计算机 35 还对光谱数据执行预处理。因为测量组织的拉曼光谱基本上被组织的自体荧光背景遮蔽,所以体内组织的拉曼光谱的预处理有必要提取弱拉曼信号。从体内组织测量的原始拉曼光谱代表了弱拉曼信号、强烈的自体荧光背景和噪声的组合。光谱被首先归一化成积分时间和激光功率。光谱然后使用一阶的 Savitzky-Golay 平滑滤波器(3 个像素的窗口宽度)平滑化以减少噪声。五阶多项式被发现对于拟合在噪声平滑光谱中的自体荧光背景是最优的,并且随后这个多项式从原始光谱中减去,以单独产生组织的拉曼光谱。计算机 35 还可以包括用于癌前病变和癌症检测的诊断算法。

[0110] 光谱仪和光纤探针校准

[0111] 已知的是,不同的光谱仪将具有不同的传递函数,即:即使在使用相同的源进行照射时,也会在光谱内呈现出不同的强度变化。如在图 2 中所示,其示出的是来自标准源的光谱。在本示例中的标准源是指:当被激光,如激光源 2,激发时,能够发射出已知荧光光谱的荧光标准目标。所述荧光标准目标必须是一致和稳定的,并在激光激发下(例如 785nm)发射宽荧光光谱。随着时间的推移,荧光光谱必须是稳定的,并且有效地表征在感兴趣的整个光谱区域上(例如, 400cm^{-1} - 1800cm^{-1} , 2000cm^{-1} - 3800cm^{-1})的光谱透射特性。一个示例是铬掺杂的玻璃。从两个光谱仪所得的光谱可以看出,这是明显不同的。为了补偿光谱仪响应或传递函数,已知的是施加校准函数,所述校准函数能够校准从光谱仪接收的光谱。示例和校准函数在图 2 中示出,当施加到光谱仪的对应光谱时,这将使光谱带到具有已知标准光谱的线中。

[0112] 使用荧光标准源,传递函数,即:光谱仪的波长相关响应可由如下给出:

$$[0113] \quad F(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T(\lambda)}$$

[0114] (方程式 1) 其中 $F(\lambda)$ 是校正的荧光标准光谱, $S(\lambda)$ 是荧光标准源的测量光谱,并且 $T(\lambda)$ 是光谱仪的传递函数。因此,如 $T(\lambda)$ 是已知的,新样本 $R(\lambda)$ 的正确校准的拉曼光谱由如下计算:

$$[0115] \quad R(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T(\lambda)}$$

[0116] (方程式 2),其中 $S(\lambda)$ 是测量样本光谱。

[0117] 传递函数 $T(\lambda)$ 是光谱仪传递函数 $T_s(\lambda)$ 和探针传递函数 $T_p(\lambda)$ 两者的函数。方程式 2 可因此写为

$$[0118] \quad R(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T_s(\lambda) T_p(\lambda)}$$

[0119] (方程式 3)。因为光纤探针是可更换的并且可以被消耗,所以将显而易见的是当具有新探针传递函数 T_p 的新探针插入时,系统的总体传递函数将改变。

[0120] 现在参考图 3,主要的或主光谱仪在 50 处示出,并且次级的或从属光谱仪在 51 处示出。光谱仪 50、51 每个具有与在图 1 中示出的配置类似的配置,但可以具有不同的光纤探针和光谱特性。理想情况下,控制每个光谱仪的个人计算机 35 使用程序中的通用库以提供对该系统及数据处理的控制,并且主要和次级光谱仪 50、51 的特性一致的特性是令人满意的。在本示例中,主光谱仪 50 与主要或主探针 52 相关联,并且次级光谱仪 51 与在 53a、53a、53b 处示出的多个次级或从属探针相关联。在每一种情况下,参考在 54 处图解示出的标准荧光光源来执行校准。

[0121] 校准的第一种方法在图 4a 中示出。在步骤 60 处,根据主光谱仪对次级光谱仪进行波长校准。在这种情况下,次级光谱仪 51 的波长轴校准是通过,例如使用氙气汞光谱灯或具有确定光谱线的化学样本来执行,并且接下来执行使用线性内插的像素分辨率匹配以确保次级光谱仪的轴的尺寸与主光谱仪的轴的尺寸匹配。该校准的结果在图 5 中示出,其中来自主要和次级光谱仪 50、51 的光谱示出了精确对齐的灯的光谱线。在步骤 61 处,使用荧光光源 54 对于第二光谱仪和探针 53a 执行校准。以与图 2 的图标类似的方式,光谱将从荧光光源记录,然后计算传递函数以将测量的光谱带到具有已知光谱的线中,并且通过例如个人计算机 35 来存储光谱。在步骤 62 处,光谱仪 51 后续可用于体内拉曼测试或其它方式,并且测量的拉曼光谱可以使用在步骤 61 处记录的校准函数来校正。

[0122] 当探针 53a 被丢弃并期望对新对象执行测试时,更换的探针 53b 可被取代,在这种情况下图 4a 的方法是重复的。

[0123] 如在图 4b 和 4c 中示出的替代过程中,多个校准函数可以首先记录用于次级光谱仪和多个次级探针。在图 4b 中的步骤 60 处,如在图 4a 中,次级光谱仪 51 被校准,以使其与主光谱仪 60 一致。在步骤 61 处,测量用于次级探针 53a 的校准函数,并在步骤 63 处该校准函数以某种方式(例如,通过将校准函数保存为用与次级探针 53a 对应的参考标记来标签的计算机文件 56a)来进行存储并且与探针 53a 相关联。如箭头 64 所示,这个过程然后被重复用于任何数目的探针 53b, ..., 53n 以提供探针的储存或储备。如在图 4c 中所示,当需要使用光谱仪 51 执行测试时,在步骤 60 处光谱仪根据如上所述的主光谱仪 50 来校准。在步骤 65 处,探针 53n 安装在系统上,并且相应的存储传递函数 56n 被检索。在步骤 66 处,使用次级光谱仪 51 的测试可被执行,并使用检索的校准函数 56n 来进行校准。

[0124] 替代方法参考图 6 示出,其中从属或次级探针 53a, ..., 53n 在主要或主探针 50 上校准。根据方程式 2,在主光谱仪采用具有传递函数 $T_{pp}(\lambda)$ 的主要或主探针和具有传递函数 $T_{sp}(\lambda)$ 的次级或从属探针测试时,来自荧光光源 $F(\lambda)$ 的光谱将产生用于主探针的光谱 $S_{pp}(\lambda)$,其中

$$[0125] \quad F(\lambda) = \frac{S_{pp}(\lambda)}{T_s(\lambda) \cdot T_{pp}(\lambda)}$$

[0126] (方程式 4) 和使用次级探针的光谱 $S_{sp}(\lambda)$,其中

$$[0127] \quad F(\lambda) = \frac{S_{sp}(\lambda)}{T_s(\lambda) \cdot T_{sp}(\lambda)}$$

[0128] (方程式 5)。方程式 4 和 5 可相除,以通过探针校准函数 T_{CF} 来关联两个探针传递值,其中

$$[0129] \quad T_{CF} = \frac{T_{sp}(\lambda)}{T_{pp}(\lambda)} = \frac{S_{sp}(\lambda)}{S_{pp}(\lambda)}$$

[0130] (方程式 6)。因此,从方程式 2 和 6,当次级光谱仪与次级探针一起使用时,测量的光谱 $S(\lambda)$ 和拉曼光谱 $R(\lambda)$ 由如下来相关

$$[0131] \quad R(\lambda) = \frac{S(\lambda)}{T_S(\lambda) T_{SP}(\lambda)} = \frac{S(\lambda)}{T(\lambda) T_{CF}}$$

[0132] (方程式 7),其中 $T(\lambda) = T_S(\lambda) T_{PP}(\lambda)$ 是使用主探针用于次级光谱仪测量的存储系统传递函数。

[0133] 如在图 6 至图 7c 中所示,这允许任何数量的次级或从属探针 53a、53b、53n 匹配到任何数量的次级光谱仪 51a、51b、51n。如在图 7a 中所示,在第一步骤 70 处,采用与步骤 60 类似的方式,使用主探针 52,按照主光谱仪 50 对次级光谱仪 51a 进行校准。以与图 3 至 4c 的方法类似的方式,通过测试相对荧光标准源 54 的次级光谱仪,在步骤 72 处发现系统传递函数 71a。系统传递函数 71a 以任何适当的方式与相应的光谱仪 51a 相关联,例如在步骤 73 处在控制软件中或以其它方式。如由箭头 74 所示,这可以重复用于任何数量的次级光谱仪系统 51b, ... 51n, 以生成合适的系统传递函数 71b, ... 71n。

[0134] 如在图 7b 中所示,所述次级或从属探针 53a、53b, ..., 53n 相对主探针 52 来校准。在步骤 75 处,主光谱仪系统 50 采用相对荧光源 54 的主探针来适当地校准,尽管如果这一步已经执行并且与主探针相关联的传递函数已经存储,则该步骤可以省略。在步骤 76 处,主探针被探针 53a 替换,并且接下来,主光谱仪系统和相应的从属探针的组合相对荧光标准 54 进行检测。在步骤 77 处,校准函数 T_{CF} 从主探针光谱和次级探针光谱的比率来计算,并且在 78 处这个被记录,并且与如在 79a 处示出的次级探针进行相关联的存储。如箭头 80 所示,这可以重复用于任何数量的次级探针 53b, ... 53n, 并且相应的校准函数 T_{CF} 存储,如在 79b, ... 79b 处所示。

[0135] 如在图 7c 中所示,次级光谱仪系统 51n 中的一个可与在次级探针 53n 中的任何一个一起使用,因为使用主探针 52 的系统传递函数 71a 是已知的,并且将次级探针 53n 与主探针 52 相关联的校准函数 T_{CF} 是已知的。如在步骤 81 中所示的,次级光谱仪系统 51n 根据主光谱仪系统 50 来校准。在步骤 82 处,次级探针校准函数 T_{CF} 被检索,并且存储系统的传递函数 71n 根据存储的校准函数 T_{CF} 来修改。在步骤 83 处,体内拉曼测试或以其它方式可然后被执行,并且捕捉的拉曼光谱被校正。

[0136] 因此在任何方法中,通过将次级光谱特性匹配回主光谱仪特性,存储用于光谱仪和探针组合的传递函数或存储用于合并了主探针的系统的传递函数,以及保存与刺激探针联用的校准函数,使用不同光谱仪和探针组合所捕捉的光谱将仍然一致并且可比较。

[0137] 从图 8 和图 9a 至 9c 这是显然的。图 8 示出在主探针 52 和次级或从属探针 53n 之间不同的响应。强度响应随着光谱而改变,并且如图所示校准函数将次级探针的光谱映射到主要的或主探针的光谱。来自主光谱仪 50 和次级光谱仪 51 的未校准组织光谱在图 9a 中示出,并且在它们之间的差异是明显的。图 9b 和 9c 示出使用上述所述的方法中的每一种方法的校准结果,并且来自主要的和次级光谱仪的光谱基本上一致。

[0138] 拉曼光谱从具有两种不同的探针 ($n = 902$ 光谱) 的胃部测量。主成分分析 (PCA) 在次级探针的校准之前和之后进行。图 10 示出在光纤探针的校准之前和之后的 PCA 分析,以及对不同计分的 95% 置信区间。显而易见的是,在光纤探针的校准之后,光谱落在指示在主要和从属光纤拉曼探针之间的成功传递的相同置信区间内。

[0139] 监测激光功率

[0140] 图 11 是示出来自光纤探针的背景光谱（即在不存在组织信号的情况下）的曲线图。对应于拉曼散射或光纤二氧化硅内的荧光的峰和对应于远端球透镜的蓝宝石的峰是明显的。图 12 示出采用不同水平的发送功率从体内组织接收的拉曼光谱的曲线图。图 11 的峰在图 12 的不同线中是明显的，但将明显的是，峰的相对高度和连续背景随着发射功率而改变。

[0141] 有利的是，已经发现在捕捉的拉曼光谱中的所述光纤探头和蓝宝石球透镜的光谱特性可以用作内部参考以导出发射的激光功率，而无需在光学系统中任何其它组件的提供。如在图 13A 的方法中所示，在步骤 90 处，在本示例 352 中适当大数量的光谱被收集，并且发射的激光功率被测量。在步骤 91 处，在本示例的偏最小二乘（“PLS”）回归中，执行适当的多变量统计分析。PLS 回归将光谱数据的维数减到若干的潜在变量（“LV”）。在此情况下，光谱的变化和因变量之间的差异，所述激光功率被最大化，使得潜在变量将更高的权重给到与激光功率充分相关的光谱峰。通过选择适当数量的潜在变量，作为光谱特性函数的激光功率模型可以得出，并在步骤 92 处如图所示被存储。因此，在步骤 93 处如在附图 13b 中示出的操作中，测试光谱被捕捉，例如从体内对象或以其它方式被捕捉，并且在步骤 94 处，光谱值被提供给存储模型。在步骤 95 处，激光功率被导出并展示给操作者，例如在个人计算机 35 上显示给操作者。

[0142] 在本示例中，所述包含的若干潜在变量相对均方误差的曲线图在图 14a 中示出，并且四个变量被选作给出误差和复杂度之间的最佳平衡。四个潜在变量和回归向量的相对负荷在图 14b 中示出。在图 15 中，示出了来自在五个对象中的 166 个光谱的实时测量的示例数据，其中测量的激光功率相对由模型预测功率进行绘制。将显而易见的是，大致的线性拟合表明预测所述的功率是实际传送功率的良好指标。

[0143] 迭代背景减法

[0144] 参考图 16 至 18，其示出了减去从荧光、以及探针的二氧化硅和透镜的蓝宝石中的拉曼散射所产生的背景的方法。该背景信号对于每个特定光纤探针是唯一的。理想的是，从组织的拉曼光谱去除背景，而不过度或不足地减去背景。

[0145] 如在图 16 中步骤 110 处所示，例如在不存在目标的情况下通过探针从激光源发送光，背景光谱被捕捉和存储。在步骤 111 处，从测试对象（例如从组织）接收拉曼光谱。在步骤 112 处，通过使用一个或多个不同的参考峰的强度来预测在测试对象拉曼光谱中的光纤背景信号量。在本示例中，峰可能是由于二氧化硅和 / 或蓝宝石（例如， 417 或 490cm^{-1} ）。使用背景信号的预测量，所存储的背景信号可以乘以合适的，且可能与波长相关的校正因子，并且从测试光谱中减去（步骤 113）。

[0146] 在步骤 114 中，检查光谱剩余背景的存在。如果背景已经被完全去除（即，当二氧化硅和蓝宝石信号对于组织拉曼光谱的贡献可以忽略不计时），则光谱被传递以进行输出或进一步的分析，如在步骤 115 处所示。如果背景信号仍然存在，则步骤 112 至 114 如由箭头 116 所示的进行重复。

[0147] 该方法不需要被限于单个二氧化硅 / 蓝宝石峰。多变量分析（例如，偏最小二乘和曲线解析方法等）也可以用于此目的。

[0148] 举例来说，图 17 是示出从手掌组织接收的拉曼光谱和来自探针的背景光谱的曲

线图。来自荧光、在探针的二氧化硅和球透镜的蓝宝石中的拉曼散射的峰是显而易见的，叠加在来自手掌的拉曼光谱上。该背景信号对于每个特定的光纤探针是唯一的。

[0149] 如在图 18 中所示，在已经执行图 16 的迭代过程之后，平滑的拉曼光谱被示出，没有背景信号的独特的峰，但保持所需的基本拉曼光谱信息。

[0150] 组合的系统

[0151] 各种公开的方法可以一起使用。这种组合的一个实施例在图 19 中示出。在步骤 100 处，所述校准方法可以被执行，使得根据主系统或主要系统 50 的系统传递函数是已知的，并且后续的光谱可以被适当地校正。在步骤 101 处，可以执行信号的预处理，包括平滑和组织背景减除。在步骤 103 处，可对如上讨论的光谱进行功率监测，并且并行地，在步骤 102 处，可对探针背景进行减除。如在步骤 104 处所示，步骤 102 和 103 中的信息提供给在个人计算机 35 上的合适程序，以执行其它诊断或输出步骤。

[0152] 在将所公开的校准方法与诊断方法进行组合的过程中，仪器独立的光纤拉曼光谱对于定量组织分析和表征是可能的。这允许由不同仪器采用的光谱和同样由相同仪器但是不同探针采用的光谱的比较。这对于诊断是重要的，因为它允许使用在不同机器上或者通过使用不同探针得到的光谱来用于比较。这对于提高诊断的精度是重要的。

[0153] 实时癌症诊断

[0154] 在线的生物学光谱（即，反射率、荧光和拉曼光谱）系统和方法实现了临床内窥镜的实时癌症诊断，并且可以使用听觉反馈以及采用预测病理的概率诊断算法的结果的图形显示界面与临床医生相互交流。采用在胃部中的拉曼内窥镜作为示例（图 22A）；该方法能够预测几种病理：正常、肠化生、异常增生和肿瘤形成。这种在线诊断方法实时将信息提供给组织病理学的临床医生，其可用于做出决策，如活组织检查指导或肿瘤切除。包括 GUI 的该系统优化用于允许实时诊断（<0.1s），例如用于临床内窥镜的快速数据处理。

[0155] 为了解决跨解剖和脏器间的光谱方差，在线框架实现了器官特异性诊断模型并且在不同的器官（例如，食道、胃、结肠、子宫颈、膀胱、肺、鼻咽、喉，和口腔（硬腭、软腭、颊、内唇、腹侧和舌））的光谱数据库之间切换。因此，所公开的拉曼平台是用于在内窥镜进行癌症诊断的通用诊断工具。

[0156] 图 20 是用于根据一个实施例的实时癌症诊断的光谱采集和处理流程的诊断系统 115 的架构图。所述诊断系统 115 可以在个人计算机 35 上实施。诊断系统 115 包括光谱采集模块 120、光谱预处理模块 125、异常值分析模块 130、多变量分析模块 135、病理学模块 140 和数据库 142。为简单起见，仅一个光谱采集模块 120、光谱预处理模块 125、异常分析模块 130、多变量分析模块 135、病理学模块 140 和数据库 142 示出，但在实践中对于其中的每种模块在操作过程中都可以设置为多个。

[0157] 参考图 20-22，在步骤 145 处，光谱采集模块 120 将激光激发源与 CCD 电子同步，并将合并读出 (binned read-out) 从 CCD 存储到数据库 142 中以用于进一步处理。通过缩放到基于前述组织测量的总光子计数的约 85% 内，所述光谱采集模块进一步自动调节曝光时间和光谱积累，而 0.5 秒的上限被设定为实现临床上可接受的条件。多光谱积累和曝光时间的自动调节提供了快速和简单的方法，以防止信号饱和，并获得用于内窥镜应用的高信噪比。如果光谱信号饱和，则该方法以减少的积分时间启动新的数据采集以防止饱和。在光谱采集之后，该方法识别并消除宇宙射线（例如，使用设定为最大阈值的整个光谱范围

内具有 95% 置信区间 (CI) 光谱的一阶导数)。所识别的宇宙射线通过线性内插去除。短光谱采集时间帧对于内窥镜应用是特别有用的。在图 22A 处示出的 GUI 示出在 180 处的光谱采集。

[0158] 对于其它应用,所述光谱采集框架也可以用于外部或内部外科手术介入或评估外科手术期间的组织类型。该实时功能允许在现场诊断,并且因此可用于指导肿瘤切除术的切除范围。所述诊断信息可以在线给出(即 <0.5 秒)以辅助医疗决策,这是很关键的。对于皮肤测量,有较宽松的测量时间的要求,因为皮肤光谱在更可控的实验设置下以更长的曝光时间的概率来采集。在线软件架构还可以适用于需要快速光谱测量(包括荧光、反射光谱或在如过程分析技术、食品科学、取证等不同的领域)的其它领域,从而不间断的实时筛选是必要的。在步骤 150 中,光谱采集模块 120 确定信号是否已达到饱和。如果是这样,它以减少的积分时间启动新数据采集以防止饱和。在步骤 155 中,所述光谱采集模块 120 识别并消除宇宙射线(即,使用设定为最大阈值的整个光谱范围内具有 95% 置信区间 (CI) 光谱的一阶导数)。在一个实施例中,识别的宇宙射线通过线性内插去除。宇宙射线可以通过其它方法,包括多变量分析、平滑、均值滤波、中值滤波、傅立叶变换、小波分析等去除。

[0159] 在步骤 160 中,所述光谱预处理模块 125 以积分时间和激光功率缩放采集的光谱。一阶 Savitzky-Golay 平滑滤波器进一步用于去除在强度校正光谱中的噪声。然后,限制平滑光谱的下边界的 5 阶修改的多项式被减去,以解析单独组织的拉曼光谱。拉曼光谱在从 800cm^{-1} 到 1800cm^{-1} 的曲线下最后归一化到积分区域以解析光谱的线形状和相对强度,减少在临床内窥镜处的探针处理变化。GUI (图 22A) 示出在 185 处的归一化光谱。在一些实施例中,光谱预处理模块 125 利用用于预处理的附加方法,包括但不限于,多重散射校正 (MSC)、FIR 滤波、加权基线减法、降噪、平均中心化 (mean centering)、差分 (differentiation) 等。

[0160] 在步骤 165 中,异常分析模块 130 使用与 Hotelling's T^2 和 Q- 残差统计耦合的主成分分析 (principal component, PCA) 来检测异常光谱。GUI (图 22A) 示出在 190 处的异常分析。异常分析的实现用作在使用与 Hotelling's T^2 和 Q- 残差统计耦合的主成分分析 (PCA) 的在线框架中的高度模型特异性反馈工具。Hotelling's T^2 和 Q- 残差是提供在拟合模型内部和外部的信息的两个独立参数。使用这些参数作为光谱质量(即,探针接触模式、混杂因素、白光干涉等)的指标,听觉反馈集成到促进实时的光谱筛选和用于临床医生的探针处理建议的在线拉曼诊断系统中。软件系统提供用于不同诊断结果的不同声音反馈。例如,如果光谱是异常值,则一定的声音将出现。如果光谱被诊断分类为“正常”,则第二种不同的声音将出现。如果光谱被分类为“癌前病变”或“癌症”,则第三或第四声音将出现。声音频率可以与“后验概率”成比例。这是非常有用的,因为它在接收诊断信息时,提供实时指导给内窥镜医生。因此,内窥镜医师并不需要关注拉曼平台监测器,而是将重点放在具有声音指导的内窥镜操作步骤上。如果异常分析模块确定采集的光谱是异常值,则诊断系统 115 在步骤 145 处重新开始。

[0161] 如果该光谱被验证用于进一步分析,则它们被馈送到用于体内癌症诊断的概率模型。在步骤 170 中,多变量分析模块 135 应用用于体内癌症诊断的概率模型。基于大量患者的光谱数据库,多变量分析模块 135 在不同的预定义模型之间切换,包括偏最小二乘-判别分析 (PLS-DA)、PCA- 线性判别分析 (LDA)、蚁群算法 (ACO)-LDA、分类和回归树 (CART)、

支持向量机 (SVM)、自适应增强 (AdaBoost) 等。

[0162] 在步骤 175 中,病理模块 140 实现可以在概率癌症诊断的不同器官的光谱数据库之间切换的器官特异性诊断模型。除了音频反馈,GUI(图 22A)提供由在 195 处的病理模块 140 的输出给临床医生。

[0163] 图 22B 提供根据第二实施例的 GUI。

[0164] 所述数据库 142 存储采集的光谱以及用于诊断的存储光谱。

[0165] 在一些实施例中,多个光谱被采集并进行分析。例如在 5-15 之间采集。每个被分析,并且如果超过阈值百分比则提供相同的输出:癌症 VS 正常,即所确定的诊断。例如,如果 10 个光谱被采集,并且 7 个或更多提供相同的答案,则这是诊断。如果只有 5 个或 6 个提供相同的答案,则该过程被重复。

[0166] 实施例

[0167] 用于实时诊断的集成式拉曼光谱和三峰宽视场成像系统包括与 USB 6501 数字 I/O(美国国家仪器公司,美国德克萨斯州奥斯汀)电子同步的光谱稳定的 785nm 的二极管激光器(最大输出:300mW,B&W TEK 公司,美国特拉华州纽瓦克市),配有液氮冷却、NIR 优化、背照和深耗尽电荷耦合器件 (CCD) 摄像机(在每个像素 $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ 处 1340×400 像素;规格 -10:400BR/LN,美国新泽西州 Trenton 的 Princeton 仪器公司)的透射成像光谱仪(Holospec,f/1.8,美国密歇根州 Ann Arbor 的 Karser 光学系统公司),以及用于激光递送和体内组织拉曼信号收集的专门设计的拉曼内窥镜探针。1.8mm 的拉曼内窥镜探针由 32 个收集光纤组成,所述收集光纤围绕中央光递送光纤,且该中央光递送光纤在探针的近端和远端具有用于最大化收集组织拉曼信号的光学滤波的两级,同时减少瑞利散射光、光纤荧光和二氧化硅拉曼信号的干扰。拉曼探针可以很容易地向下传递给医疗内窥镜的仪器通道,并且在宽视场内窥镜成像(WLR/AFI/NBI)模态的指导下,引导到可疑的组织部位。使用具有约 9cm^{-1} 的光谱分辨率的 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ (“光点尺寸”(spot size)为 $200\mu\text{m}$) 的 785nm 激发功率,系统采集在 0.5s 内来自体内上消化道组织的 800cm^{-1} - 1800cm^{-1} 波数范围中的拉曼光谱。

[0168] 拉曼系统的硬件组件(例如,激光功率控制装置、光谱仪、CCD 快门和摄像头读取同步)通过用于不同光谱仪/摄像机(例如,PVCAM 库(美国新泽西州 Trenton 的 Princeton 仪器,Roper 科学有限公司)和 OmniDriver(美国佛罗里达州 Dunedin 的海洋光学公司)等)接入到 Matlab 软件。激光与 CCD 快门电子同步。激光功率、曝光时间和光谱积累的自动调节是通过缩放到基于前述组织拉曼测量的总光子数的 85%(例如 65000 个中 55250 的光子)来实现的,而 0.5 秒的上限被设定为实现临床可接受的条件。多光谱的积累和曝光时间的自动调节提供了一种快速和简单的方法,以防止 CCD 饱和并获得用于内窥镜应用的高信噪比(SNR)。拉曼位移轴(波长)使用水银/氙气校准灯(美国佛罗里达州 Dunedin 的海洋光学公司)来校准。用于系统的波长依存性的光谱响应校正使用标准灯(RS-10,美国加利福尼亚州圣地亚哥的 EG&G 伽玛科学公司)进行。该平台的再现性采用作为波数标准的环己烷和对乙酰氨基酚的激光频率和拉曼光谱进行连续地监测。包括 CCD 温度、积分时间、激光功率、CCD 对准的所有系统性能测量因此经由 SQL 服务器登陆到中央数据库。

[0169] 拉曼信号的实时预处理通过使用设定为最大阈值的整个光谱范围内具有 95% 置信区间(CI)的一阶导数,以宇宙射线的快速检测来实现。位于阈值外侧的数据点内插到 2

阶。光谱进一步用积分时间和激光功率缩放。一阶 5 点的 Savitzky-Golay 平滑滤波器用于去除在强度校正的光谱中的噪声,而限制到平滑光谱下界的 5 阶修改后多项式被减去以解析单独组织的拉曼光谱。拉曼光谱被归一化到从 800cm^{-1} 到 1800cm^{-1} 曲线下的积分区域,使得能够在不同组织病理学之间的光谱形状和相对拉曼基带强度进行更好的比较。光谱随后根据具体的数据库局部地平均值中心化以去除在数据库中的常见变化。预处理之后,拉曼光谱馈送到模型特定的异常分析。

[0170] 通过使用耦合到 Hotelling's T^2 与 Q-残差统计的 PCA,异常检测方案被结合到生物医学光谱中作为在线框架中的高度模型特定反馈工具。通过将它们分解到正交分量(主成分(PCs))的线性组合中,PCA 减少了拉曼光谱的维度,使得在数据集中的光谱变化被最大化。数据矩阵 X 的 PCA 模型被定义为:

$$[0171] \quad X = TP^T + E$$

[0172] 其中 T 和 P 表示计分和负荷,并且 E 包含残差。负荷对应于新的旋转轴,而计分表示数据投影值。因此,Hotelling's T^2 统计值是由 PCA 模型(样本到模型的距离)捕捉的方差测量,并且由如下定义:

$$[0173] \quad T_{ik}^2 = t_{ik}(\lambda_k^{-1}) t_{ik}^T$$

[0174] 其中 t_{ik} 是用于使用分量 k 的第 i 个样本光谱的 PC 计分,并且 $\lambda_k^{-1} \lambda_k^{-1}$ 是用于分量 k 的协方差矩阵的归一化特征值的对角线矩阵。因此,Hotelling's T^2 给出在 PCA 模型内的极值指示。另一方面,Q 残差是没有由 PCA 模型捕捉(缺少模型拟合统计)的方差测量,并且由如下定义:

$$[0175] \quad Q_{ik} = \sum (x_i - t_{ik} P_k^T)^2$$

[0176] 其中, x_i 是样本光谱, Q_{ik} 是用于使用分量 k 的第 i 个样本光谱的平方重建误差的总和,并且 P_k 是 PC 负荷。对于 Hotelling's T^2 与 Q-残差两者,标准化的 99% CI 被用作上阈值以截断异常的拉曼光谱。因此,Hotelling's T^2 与 Q-残差是两种提供关于模型拟合的定量信息的独立参数。使用这些参数作为光谱质量(即,探针接触模式、混杂因素、白光干扰等)的指标,听觉反馈已结合到在线拉曼诊断系统中,有利于实时探针处理建议和在内窥镜程序期间用于临床医生的内窥镜筛选。

[0177] 在组织的拉曼光谱质量的验证之后,那些合格的拉曼光谱立即馈入用于在线体内诊断和病理预测的概率模型。该 GUI 可以在不同的模式之间快速切换,包括偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)、PCA-线性判别分析(LDA)、蚁群优化(ACO)-LDA、分类和回归树(CART)、支持向量机(SVM)、自适应增强(AdaBoost)等,用于在内窥镜程序处的预测分类。作为例子,概率的 PLS-DA 被用于胃癌诊断。PLS-DA 采用 PCA 的基本原理,但是进一步通过将光谱变化和组关联性之间的协方差最大化来进一步旋转成分,以获得与诊断有关的变化,而不是在光谱数据集中的最显著的变化。该系统支持库分类,一对全部(one-against-all)和一对一多类(one-against-one multiclass)(即良性、异型增生和癌症)的概率 PLS-DA 判别分析以预测特定的组织病理。

[0178] 实施例 1

[0179] 总计 2748 个体内胃组织光谱(2465 个正常,和 283 个癌症)从被招募以构建用于开发用于胃癌诊断的诊断算法的光谱数据库的 305 个患者中采集。组织病理被作为体内组

织诊断和表征的拉曼技术的性能评估的金标准。

[0180] 胃呈现有用于光谱诊断的许多混杂因素（即胃液、食物残渣、出血、渗出液等）的最有挑战性的器官中的一个。从 305 个胃部病人（正常 $n = 2465$ ）和癌症 $(n = 283)$ 中采集的用于算法开发的体内平均拉曼光谱在图 23 中示出。胃组织的拉曼光谱示出在 875cm^{-1} （羟基脯氨酸的 $\nu(\text{C}-\text{C})$ ）、 936cm^{-1} （蛋白质的 $\nu(\text{C}-\text{C})$ ）、 1004cm^{-1} （苯丙氨酸的环呼吸 $\nu_s(\text{C}-\text{C})$ ）、 1078cm^{-1} （脂类的 $\nu(\text{C}-\text{C})$ ）、 1265cm^{-1} （蛋白质的酰胺 III $\nu(\text{C}-\text{N})$ 和 $\delta(\text{N}-\text{H})$ ）、 1302cm^{-1} 和 1335cm^{-1} （蛋白质和脂类的 $\delta(\text{CH}_2)$ 变形）、 1445cm^{-1} （蛋白质和脂类的 $\delta(\text{CH}_2)$ ）、 1618cm^{-1} （吡啉的 $\nu(\text{C}=\text{C})$ ）、 1652cm^{-1} （蛋白质的酰胺 I $\nu(\text{C}=\text{O})$ ）和 1745cm^{-1} （脂类的 $\nu(\text{C}=\text{O})$ ）。胃组织拉曼光谱包含来自可能反映在胃壁中皮下脂肪的甘油三酯的巨大贡献（即在 1078cm^{-1} 、 1302cm^{-1} 、 1445cm^{-1} 、 1652cm^{-1} 和 1745cm^{-1} 处主要的峰）。胃癌的拉曼光谱揭示在上述拉曼光谱性质（例如，强度、光谱形状、带宽和峰值位置）中的显著变化，再次确认了在体内拉曼研究中我们前述的内容。

[0181] 自动异常检测使用具有 Hotelling's T^2 与 Q-残差 (99% CI) 的 PCA 实现了可预测在线分析。为了使在线诊断有效，包括最大组织的光谱变化的双组分 PCA 模型被定义。在数据集 ($n = 2748$ 个拉曼光谱) 中总变异性的 38.71% (PC1 :30.33%、PC2 :8.38%) 最大方差所占的这些选择的显著 PC ($P < 0.0001$) 和相应的 PC 负荷在图 24 中示出。

[0182] 图 25 示出了用于例示用于将癌症光谱与正常光谱分开的 PC 计分功能的正常 ($n = 2465$) 和癌症组织光谱 ($n = 283$) 的计分散点图（即 PC1 与 PC2）。Hotelling's T^2 与 Q-残差 99% 的 CI 因此从训练数据集计算，并且固定为用于预期的在线光谱验证的阈值。我们然后定义用于胃癌预测的概率 PLS-DA 模型。训练数据库随机地重新采样多次 ($n = 10$) 成学习集 (80%) 和测试集 (20%)。生成的 PLS-DA 模型分别提供用于胃癌诊断的 85.6% (95% CI :82.9% -88.2%) (80.5% (95% CI :71.4% -89.6%)) 的灵敏度和 86.2% (95% CI :83.6% -88.7%) 的特异性)。然后，我们进一步测试异常检测以及在 10 个准胃癌患者中的概率 PLS-DA。用于预期正常 ($n = 45$) 和癌症 ($n = 30$) 组织光谱的 PC 计分散点图（即，PC1VS PC2）同样在图 25 中示出。

[0183] 图 26 示出用于从 10 个预期胃部样本采集的 105 个 (45 个正常, 30 个癌症, 30 个异常) 光谱、具有 99% CI 边界的 Hotelling's T^2 (38.71%) 与 Q-残差 (61.29%) 的散点图。虚线表示验证预期拉曼光谱是否处于主成分分析 (PCA) 模型的常见组织变化内的 99% 的置信区间 (CI)。可以观察到，大量的非接触光谱位于 99% 的 CI 外侧，并因此被实时丢弃，无需用于组织诊断。被验证的组织拉曼光谱大量落入 T^2 与 Q-残差的 99% CI 内侧，表明该在线数据分析提供快速并且高效的生物学组织光谱的实时验证手段。

[0184] 由在线异常分析验证的预期采集光谱进一步馈入概率 PLS-DA 用于即时疾病预测，实现用于胃癌检测（图 27）的 80.0% (60/75) 的诊断精度，如由组织病理学检查所证实的。单独的虚线给出了用于从正常胃组织体内分离癌瘤的 90.0% (27/30) 的诊断灵敏度和 73.3% (33/45) 的特异性。

[0185] 受试者工作特征曲线 (ROC) 被进一步生成以评估组分离。图 28 示出从用于回顾性预测的光谱数据库的每个随机分割计算的 ROC 曲线以及用于预期数据集预测所计算的 ROC。在用于回顾性和预测数据集所生成的 ROC 曲线下的积分区域分别是 0.90 和 0.92，示出用于体内胃癌诊断的 PLS-DA 算法的稳定性。

[0186] 用于对组织病理预测的全部前述在线数据采集的总处理时间是 0.13 秒。用于在图 21 中流程表的每个步骤的处理时间在表 1 中给出。可以实现自由运行光学诊断和处理时间 < 0.5s, 这对于在内窥镜处实现实时的体内组织诊断是至关重要的。

[0187] 表 1. 用于在具有 64 位 I7 四核 4GB 内存的个人计算机上在线生物医学拉曼光谱框架的平均处理时间

[0188]

分析	计算时间 (毫秒)
宇宙射线去除	0.5
激光响应时间	10
预处理	40
异常检测	10
概率 PLS-DA 预测	70
总的计算时间	100 至 130

[0189]

[0190] 实施例 2

[0191] 拉曼光谱系统包括光谱稳定的 785nm 二极管激光器 (最大输出 :300mW, 美国特拉华州 Newark 的 B&W TEK 公司), 配有液氮冷却、背照和深耗尽 CCD 摄像机 (在每个像素 $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 处 1340×400 像素; 规格 -10 :400BR/LN, 美国新泽西州 Trenton 的 Princeton 仪器公司) 的透射成像光谱仪 (Holospec, f/1.8, 美国密歇根州 Ann Arbor 的 Karser 光学系统公司)。该系统还由特别设计的熔融二氧化硅光纤拉曼内窥镜探针 (外径 1.8mm, 长度 1.30 米) 组成, 该内窥镜探针包括围绕中央光传送光纤 (直径 $200\ \mu\text{m}$, N. A. = 0.22) 的 $9 \times 200\ \mu\text{m}$ 的收集光纤 (N. A. = 0.22)。1.0mm 的蓝宝石球透镜 (折射率 1.76) 被耦合到用于增强上皮组织拉曼测量的拉曼探针的光纤探头。所述系统用 9cm^{-1} 的光谱分辨率采集在 800cm^{-1} 至 1800cm^{-1} 范围内的拉曼光谱。在这项研究中每个拉曼光谱在 785nm 的激光激发下用 0.5s 的积分时间测量。快速拉曼光谱技术使用氩气 / 水银光谱灯 (AR-1 和 HG-1, 美国佛罗里达州 Dunedin 的海洋光学公司) 来进行波长校准。所有波长校准光谱使用钨 - 卤校准灯 (RS-10, 美国加利福尼亚州圣地亚哥的 EG&G 伽玛科学公司) 对于系统的强度响应进行校正。

[0192] 使用在图 20-22 中描述的系统和方法用于控制用于实时数据采集和分析的拉曼光谱系统。从体内组织测量的原始拉曼光谱表示弱拉曼信号、强烈的自体荧光背景和噪声的组合。原始光谱由一阶 Savitzky-Goly 平滑滤波器进行预处理 (选择具有 3 个像素的窗口宽度来匹配光谱分辨率) 以减少光谱噪声。在指纹区域 (800cm^{-1} - 1800cm^{-1}) 中, 五阶多项式被发现对于拟合在噪音平衡光谱中的自体荧光背景最优, 并且这个多项式随后从原始光谱中减去以产生单独组织的拉曼光谱。所有的上述预处理在 100ms 内完成, 并且处理结果可在计算机屏幕上实时显示。

[0193] PLS 回归被用作多变量方法以从光纤拉曼探针提取特征内部参考的背景信号。简单地说, PLS 采用 PCA 的基本原理, 但通过将光谱变化和因变量 (例如, 激光激发功率) 之

间的协方差最大化,来进一步旋转成分 LV,使得 LV 负荷解释相关变化,而不是在光谱数据集中的最突出的变化。与激光激发功率相关联的重要光谱参考信号被保留在最初的几个 LV 中。在这项研究中,在建模之前执行平均中心化以减小 PLS 回归模型的复杂性。PLS 回归模型的最优复杂性通过留一交叉验证确定,并且 PLS 回归模型的性能通过计算确定 (R^2) 的系数、校正均方根误差 (RMSEC)、交叉验证均方根误差 (RMSECV) 和预测均方根误差 (RMSEP) 来检查。需要注意的是,最优 PLS 模型具有高的 R^2 ,但具有低的 RMSEC、RMSECV 和 RMSEP。在这项研究中用于解析参考信号开发的 PLS 回归模型也实现为在我们的实时临床拉曼软件中的在线激光激发功率预测器,并且以无偏差的方式 (unbiased manner) 预期测试。多变量统计分析在 Matlab (马萨诸塞州纳提克的 MathWorks 公司) 程序环境中进行。

[0194] 总计 30 名正常健康的对象 (16 名女性和 14 名男性) 被招募用于口腔中的体内组织的拉曼光谱测量。在体内组织的拉曼光谱测量之前,所有对象进行充分漱口,以减少混杂因素 (如食物残渣、细菌包覆等)。体内组织的拉曼光谱 ($n = 783$) 收集有 25 个对象的内唇。对于 25 个对象,体内口腔组织的拉曼光谱 ($n = \sim 5$) 在 5mW-65mW (约 10mW 的间隔) 的范围中在六个功率水平处收集。在每一个组织的拉曼测量之前,使用功率计以 $\pm 0.5\%$ 的线性度和 $\pm 3\%$ (0.1mW 至 100mW 的范围) 的精度,激光的激发功率水平在光纤探针的远端头处测量。其它混杂因素 (例如在组织表面上的探针压力、光漂白、组织的光学性能和光纤探针的弯曲) 没有特意监测,但结合到用于在原位的参考信号的鲁棒提取的 PLS 建模中。在在线拉曼采集框架中部署开发的 PLS 模型之后,用于激光激发功率监测的内部参考信号的预期和独立验证在 5 个新对象 ($n = 166$ 个光谱) 上实时执行。

[0195] 为了进一步验证在这项工作中开发的内部参考方法的定量值,我们还进行了组织模型实验。各种明胶浓度的组织模型从牛的皮肤 (B 型明胶 (美国 Sigma 公司 G9391)) 制备。明胶以预定浓度 (以重量计 20、25、30、35、40、45 和 50%) 溶解在蒸馏水中。溶解的明胶在水浴中采用连续搅拌加热至 50°C 1 小时。接着,将熔融明胶倒入一预冷的模具 (4°C) 中,并存储 2-3 小时以产生固体明胶模型。然后,执行组织模型的定量光纤拉曼光谱分析。使用光纤拉曼探针,以不同的激光功率从各个组织模型测量得到总数 $n = 133$ 的拉曼光谱。激光激发功率在 10-60mW 的范围中改变,并且测量得到的光谱归一化到如由内部参考方法预测的激光泵浦功率。

[0196] 图 11 示出当由 785nm 的二极管激光器激发时,所使用的球透镜光纤拉曼探针的背景光谱。源自远端球透镜的不同蓝宝石 (Al_2O_3) 拉曼峰可以在 417cm^{-1} 和 646cm^{-1} (以 A_{1g} 对称的声子模式) 以及 380cm^{-1} (和 751cm^{-1} (E_g 声子模式) 处被发现。从熔融二氧化硅光纤以及相对较弱的光纤荧光背景存在两个主导拉曼分量。在 490cm^{-1} 和 606cm^{-1} 处表示为 D_1 和 D_2 的熔融二氧化硅的尖锐“缺陷峰”已经分别分配在四元环和三元环中的氧原子的呼吸振动。与无定形二氧化硅物质的一般特征相关联的强烈玻色子拉曼频带的肩峰 (shoulder) (约 130cm^{-1}) 同样从光纤拉曼探针的背景光谱观察。二氧化硅玻色子频带在约 60cm^{-1} 附近达到峰值,但由于我们的拉曼探针设计的光滤波,仅肩峰是明显的。来自光纤拉曼探针本身的这些特征背景拉曼峰 (比指纹区更短 (800cm^{-1} 至 1800cm^{-1})) 可以用作用于体内组织拉曼测量的内部参考信号。

[0197] 为了开发 PLS 回归模型并解析内部参考信号,我们采用作为独立参数的激光激发功率测量在口腔中 25 个对象体内的拉曼光谱。对于每一个对象,体内组织拉曼光谱 ($n = \sim$

5) 以在 5mW-65mW (约 10mW 的间隔) 范围中的不同功率水平来采集。图 12 示出使用不同的激光激发功率 (例如 10mW、30mW 和 60mW) 从内唇测量的平均体内原始拉曼光谱 ± 1 标准偏差 (SD) 的示例。可观察到在方差的广阔自体荧光背景上叠加的弱组织拉曼信号。图 29 示出校准的无背景平均拉曼光谱 ± 1 SD。内唇缘的体内拉曼光谱示出在约 853cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{C})$)、 1004cm^{-1} ($\nu_s(\text{C}-\text{C})$)、 1245cm^{-1} (蛋白质的酰胺 III $\nu(\text{C}-\text{N})$ 和 $\delta(\text{N}-\text{H})$)、 1302cm^{-1} (CH_3CH_2 扭曲和摇摆)、 1443cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$ 变形)、 1655cm^{-1} (蛋白质的酰胺 I $\nu(\text{C}=\text{O})$) 和 1745cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$)。另一方面,原始的体内组织的拉曼光谱 (图 12) 也包含来自光纤拉曼探针的突出熔融二氧化硅和蓝宝石拉曼峰,即: 380cm^{-1} 、 417cm^{-1} 、 490cm^{-1} 、 606cm^{-1} 、 646cm^{-1} 和 751cm^{-1} 。

[0198] 一种从口腔组织的拉曼光谱中提取广泛范围特性的内部参考峰的 PLS 回归模型。瑞利散射光从 PLS 分析排除。测量的体内原始组织拉曼光谱被设置在具有逐行光谱和逐列波数的矩阵中。参考激光功率水平被设置在表示因变量的列向量中。在平均中心化之后,使用留一交叉验证开发 PLS 回归模型,以便建立用于定义用于激光泵浦功率预测的鲁棒参考信号的最优算法。图 14a 示出作为保留 LV 函数的激光功率预测的 RMSEC 和 RMSECV。PLS 回归分析示出,最优模型 ($\text{RMSECV} = 2.5\text{mW}$) 可以使用 4 个 LV 获得。图 14b 显示占最大拉曼光谱方差 (即 LV1 :94.8%、LV2 :3.0%、LV3 :0.9% 和 LV4 :0.2%) 和激光激发功率方差 (LV1 :80.1%、LV2 :16.8%、LV3 :0.8%、LV4 :0.7%) 的前四个 LV 负荷。还示出了所计算出的 PLS 回归向量。图 30a 使用留一交叉验证示出体内激光功率的监测结果 (即测量的激光功率 vs 预测的激光功率)。数据可以通过指示相当的线性关系 ($R = 0.98$) 的方程 ($y = 0.551 + 0.984x$) 来拟合。4 个 LV 的 PLS 模型的复杂性提供准确的内部参考用于采用 2.5mW 的 RMSECV 和 0.981 的 R^2 的激光激发功率。相同的 PLS 回归模型随后在拉曼软件中实时在线实施,用于 5 个新对象 ($n = 166$ 个光谱) 的独立验证。图 30b 示出使用开发的 PLS 回归模型在测量的实际激光激发功率和预测的激光激发功率之间的关系。 2.4mW 的 RMSEP 和线性关系 ($y = 0.342 + 1.011x$; $R^2 = 0.985$) 可获得,再次确认在体内组织拉曼测量期间作为内部参考方法的 PLS 回归应用。

[0199] 内部参考方法的定量值被开发用于组织模型定量光谱分析。具有不同浓度 (即以重量计 20%、25%、30%、35%、40%、45% 和 50%) 的明胶的七种组织模型被构造和测试。来自明胶模型的拉曼光谱 ($n = 133$ 个光谱) 被测量并归一化到实时预测的激光功率。图 31 示出在 60mW 激发激光功率处从具有不同浓度的明胶组织模型测量的拉曼光谱。正如预期的那样,这些拉曼光谱示出拉曼峰强度和明胶浓度之间的线性关系 ($R = 0.992$)。图 32 示出随着变化的激发激光功率 (从 10mW 到 60mW) 在实际的明胶浓度和预测浓度之间的相关性。显而易见的是,通过原位实时的激光激发功率来校正激光功率,明胶组织模型的准确定量分析可实现 ($\text{RMSEP} = 1.9\%$ 和 $R^2 = 0.985$)。上述结果表明,基于多变量的内部参考信号,开发的实时功率监测方法可以实现在光纤组织拉曼光谱中的鲁棒定量组成分析。

[0200] 实施例 3- 体内实时经鼻的图像引导拉曼内窥镜:定义在鼻咽部和喉部的光谱特性

[0201] 这项研究表明在经鼻内窥镜应用中的拉曼光谱中的可行性,提供在头部和颈部的大规模临床研究的基础。采用开发的小型化光纤拉曼探针集成的图像引导的拉曼内窥镜平台提供了在临床内窥镜检查期间在分子水平处的头部和颈部的内源性组织成分的迅速和微创评估。这显著促进了临床医生来获得在头部和颈部的组织的详细生物分子指纹,反映

真正的组成和形态特征,而不会引入由血管穿刺或组织脱水、形态和解剖效应等导致的人为现象。

[0202] 拉曼光谱系统由光谱稳定的 785nm 的二极管激光器(最大输出:300mW,美国特拉华州 Newark 的 B&W TEK 公司),配有液氮冷却、NIR 优化、背照和深耗尽电荷耦合器件(CCD)摄像机(在每个像素 $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 处 1340×400 像素;规格 -10:400BR/LN,美国新泽西州 Trenton 的 Princeton 仪器公司)的透射成像光谱仪(Holospec, f/1.8, Karser 光学系统公司)组成。新颖的光谱仪光纤输入耦合件由 58 个光纤($100\ \mu\text{m}$)的抛物线对齐阵列构成,以校正用于改进拉曼信号的光谱分辨率和信噪比两者的光谱仪像差。利用 1.8mm 光纤拉曼探针进行经鼻内窥镜应用,可以使得组织激发和体内组织拉曼收集两者均最大化。拉曼光纤探针拟合到柔性经鼻内窥镜的仪器通道,并且可以在宽视场成像(即,白光反射率(WLR)和窄带成像(NBI))引导下安全地引导到在鼻咽和喉部中的不同位置。临床拉曼内窥镜平台已经集成有我们最近开发的在线数据处理软件,以方便实时(处理时间 $< 0.1\text{s}$)探针处理提醒和声音反馈给临床医生。简单地说,在线拉曼内窥镜框架将光谱采集(即,激光曝光、积分时间、CCD 快门和读出等)同步,并使用包括平滑、五阶多项式基线减法等建立的预处理方法,从体内的拉曼光谱(包括强的自体荧光背景和弱拉曼信号)自动地提取原始组织光谱。体内的拉曼信号和多变量算法的结果(例如,主成分分析)可以在临床经鼻拉曼内窥镜期间实时显示在易于理解的图形用户界面(GUI)中。

[0203] 总共有不同的种族(22 个亚洲人和一个白人)的 23 例健康男性对象被招募用于以经鼻内窥镜的体内组织拉曼光谱测量。在这些对象招募中,在 WLR 和 NB 成像检查下没有可疑病灶被识别。共有假定正常(或良性)的组织三个主要测量位点被预定义以用于体内拉曼采集,包括真正的喉声带(LVC)、后鼻咽(PN)和此外其中 NPC 通常启动的咽隐窝(即咽隐窝(FOR))。光纤拉曼探头可以放置与实时询问内源生物分子组合物的内部组织轻柔接触。对活组织检查部位的准确定位由主管的内窥镜医师对 WLR/NBI 监视器验证。探针允许拉曼光谱从具有约 1mm^3 和约 $800\ \mu\text{m}$ 的穿透深度的区域(直径 $200\ \mu\text{m}$)收集。使用具有在组织表面上约 50mW 功率的 785nm 激光,每个光谱在 0.5s 内采集。

[0204] 拉曼光谱在线显示并且储存用于后程序检查。这种快速拉曼内窥镜技术是非破坏性的,并且现在可以常规地在用于临床评价的经鼻内窥镜检查中使用。为了评估组织内部位的方差,几个拉曼光谱(约 18)也从每个组织部位获得。因此,来自 47 个部位的总计 874 个体内拉曼光谱在经鼻内窥镜处测量并且用于来自 23 个对象的光谱分析 [PN(n = 521), FOR(n = 157) 和 LVC(n = 196)]。

[0205] 在数据分析之前,原始拉曼光谱首先使用线性 Savitzky Golay 滤波器平滑,并且使用 5 阶多项式拟合将组织自体荧光背景从平滑光谱中减去。背景减去的拉曼光谱在曲线下归一化到积分区域,以相对于不同的对象和组织部位,最大限度地减少对临床拉曼测量的拉曼探针的处理变化的效果。所有处理的拉曼光谱组成矩阵,并且然后执行整个拉曼数据集的平均中心化。为了减少光谱数据的维度,主成分分析(PCA)被用来提取说明在用于组织表征的拉曼光谱数据集中的最大方差的一组正交主成分(PC)。因此,在 PC 上的负荷表示在占逐渐减小的方差的数据集中最突出光谱变化的正交基础光谱,而在 PC 上的计分表示在相应负荷上的组织拉曼光谱的投影值。因此,PCA 可以有效地用于解析光谱方差,同时降低数据集的维度为最小。基于方差(ANOVA)和在 0.05 水平处 t 分布检验(Student's

t-test) 的分析来选择保留 PC 的数量。我们采用事后 (post-hoc) Fisher's 的最小二乘差异 (LSD) 的测试来评估平均值中的差。使用在 Matlab (马萨诸塞州纳提克的 MathWorks 公司) 编程环境中的 PLS 工具箱 (华盛顿州 Wenatchee 的特征向量研究公司) 执行多变量统计分析。

[0206] 可常规地在经鼻图像引导 (即, WLR 和 NBI) 内窥镜检查期间在鼻咽和喉部中采集高质量的体内拉曼光谱。图 1 示出在内窥镜处以 0.1s 的采集时间从后鼻咽采集的体内原始拉曼光谱 (叠加在大组织自体荧光背景上的弱拉曼信号) 的示例。具有 >10 (图 33 的插图) 的信噪比 (SNR) 的背景减去的组织拉曼光谱可获得并且在临床内窥镜测量期间在线显示。图 34 示出当拉曼探针在 WLR/NB 成像指导下与组织轻柔接触时正常的鼻咽 [PN (n = 521) 和 FOR (n = 157)] 和喉组织 [LVC (n = 196)] 的主体间体内平均拉曼光谱 ± 1 个标准差 (SD)。收集的鼻咽和喉组织拉曼光谱的比较 (图 34) 展示出: 在体液中的那些生化物质没有显著贡献于在经鼻内窥镜处的体内组织拉曼光谱。如所示出的是从相应的解剖位置采集的 WLR 图像。与蛋白质和脂质相关联的突出拉曼频带以暂时的生物分子分配被识别, 如在表 2 中列出的。

[0207] 表 2 参与鼻咽和喉组织的拉曼散射的分子振动和生化物质的暂定分配 (Tentative assignment) (其中 ν 是拉伸模式; ν_s 是对称的拉伸模式; δ 是弯曲模式)。

[0208]

拉曼峰 (cm^{-1})	振动	生化物质
853	$\nu(\text{C-C})$	蛋白质
940	$\nu(\text{C-C})$	蛋白质
1004	$\nu_s(\text{C-C})$ 呼吸	蛋白质
1078	$\nu(\text{C-C})$	脂质
1265	酰胺 III $\nu(\text{C-N})$ $\delta(\text{N-H})$	蛋白质
1302	CH_2 扭曲和摇摆	脂质/蛋白质
1450	$\delta(\text{CH}_2)$	脂质/蛋白质
1660	酰胺 IV (C=O)	蛋白质

[0209] 图 35 示出随机选择的对象的主体内平均光谱 $\pm 1\text{SD}$ 。体内组织的拉曼光谱被认为可以在鼻咽和喉中的微小的主体间和主体内的方差 ($<10\%$) 再现。进一步拉曼内窥镜测试表明, 后鼻咽内的不同组织部位之间的变异性是微小的 ($<5\%$) (数据未示出)。我们还计算如在图 36 中示出的不同组织类型 (即, PN-LVC、LV-FOR 和 PN-FOR) 之间的计算差光谱 $\pm 1\text{SD}$, 解析在生物分子层面不同的解剖组织部位的独特成分和形态分布。ANOVA 揭示以 812cm^{-1} 、 875cm^{-1} 、 948cm^{-1} 、 986cm^{-1} 、 1026cm^{-1} 、 1112cm^{-1} 、 1254cm^{-1} 、 1340cm^{-1} 、 1450cm^{-1} 、 1558cm^{-1} 、 1655cm^{-1} 和 1745cm^{-1} 为中心的三个解剖组织部位之间显著变异的十二个显著和广泛的拉曼光谱次级区域, 再次确认表征朝向准确的体内组织诊断的鼻咽和喉的拉曼光谱特

性的重要性。

[0210] 在从健康志愿者获得的血液、唾液和鼻涕的体内拉曼光谱进行测量,如图 37 所示。在唾液和鼻涕中最突出的拉曼频带是在 1638cm^{-1} 、(ν_2 是水的弯曲模式),而血液显示在 1560cm^{-1} 、和 1620cm^{-1} 附近的卟啉拉曼频带。为进一步评价在头部和颈部中不同组织之间的光谱差,基于占总方差的 57.41%的 ANOVA 和 t 分布检验 (Student's t-test) ($P < 0.05$) (PC1 :22.86% ;PC2 :16.16% ;PC3 :8.13% ;PC4 :6.22 ;PC5 :4.05%) 的五组分 PCA 模型已开发来解析不同解剖位置的显著峰值方差。图 38 示出揭示与蛋白质 (即 853cm^{-1} 、 940cm^{-1} 、 1004cm^{-1} 、 1265cm^{-1} 、 1450cm^{-1} 和 1660cm^{-1}) 和脂质 (即, 1078cm^{-1} 、 1302cm^{-1} 、 1440cm^{-1} 、 1655cm^{-1} 和 1745cm^{-1}) 相关联的拉曼频带。图 39(A 至 E) 显示不同组织类型 (即 PN、FOR 和 LVC) 的 PCA 计分的图表。在每个槽口箱内的线表示中位数,但箱子的下边界和上边界分别指示第一 (25.0%百分位数) 和第三 (75.0%百分位数) 四分位数。误差条 (须状物) 表示 1.5 倍四分范围。p 值同样在不同的组织类型之间给出。集成线性判别分析 (LDA) 的二分法 PCA 算法分化使用留一交叉验证提供了分别用于在 PNvs FOR 与 LVCvsPN 之间差的 77.0% (401/521)、67.3% (132/192) 的灵敏度和 89.2% (140/157) 和 76.0% (396/521) 的特异性。总的来说,这些结果表明,在头部和颈部中的鼻咽和喉的拉曼光谱可以在经鼻内窥镜处体内测量,并且诊断算法的发展应是组织部位特异性的,以确保最小的算法复杂性。

[0211] 实施例 4 - 用于在 Barrett 食管中异型增生的实时体内诊断的光纤共焦拉曼光谱仪

[0212] 光纤共焦拉曼诊断可以实时实现 (< 0.5 秒),并揭示原位 Barrett 癌变中上皮细胞和组织的渐进生物分子和功能变化。组织病理学表征:预测的已测量的组织部位中的 152 个为柱状上皮层 ($n = 597$ 个光谱),48 个为肠上皮化生 ($n = 123$ 个光谱),9 个高度异常增生 ($n = 77$ 个光谱)。使用受试者工作特征曲线 (ROC) 分析,可以成功实现对高度异常增生的识别,产生在光谱基础上的 87.0%的灵敏度和 84.7%的特异性。ROC 曲线下的面积被认为是 0.90。这种新的具有实时功能的生物分子特异性内窥镜方法为肠胃病学家们在正在进行的内窥镜过程中,客观定位 Barrett 病人体内的高风险组织提供了一种可靠的工具。

[0213] 共焦拉曼光谱系统由近红外 (NIR) 激光二极管 ($\lambda_{\text{ex}} = 785\text{nm}$),高通量透射成像光谱仪和专门设计的 1.8mm 光纤共焦拉曼探针组成;所述高通量透射成像光谱仪配备有液氮冷却的以及 NIR 优化电荷耦合器件 (CCD) 摄像机。该系统以约 9cm^{-1} 的分辨率在范围 800cm^{-1} - 1800cm^{-1} 中采集拉曼光谱。所开发的光纤共焦拉曼内窥镜探针用于激光递送以及体内组织拉曼信号收集。

[0214] 1.8mm (外直径) 的共焦拉曼内窥镜探针包括围绕中央光传送光纤 (直径 $200\ \mu\text{m}$, $\text{NA} = 0.22$) 的 $9 \times 200\ \mu\text{m}$ 滤波器涂覆的收集光纤 ($\text{NA} = 0.22$)。微型的 1.0mm 蓝宝石球透镜 ($\text{NA} = 1.78$) 被耦合到共焦探针的光纤探头以将激发光紧密地聚焦到组织上,使来自上皮层 ($< 200\ \mu\text{m}$) 的有效拉曼光谱收集成为可行的。所述光纤共焦拉曼探针可以插入到常规内窥镜的仪器通道中,并放置与用于体内组织表征和诊断的上皮轻柔接触。这种共焦拉曼探针的深度选择性提供了令人信服的实验优点,包括:(i) 光纤共焦拉曼光谱可以选择性地定位与早发型 Barrett's 癌变相关联的上皮层,优于询问较大的组织体积的常规体积类型光纤拉曼探针;(ii) 由于来自更深组织层 (例如,基质) 的大幅减少的组织自体荧光的贡献,共焦拉曼技术的浅组织询问能力提供了更高的组织拉曼相对自体荧光背景比值,和

(iii) 结合这种新光纤共焦拉曼光谱平台与良好记载的多变量分析使上皮分子信息能够被提取并实时体内分析。整个共焦显微拉曼内窥镜系统在直观的软件框架中控制,其允许采用到内窥镜检查者的听觉概率反馈来允许在内窥镜筛选设置中的快速调查,推动拉曼光谱的前沿进入常规临床诊断。

[0215] 总共有 450 名患者在用于各种迹象的监视或筛选的拉曼内窥镜检查中登记,包括消化不良和上消化道瘤形成。在可疑病变的典型检查期间,每个组织的拉曼光谱测量可在 0.5 秒内采集,其允许较大组织区域的快速检查。从具有在上消化道中不同组织学亚型的 373 个患者采集的拉曼光谱数据已被用来构造综合拉曼库 (>12000 拉曼光谱)。对于招募用于 BE 筛选和监视的患者,拉曼光谱分为以下三种病理风险的类别:(i)“普通”-柱状上皮层 (CLE), (ii)“低风险”BE- 定义为杯状细胞的存在, (iii)“高风险”-低度异常增生 (LGD) 和高度异型增生 (HGD)。例如,图 40A 示出从以不同的组织类型(例如,鳞状层 ($n = 165$), CLE ($n = 907$), 肠化生 (IM) ($n = 318$) 和 HGD ($n = 77$)) 呈现的我们数据库中的患者所测量的平均体内共焦拉曼光谱,如由组织病理学特征所证实的。每个拉曼光谱在 0.5 秒内被采集。为了比较的目的,光谱已经在 1445cm^{-1} 处被归一化为拉曼峰。显著的组织拉曼峰可以在如下周围观察到: 936cm^{-1} (ν (C-C) 蛋白质)、 1004cm^{-1} (苯丙氨酸的 ν_s (C-C) 环呼吸)、 1078cm^{-1} (脂质的 ν (C-C))、 1265cm^{-1} (蛋白质的酰胺 III ν (C-N) 和 δ (N-H))、 1302cm^{-1} (蛋白质的 CH_2 扭曲和摇摆)、 1445cm^{-1} (蛋白质和脂类的 δ (CH_2) 变形)、 1618cm^{-1} (吡啉的 ν (C=C))、 1655cm^{-1} (蛋白质的酰胺 I ν (C=O)) 和 1745cm^{-1} (脂质的 ν (C=O))。显著的拉曼光谱差异(例如,峰值强度、移位和频带变宽)可以在不同的组织类型之间进行辨别。这些丰富的光谱特征描绘伴随 Barrett's 癌变的上皮中发生的生物分子和功能变化。虽然组织学检查识别杯状细胞和渐进的架构和细胞学异型的存在(图 40(B、C、D、E)),但是光纤共焦拉曼光谱揭示,上皮在整个 Barrett's 癌变序列中经历主要的功能和生物分子的变化。有趣的是,BE 的拉曼生物分子标志高度类似于异型增生,证实到肠化生表型的转化是在 Barrett's 癌变中的关键事件。这些高度特异性上皮分子标志可能反映了大量的内源光生物标志物(即,癌蛋白、DNA、粘蛋白表达、有丝分裂等)。因此,上皮拉曼光谱标志与组织病理学或组织化学的相关性可以加深在生物分子水平的原位 Barrett's 发生和进展的理解。目前,没有其它竞争光学光谱技术(如荧光、弹性散射光谱)可在内窥镜处提供在体内的这种详尽的分子特征。

[0216] 预测的(即独立)测量的组织部位的组织病理学表征的 152 个为 CLE ($n = 597$ 个光谱), 48 个为 IM ($n = 123$ 个光谱), 并且 9 个为 HGD ($n = 77$ 个光谱)。图 41A 示出在属于正常、低风险和高风险病变的共焦拉曼光谱的 77 个患者中的预测测量的风险计分的二维三元散点图。相应的二分法受试者工作特征曲线 (ROC) 曲线也分别以在 0.88、0.84 和 0.90 曲线 (AUC) 下的区域从图 3A 中产生的,用于在正常的、低风险和高风险病变之间的辨别。不仅共焦拉曼技术区分具有 BE 低风险病变(图 41A),还能够客观定位包含异常增生上皮的特异性组织区域。上述 ROC 分析示出,以高风险组织的检测为目标可以实时成功实现,产生在光谱基础上的 87.0% (67/77) 的诊断灵敏度和 84.7% (610/720) 的特异性。

[0217] 在上述的说明中,实施例是所公开的系统和方法的例子或实施方式。“一个实施例”、“实施例”或“一些实施例”的各种出现不一定都指代相同的实施例。

[0218] 虽然所公开的系统和方法的各种特征可在单个实施例的上下文中进行描述,但是

该特征也可以单独地或以任何适当的组合提供。相反地,虽然为清楚起见,所公开的系统和方法可以在本文中在单独实施例的上下文中描述,但是所公开的系统和方法也可以在单个实施例中实现。

[0219] 此外,还应当理解,所公开的系统和方法可以各种方式执行或实施,并且可以在除了上述说明中概述的之外,在实施例中实现。

[0220] 在此使用的技术和科学术语含义应通常为如由属于本领域的普通技术人员所理解,除非另有定义。

[0221] 本发明的某些方面包括以一个方法形式在此描述的过程步骤和指令。应当指出的是,本公开的过程步骤和指令可体现在软件、固件或硬件中,并且当以软件体现时,可以被下载以驻留在并且由实时网络操作系统所使用的不同平台所操作。

[0222] 本发明还涉及用于执行这里操作的设备。该设备可以被特别地构造用于所需目的,或者它可以包括通用计算机,该通用计算机选择性激活或由存储在能够由计算机访问的计算机可读介质上的计算机程序来重新配置。这种计算机程序可以存储在有形的非临时性计算机可读存储介质中,诸如但不限于任何类型的盘,包括软盘、光盘、CD-ROM、磁光盘、只读内存 (ROM)、随机存取内存 (RAM)、EPROM、EEPROM、磁卡或光卡、专用集成电路 (ASIC),或适于存储电子指令的任何类型介质,并且每一个都耦合到计算机系统总线。此外,在本说明书中提到的计算机可以包括单个处理器或者可以是采用多处理器设计以提高计算能力的体系结构。

[0223] 本文中所呈现的方法和操作并不固有地涉及任何特定计算机或其它装置。各种通用系统也可根据本文的教导与程序一起使用,或者它可以证明构造更加专业的设备以执行所需方法步骤的便利性。用于多种这些系统的所需结构对于本领域的那些技术人员连同等效变体将是显而易见。另外,本公开不参考任何特定的编程语言来描述。可以理解的是,各种编程语言可以用于实现如本文所述的本公开的教导,并且对于特定语言的任何参考被提供用于启用的公开和本公开的最优模式。

[0224] 本申请非常适合在众多的拓扑上各种各样的计算机网络系统。在这个领域中,大型网络的配置和管理包括存储设备和计算机,其通过网络,例如因特网、公共网络、私有网络或使计算系统之间的通信可行的其它网络,通信地耦合到不同的计算机和存储设备。最后,应该指出的是,在本说明书中使用的语言原则上选择用于可读性和指导性的目的,并且可能没有被选择以描绘或限制发明的主题。因此,本发明的公开意在是说明性,而不是限制在所附权利要求中阐述的本公开范围。

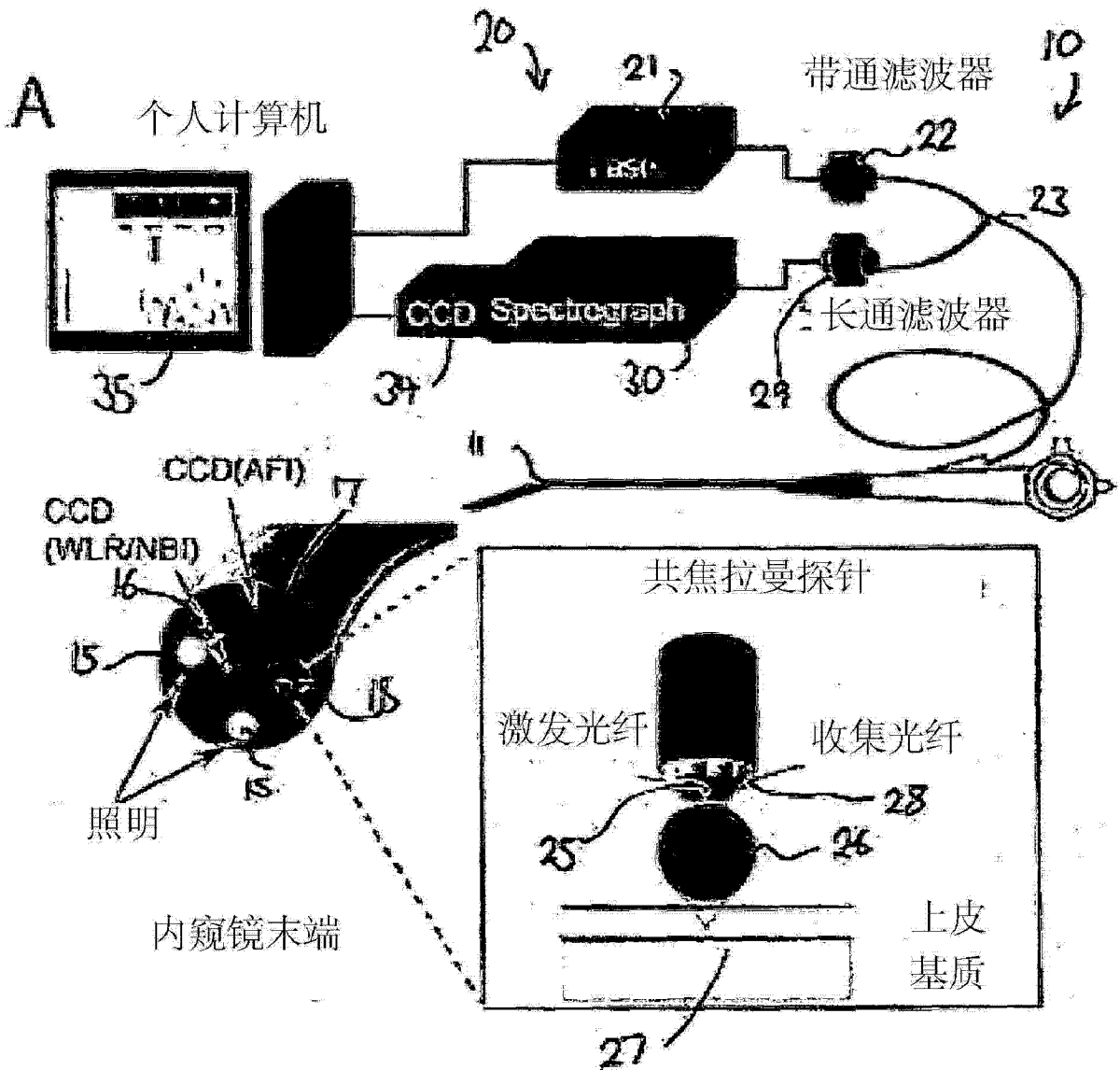


图 1a

图 1b

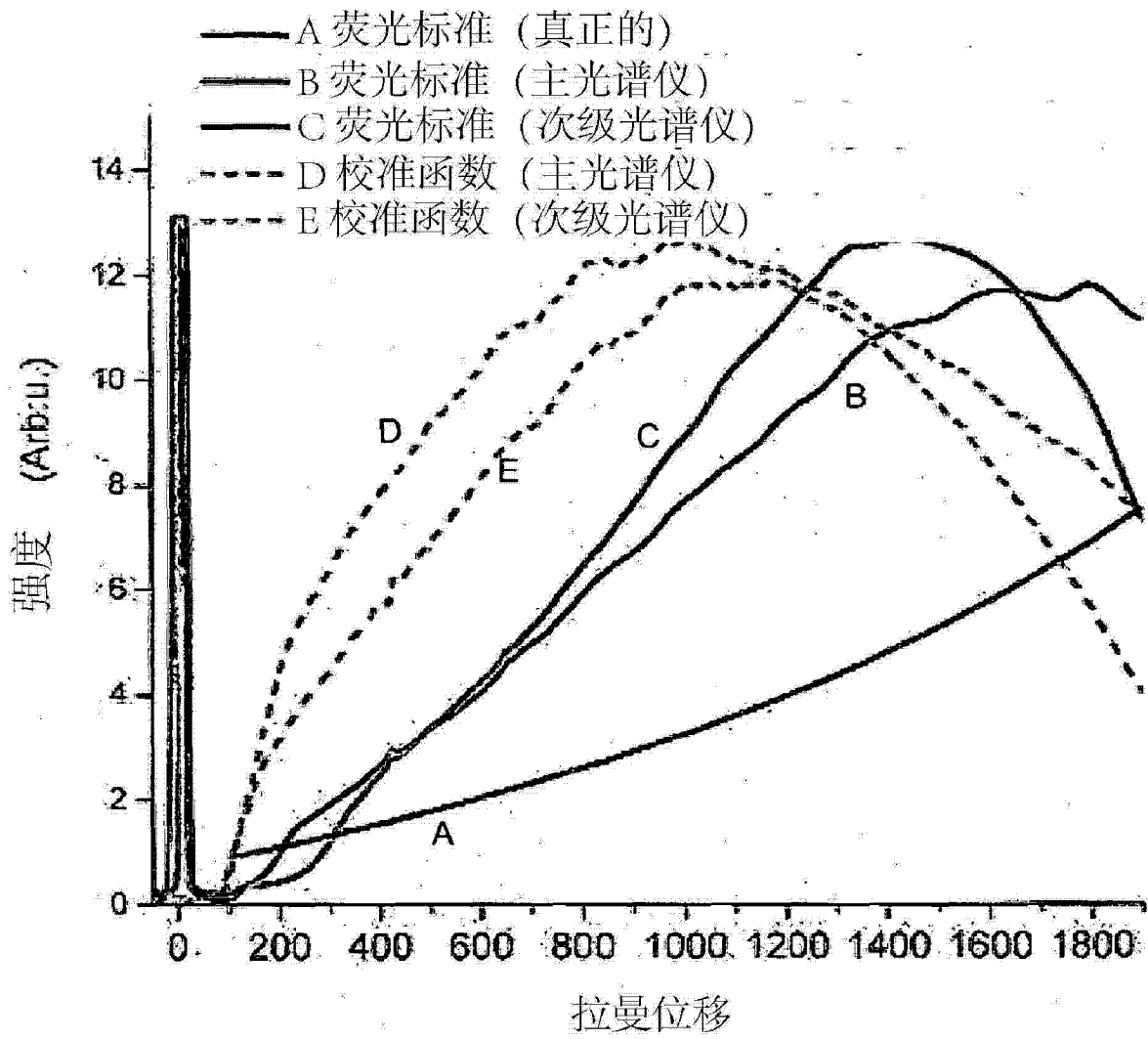


图 2

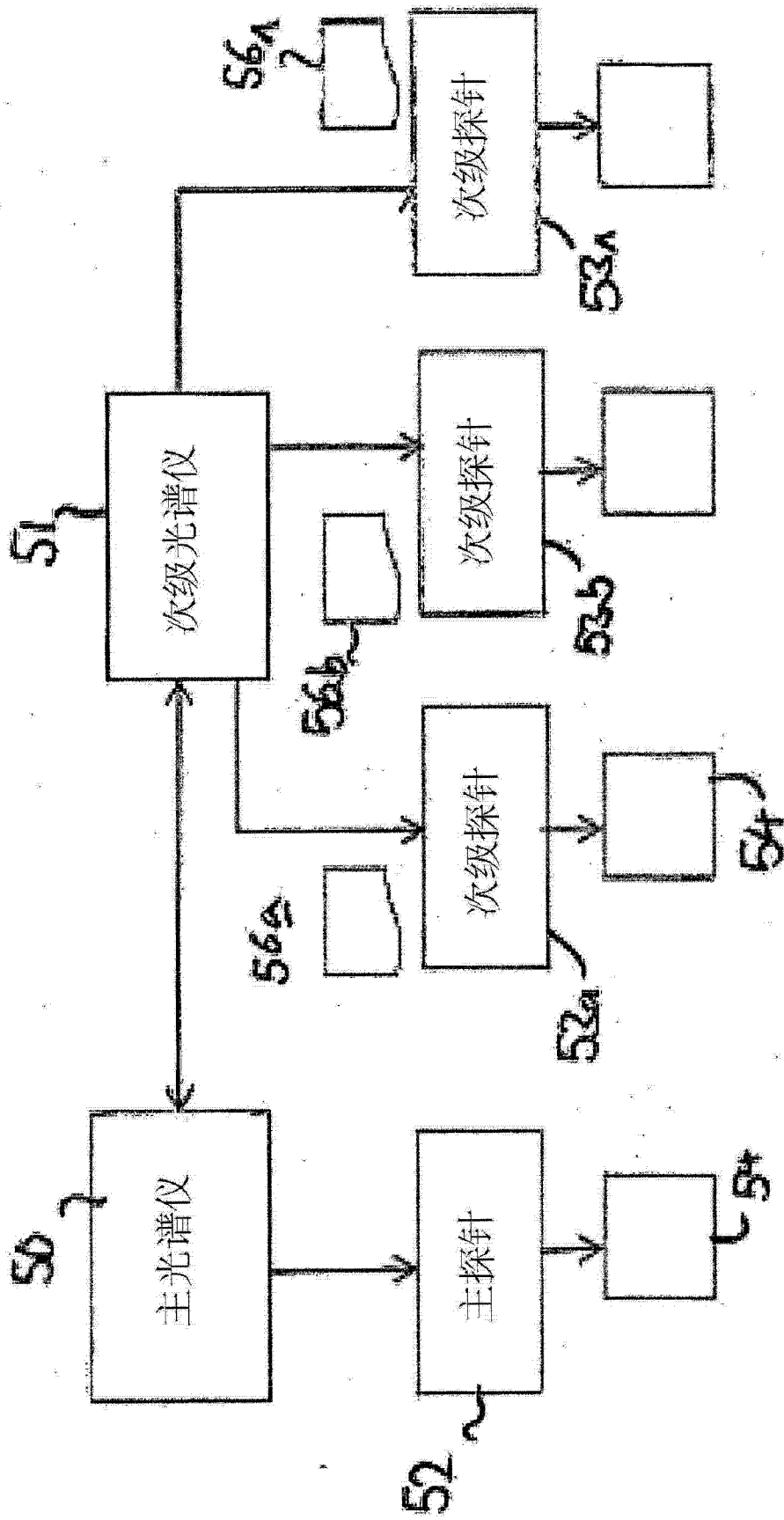


图 3

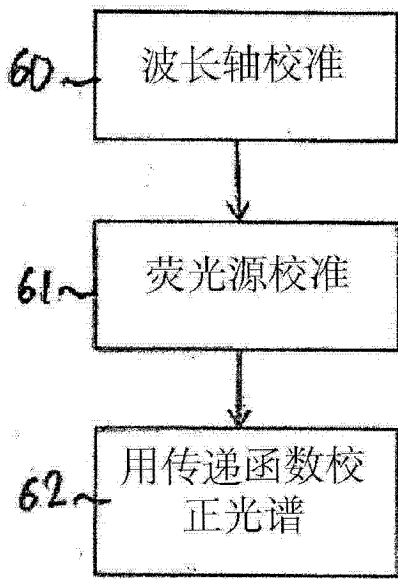


图 4a

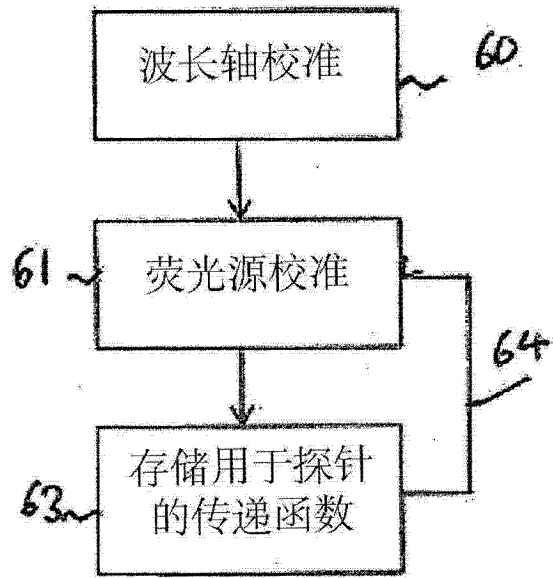


图 4b

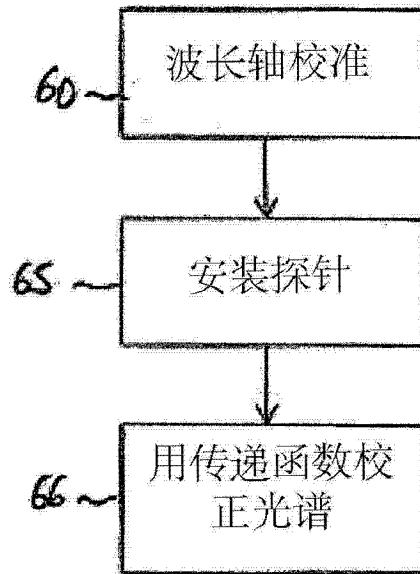


图 4c

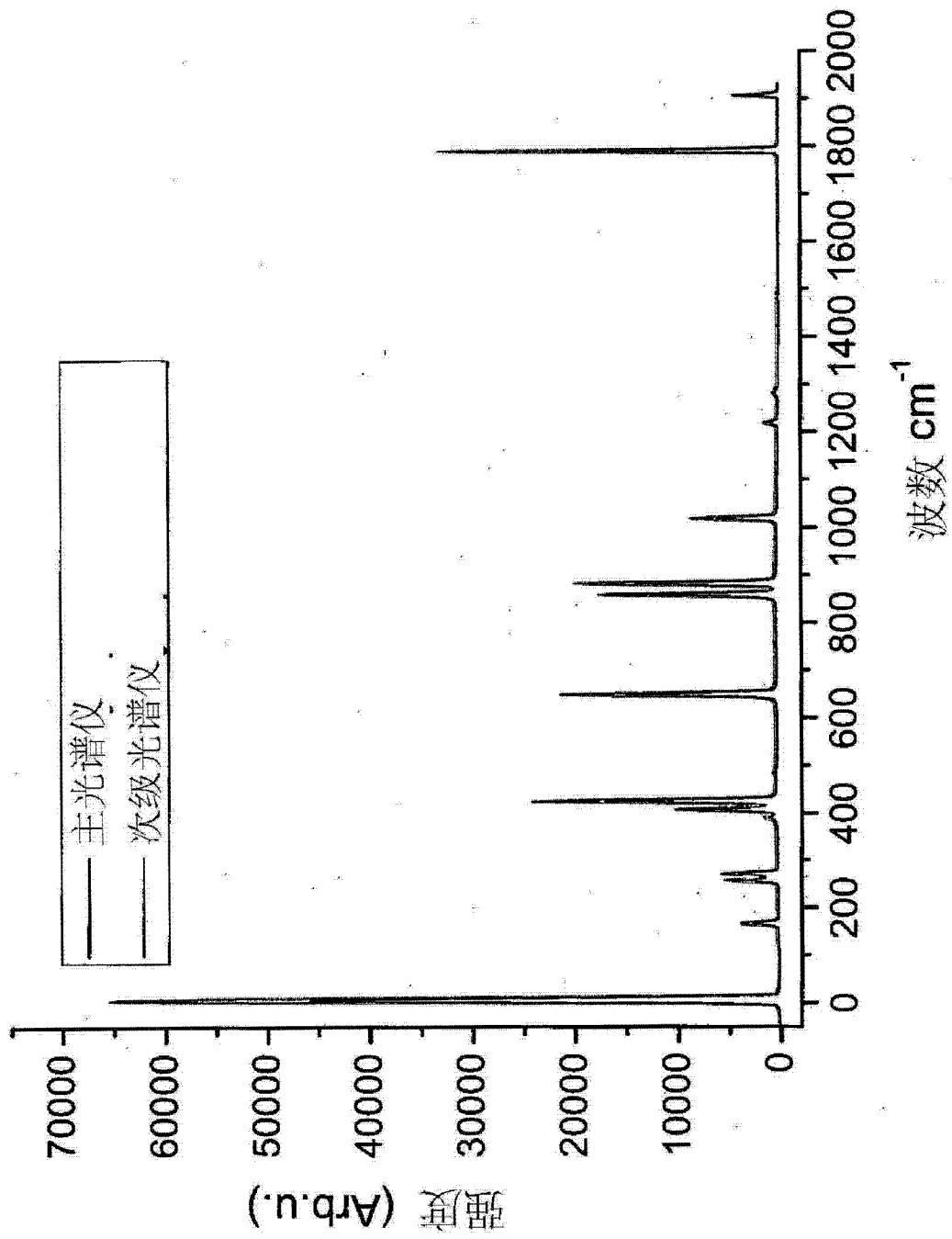


图 5

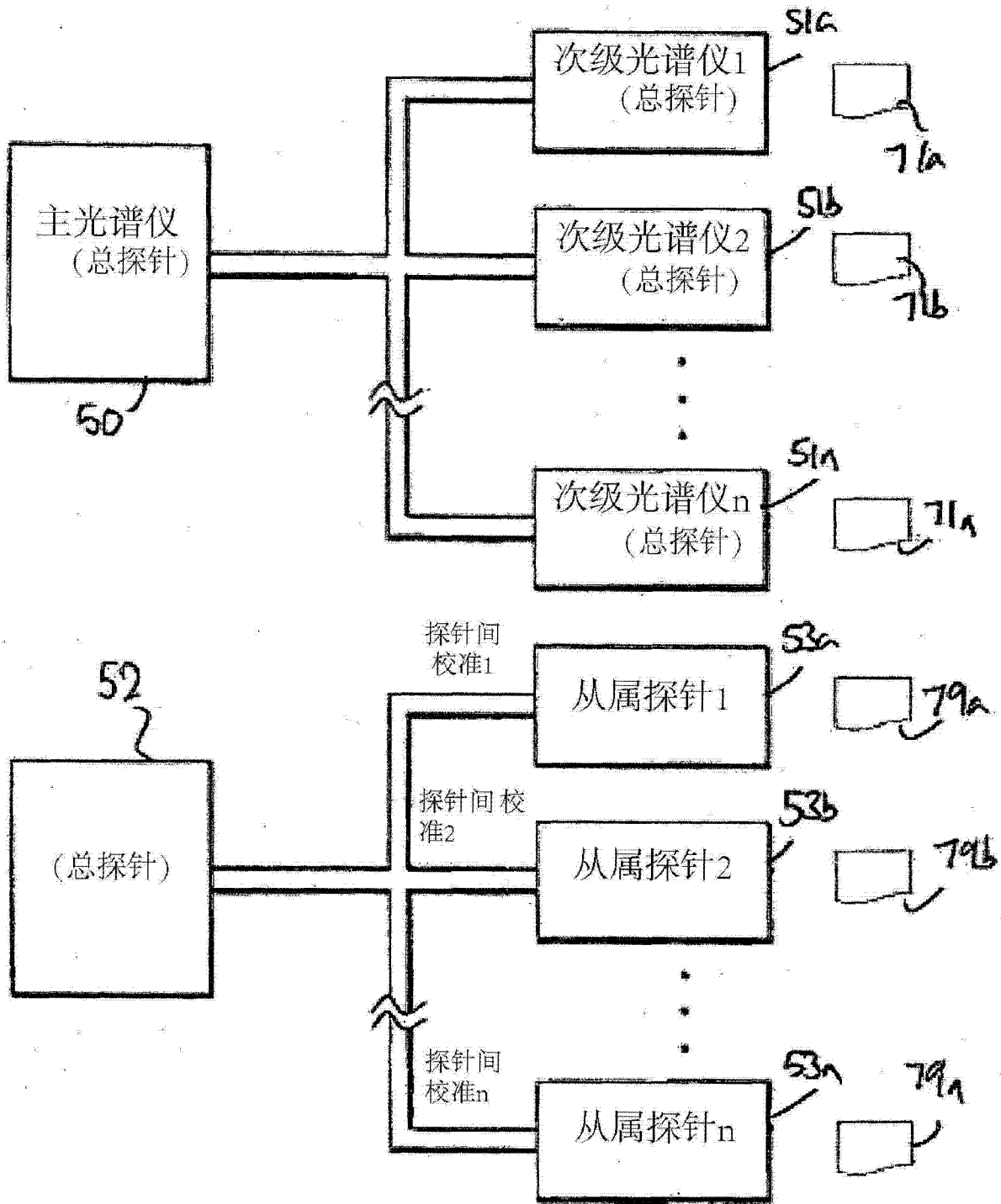


图 6

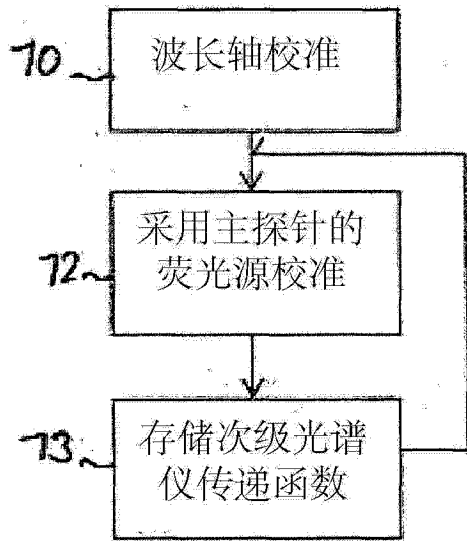


图 7a

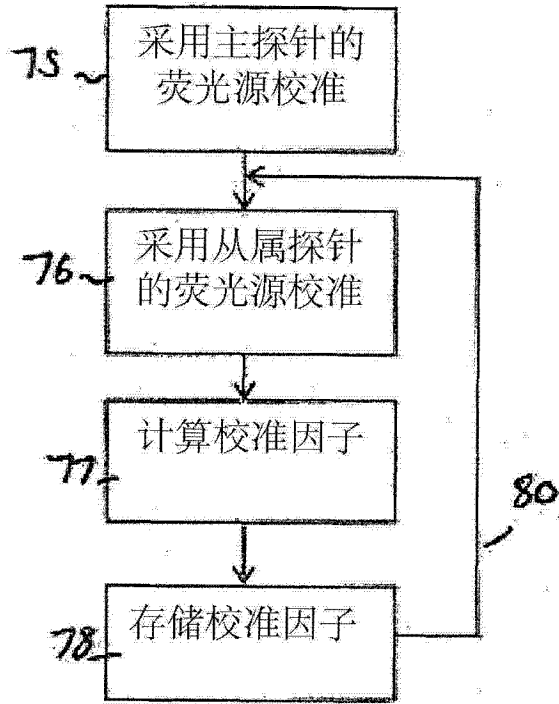


图 7b

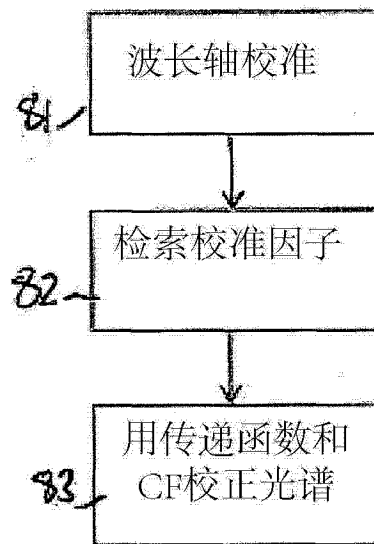


图 7c

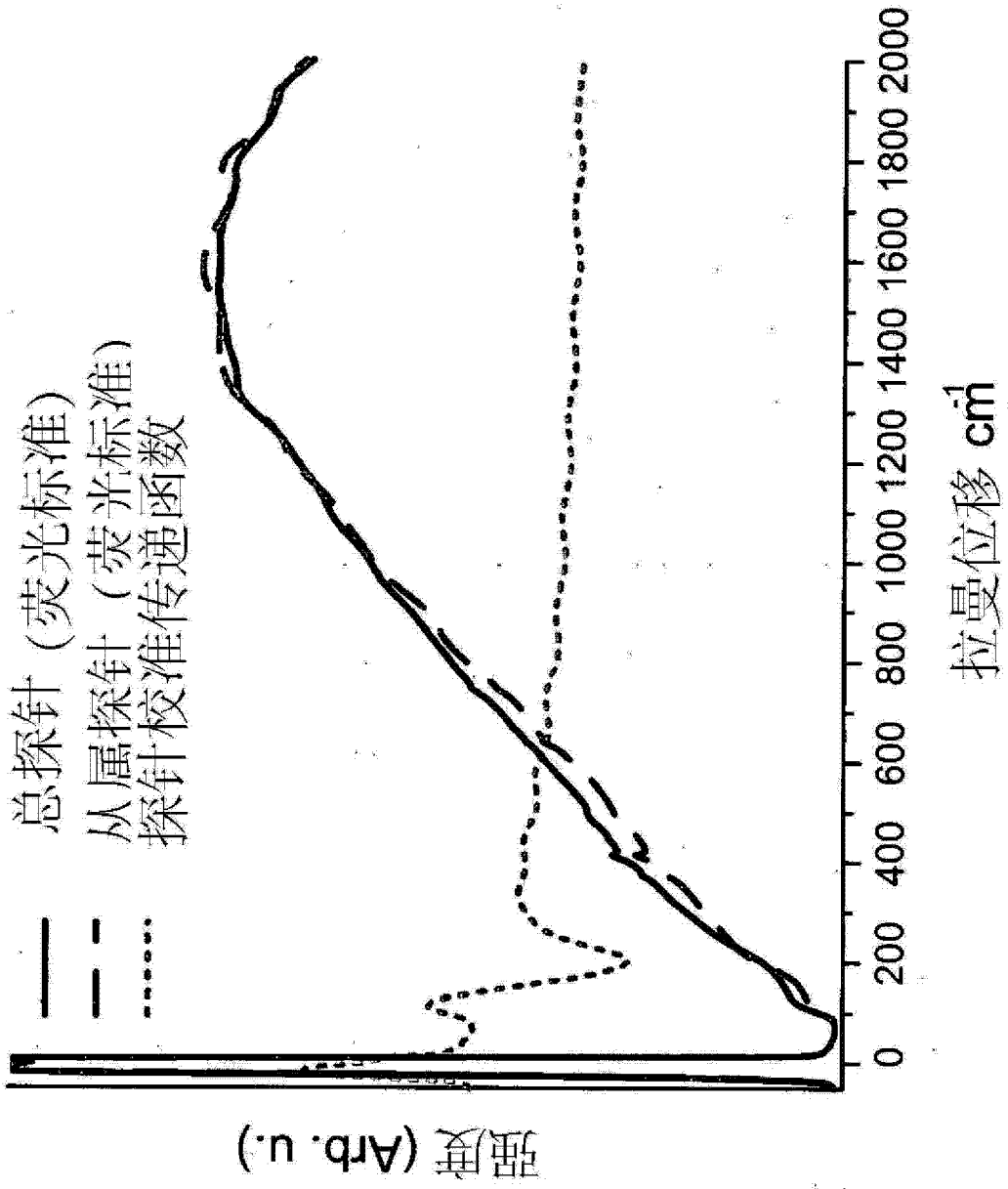


图 8

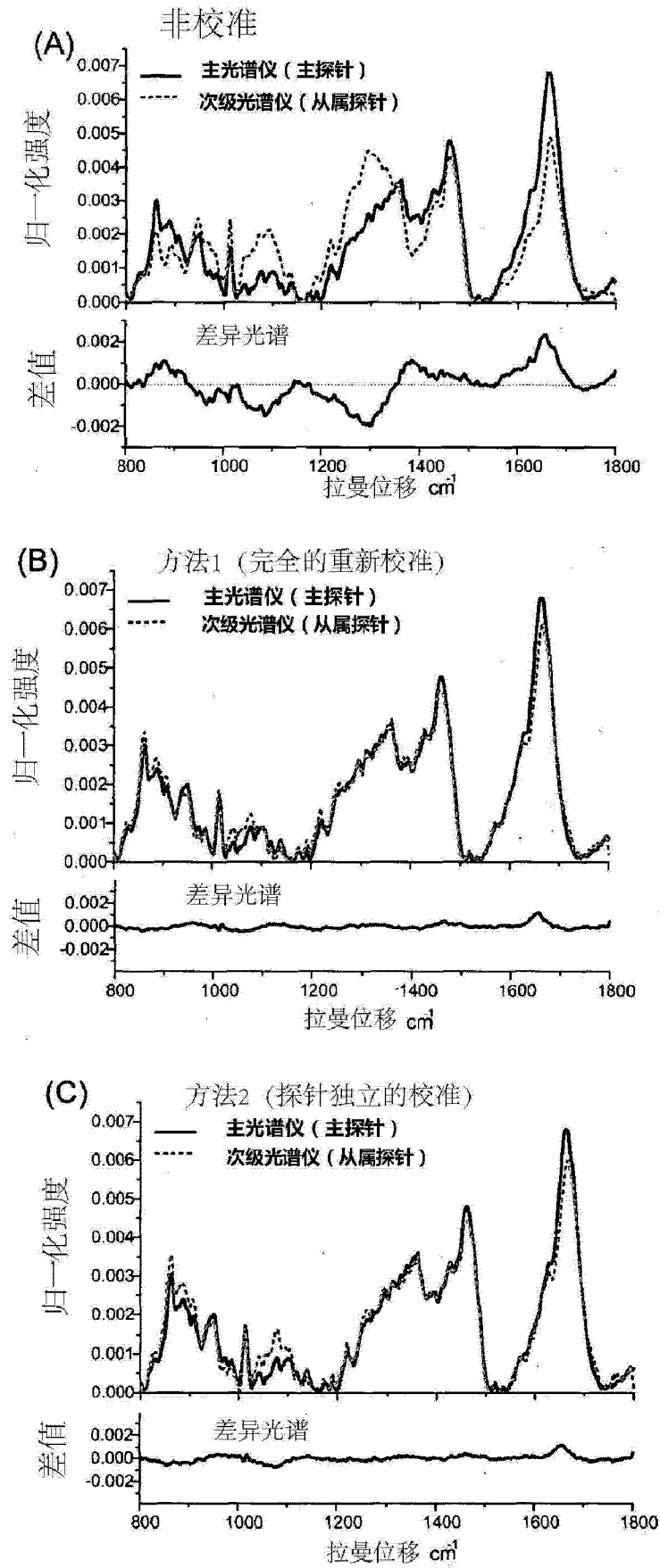


图 9

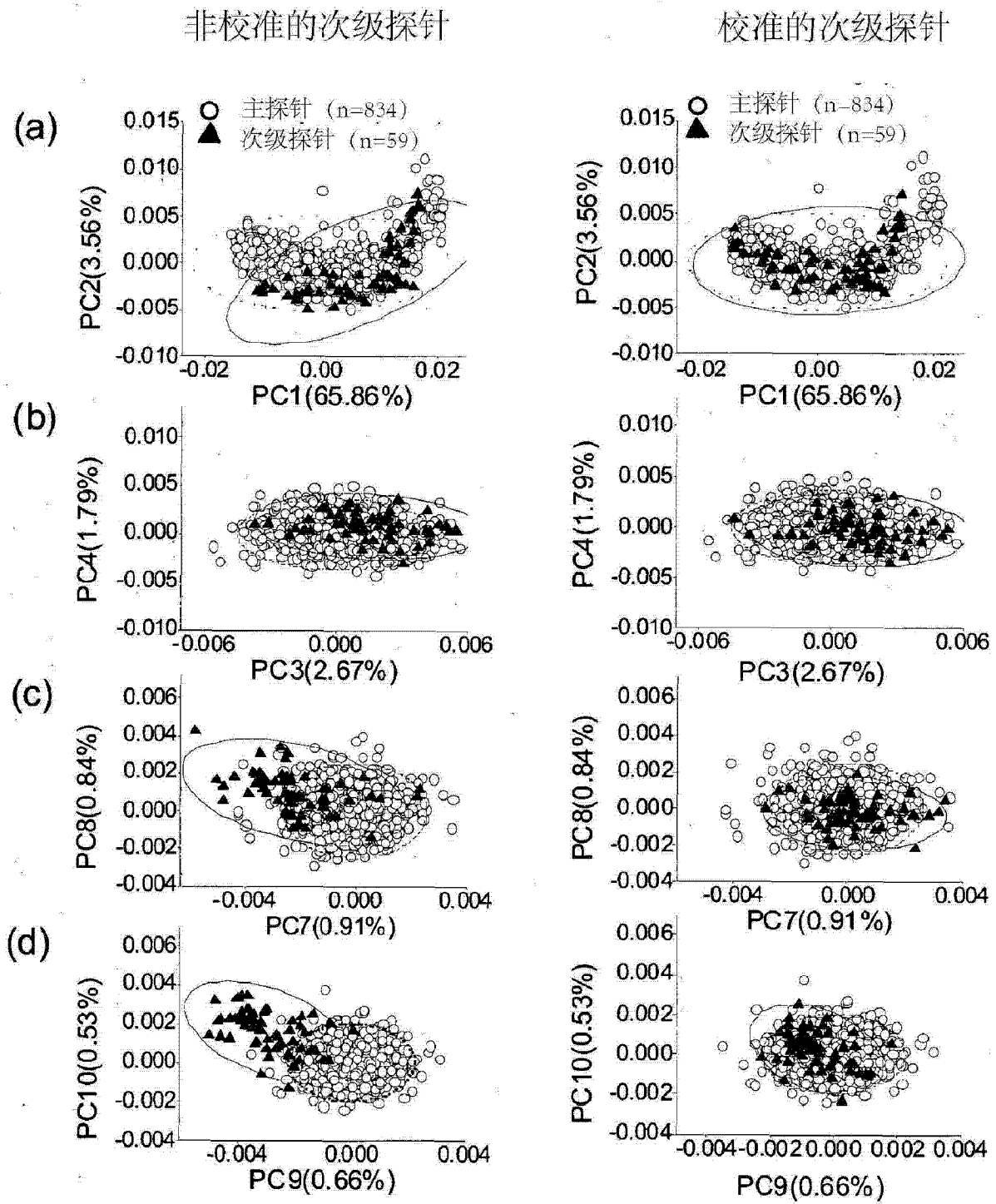


图 10

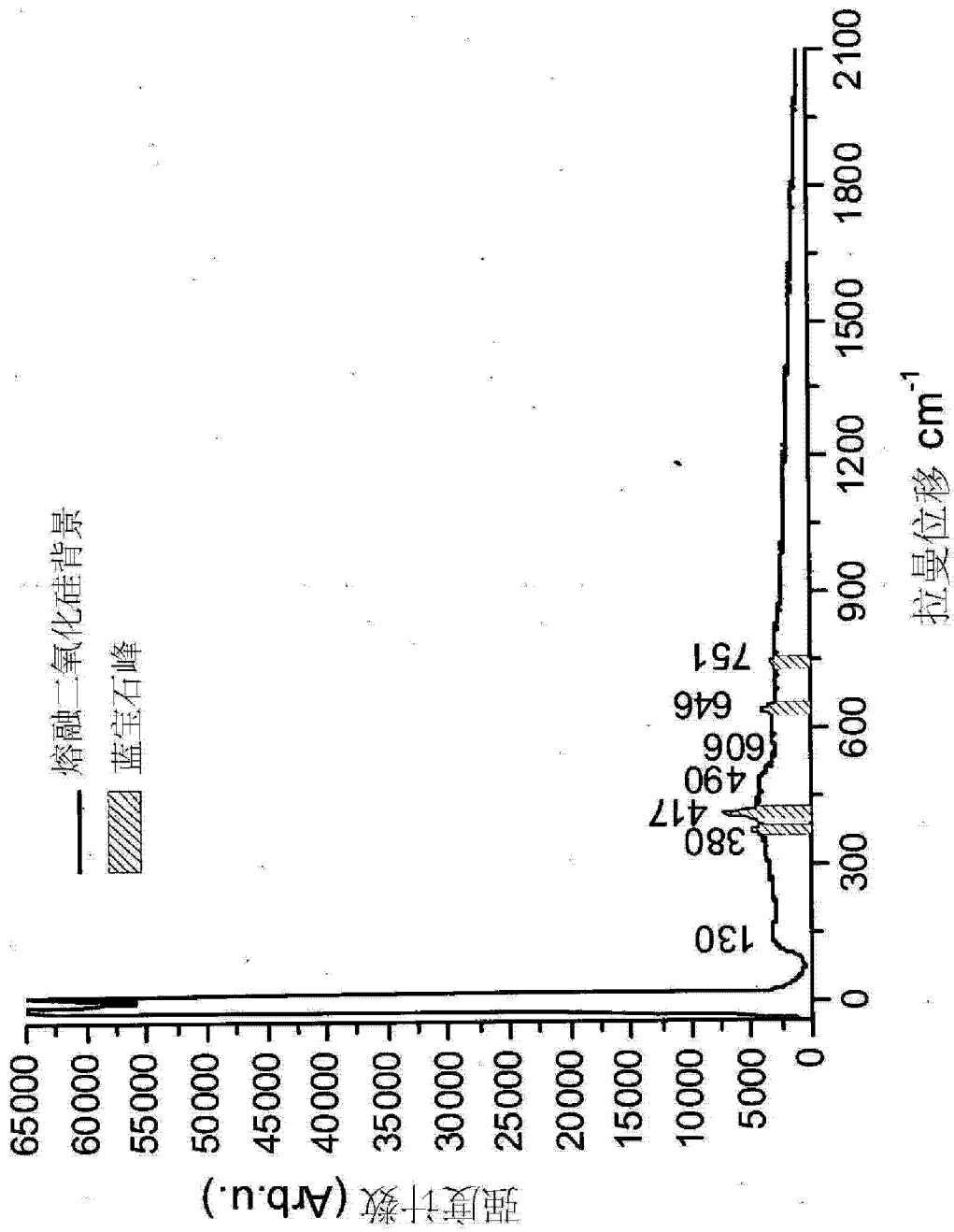


图 11

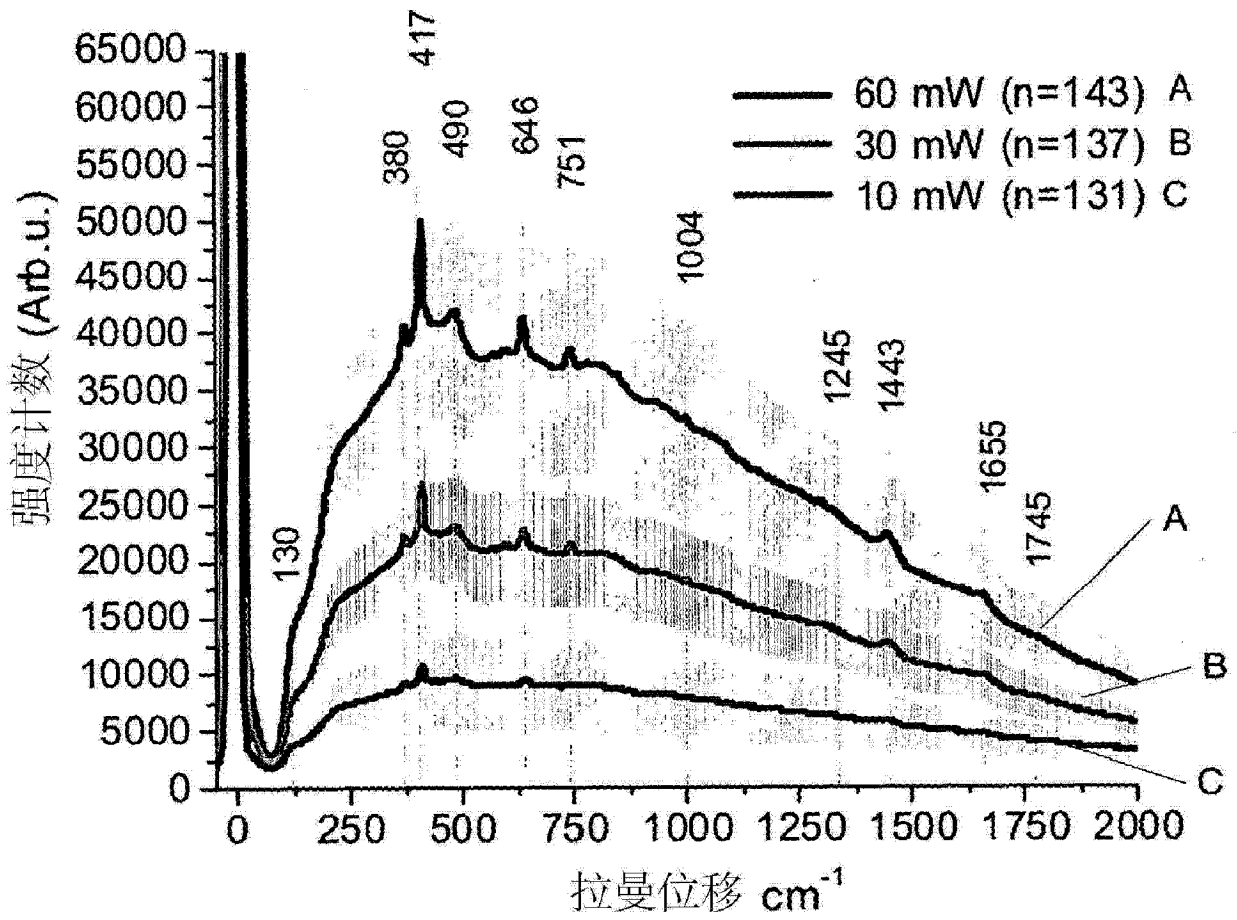


图 12

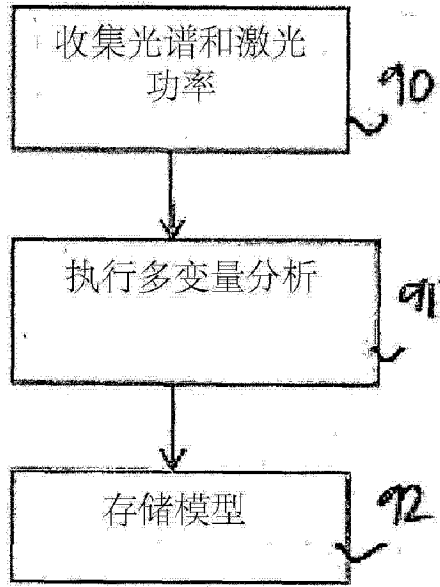


图13A

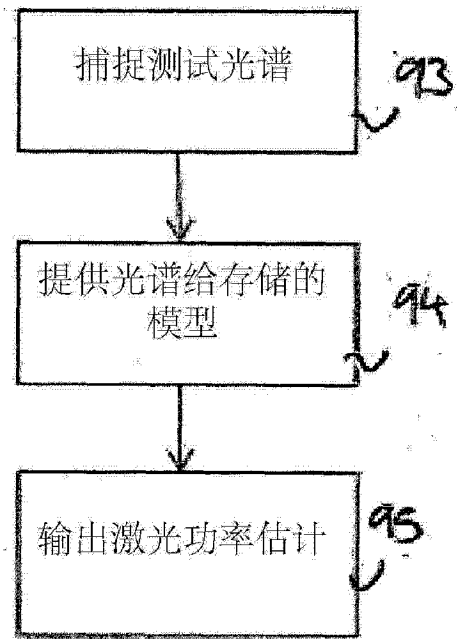


图13B

图 13

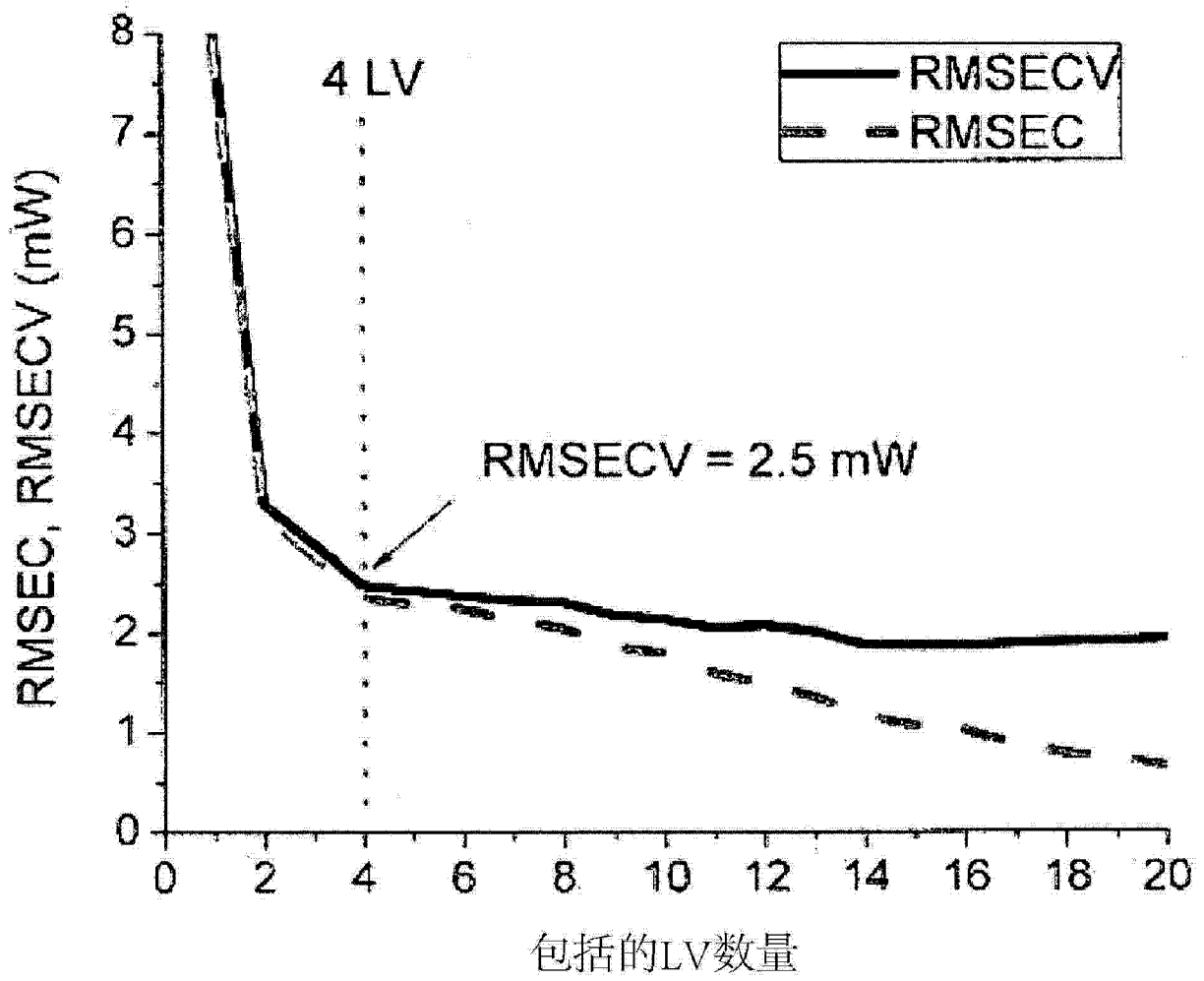


图 14A

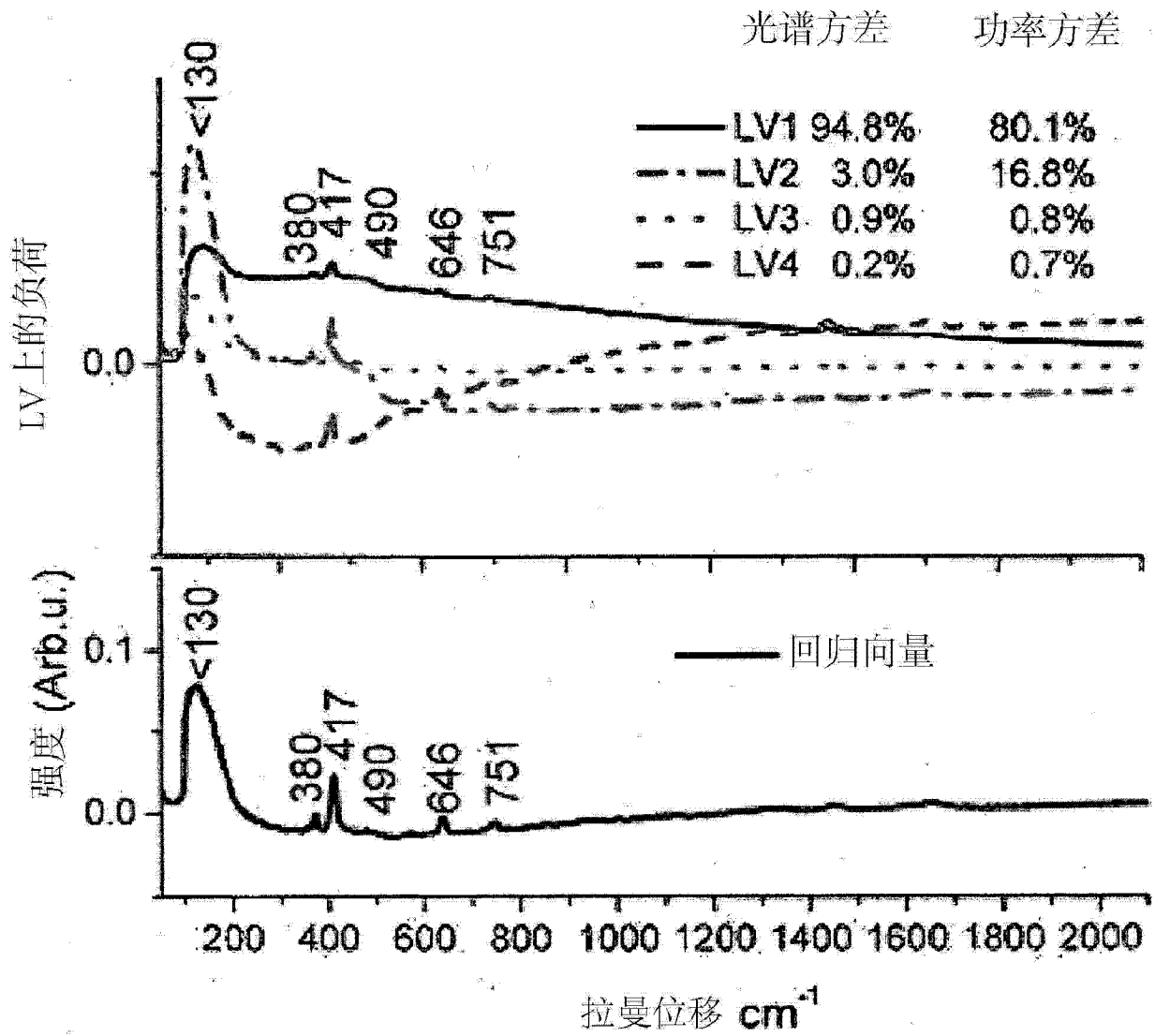


图 14B

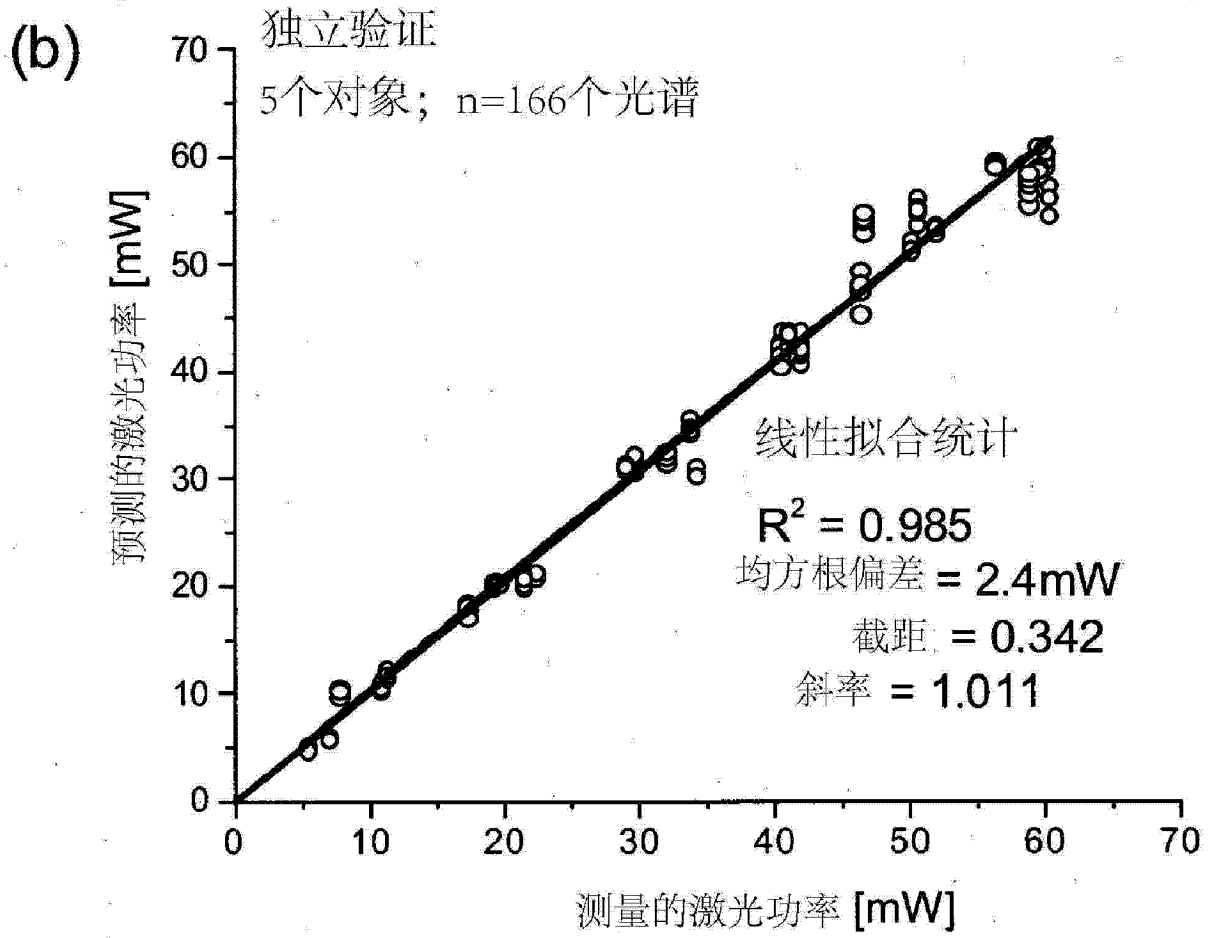


图 15

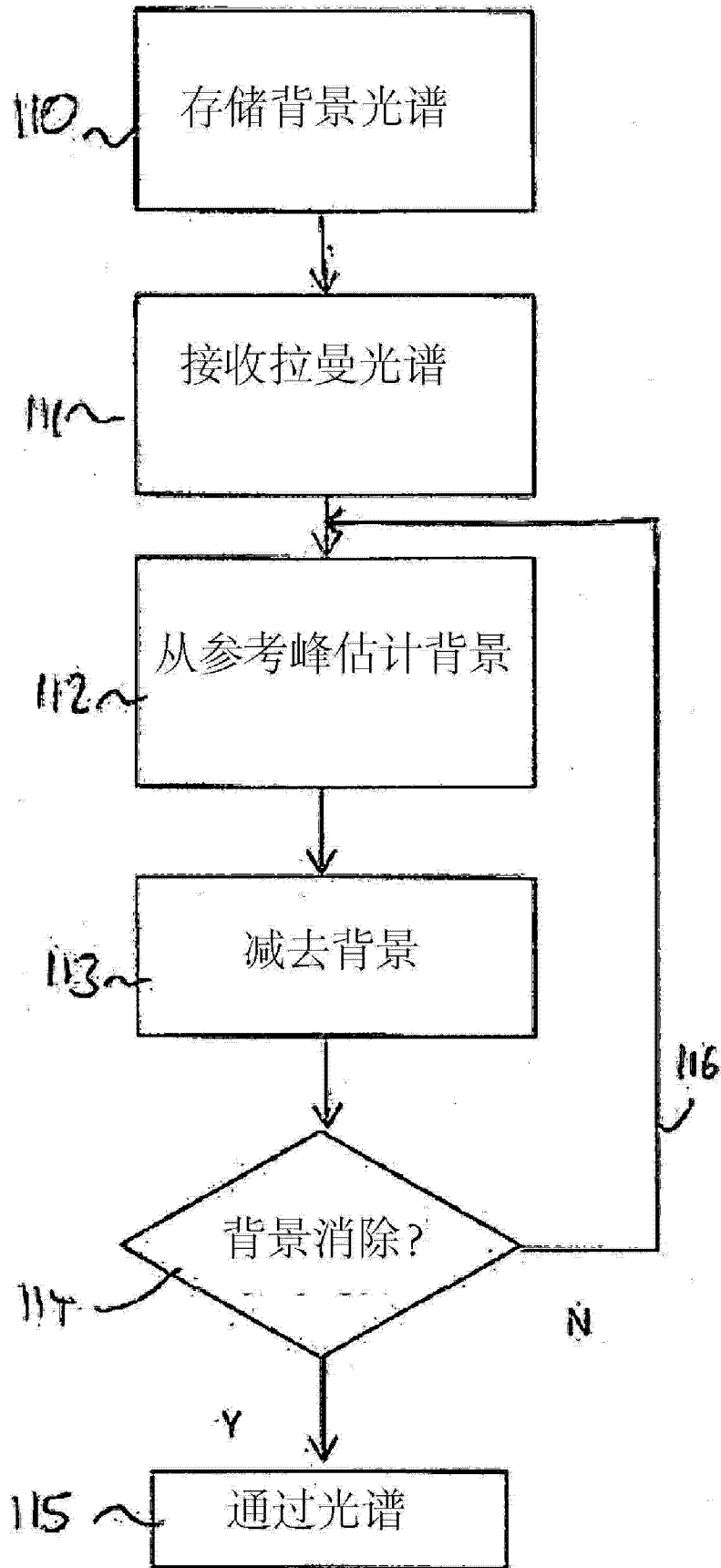


图 16

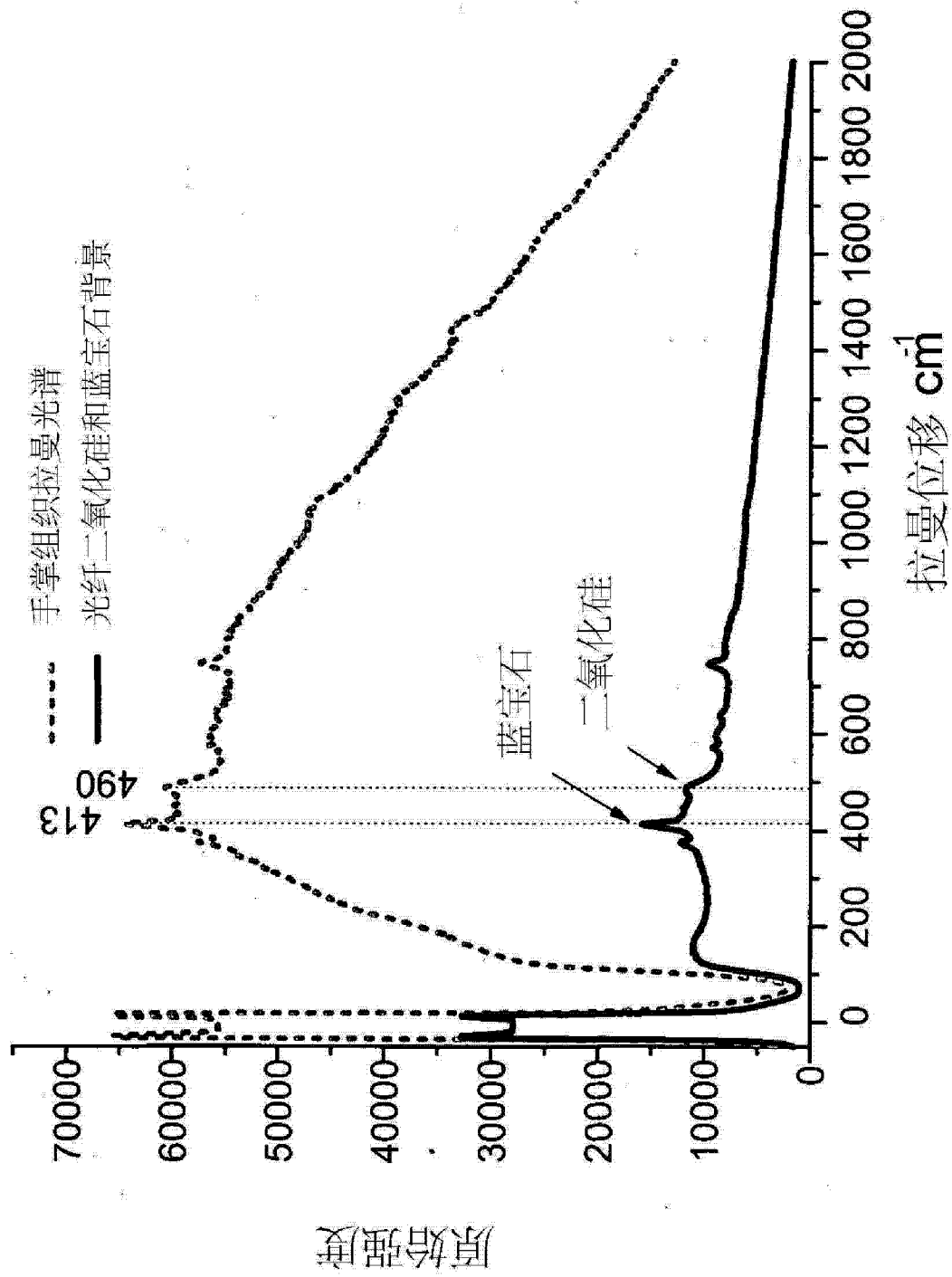


图 17

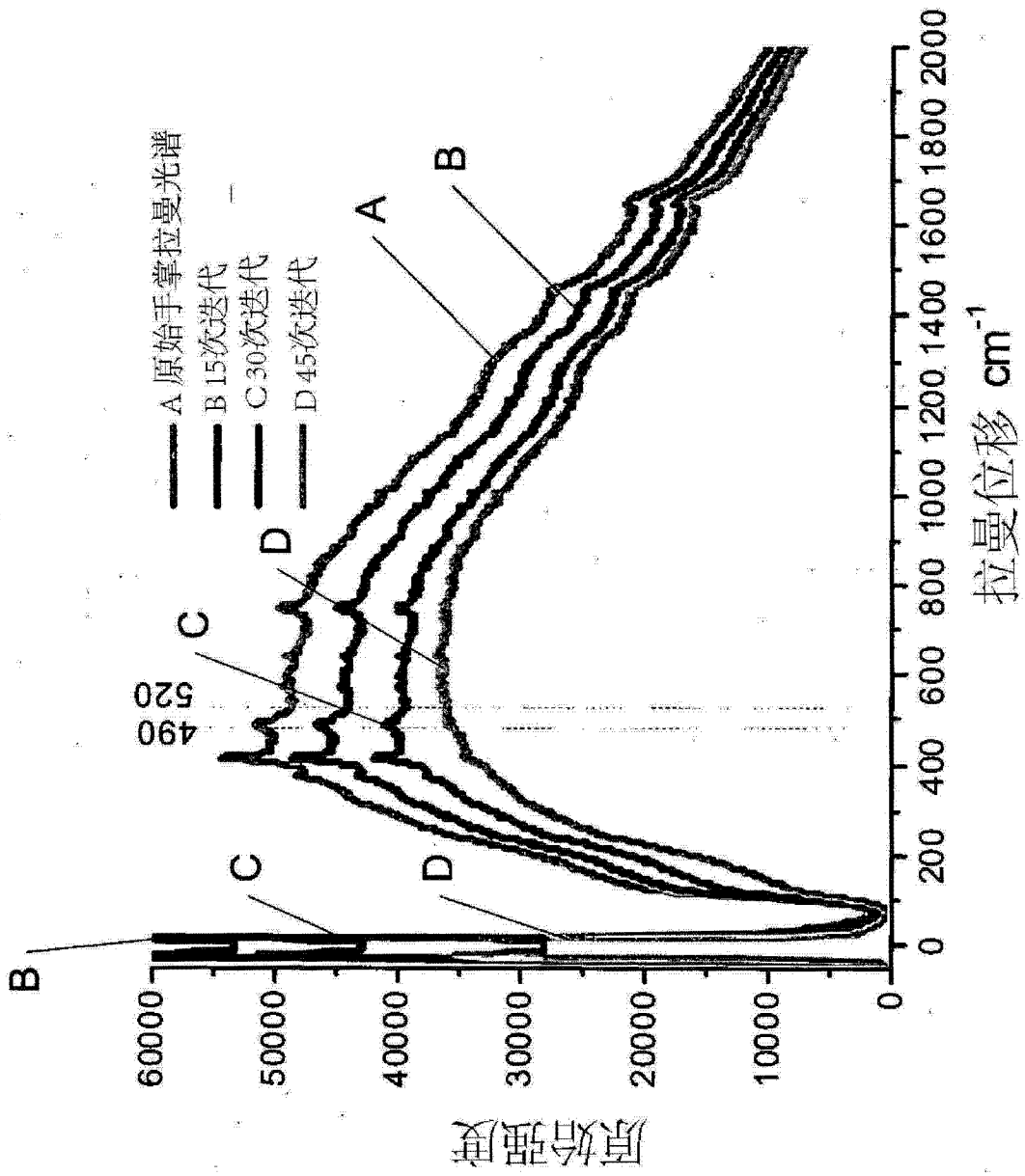


图 18

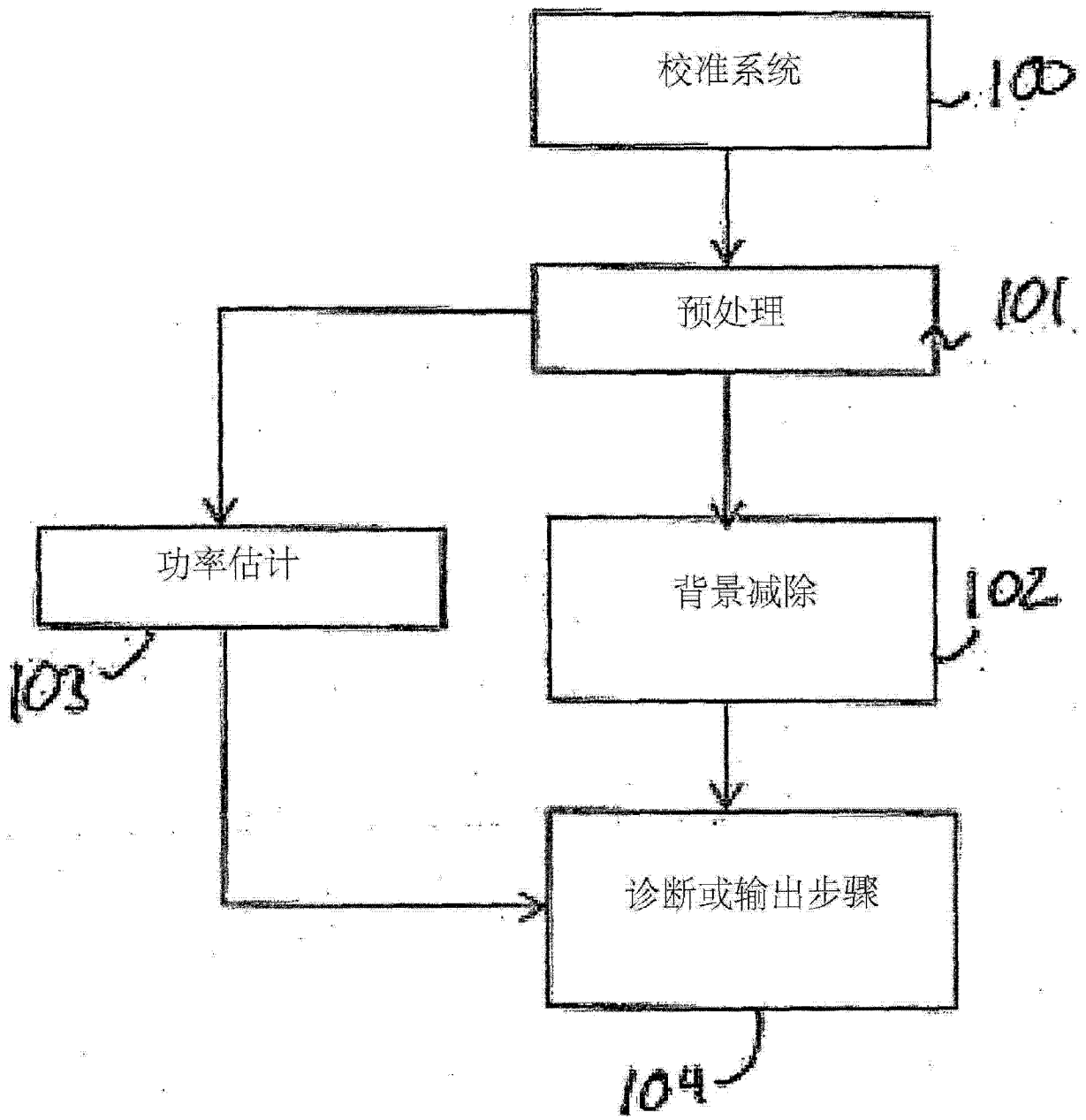


图 19

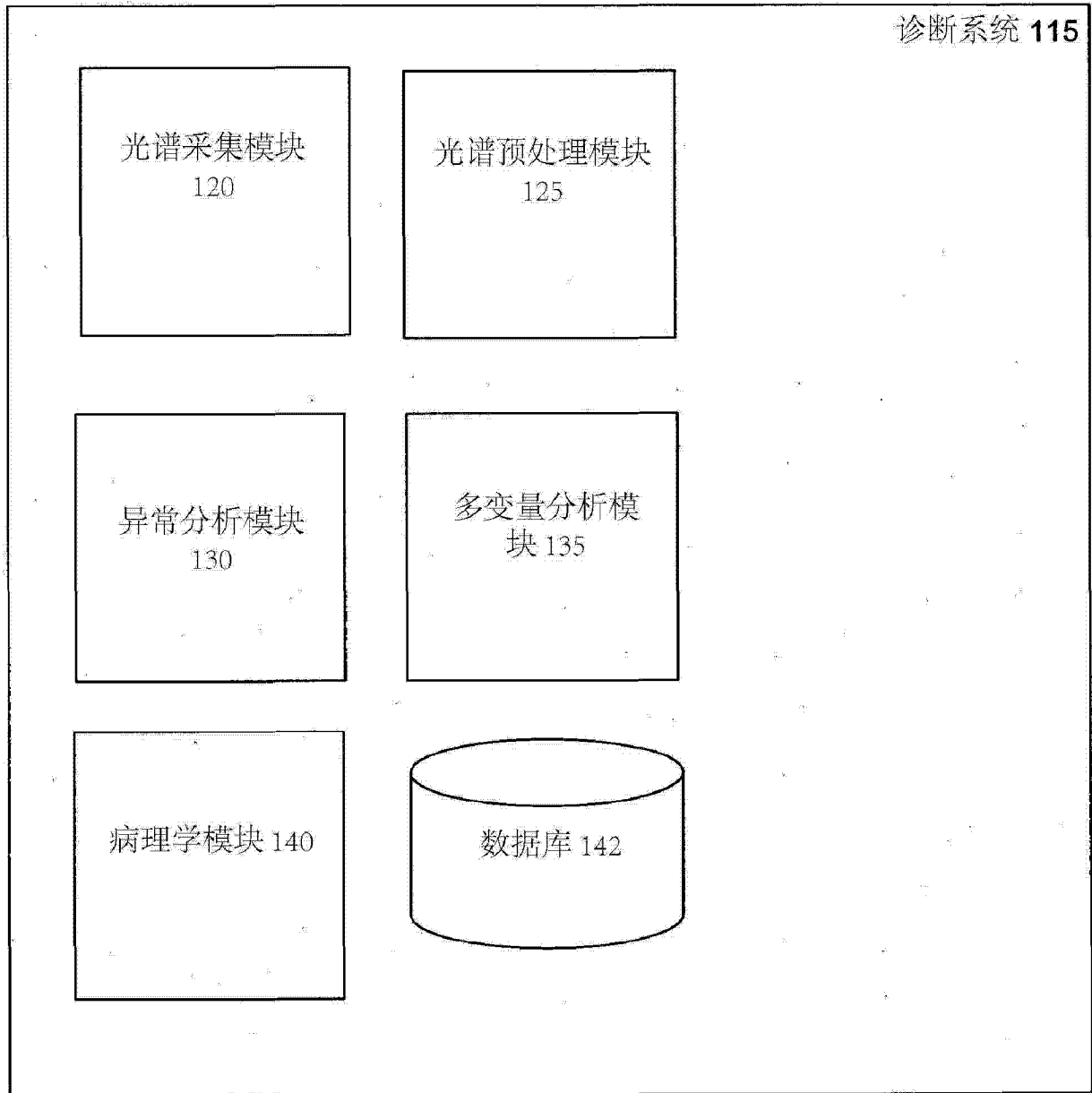


图 20

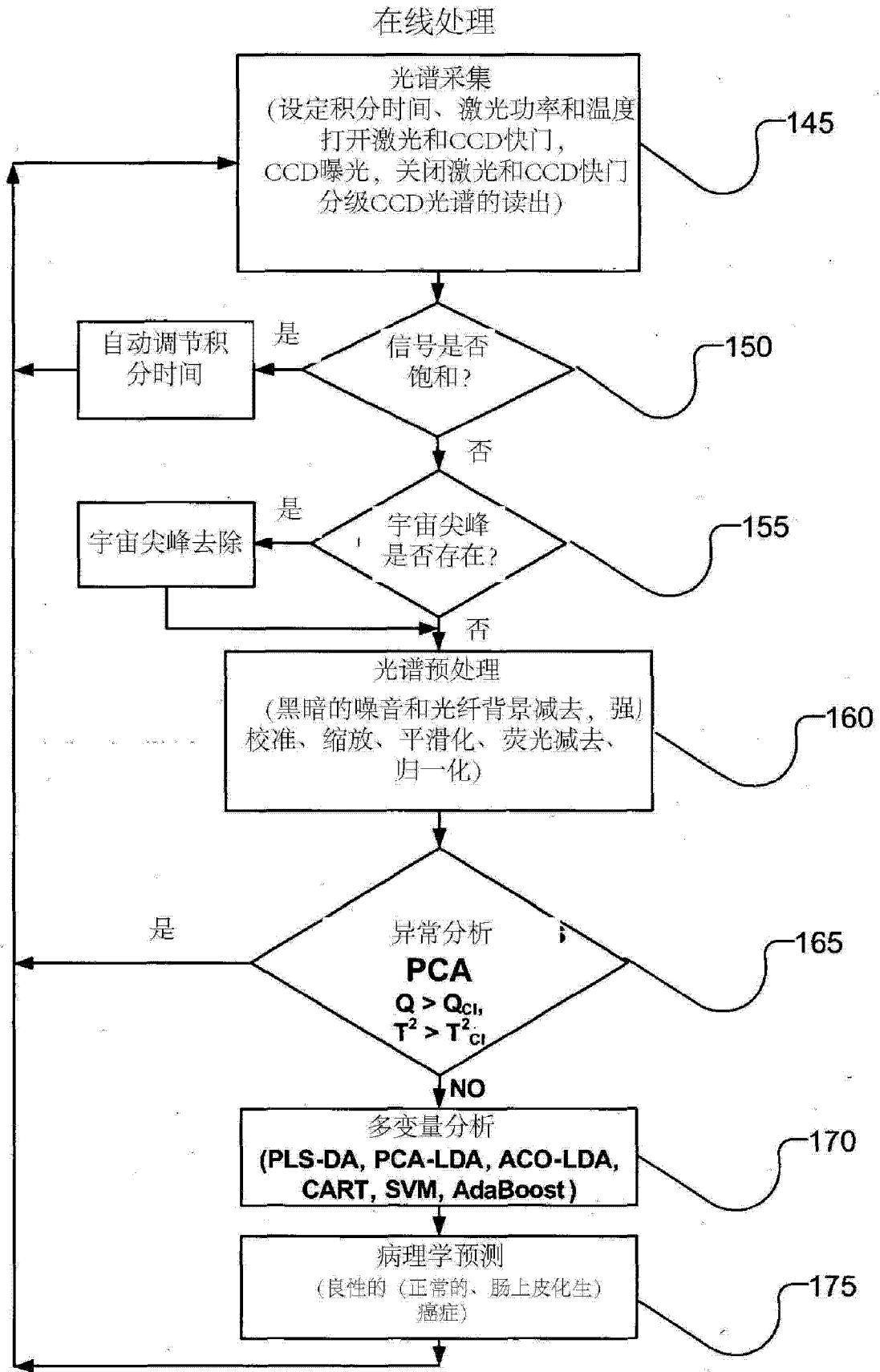
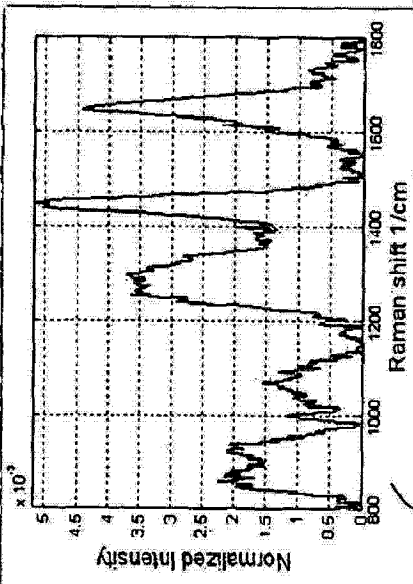
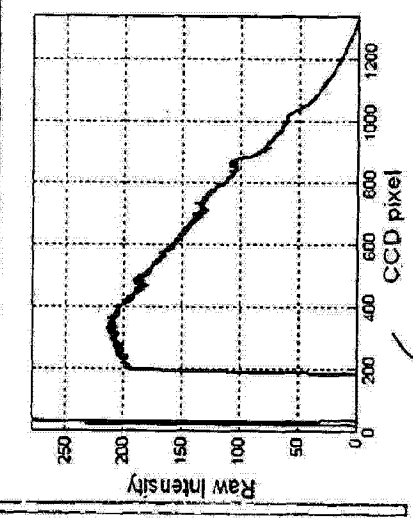
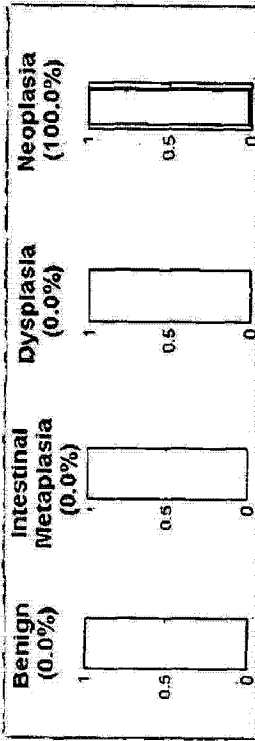
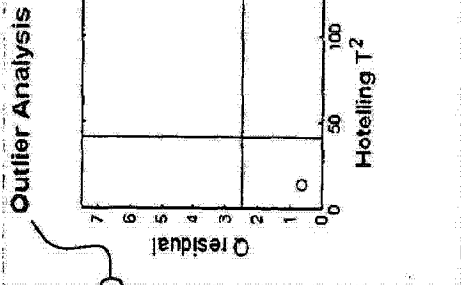


图 21

195

Raman Endoscopy Diagnostics

High Risk



Acq. Parameters

Algorithms: PLS-DA CART PCA-LDA SVM ACO-LDA Adaboost

Controls: Save Data Load Data Delete Files Clear

Patient code: Clinician: Dr AS

Patient 298

Temp(C): -120

System: Acq. fiber BG Lead Kopp Coll Run top

Laser Power(mW): 95

Polynom. order: 5

Options: Calibration Dark

SavGol width: 5

Controls

Acq Time(s): 0.2

Auto adjust

Max Accumulations: 0.5

Origin: Oral cavity Nasopharynx Larynx Esophagus Gastric

Start

Laser ON

N1 (A1)	N2 (A2)	N3 (B1)	N4 (B2)	N5 (C1)
L6 (B)	L7	L8	L9	L10
L11	L12	L13	L14	L15

190

185

180

图 22A

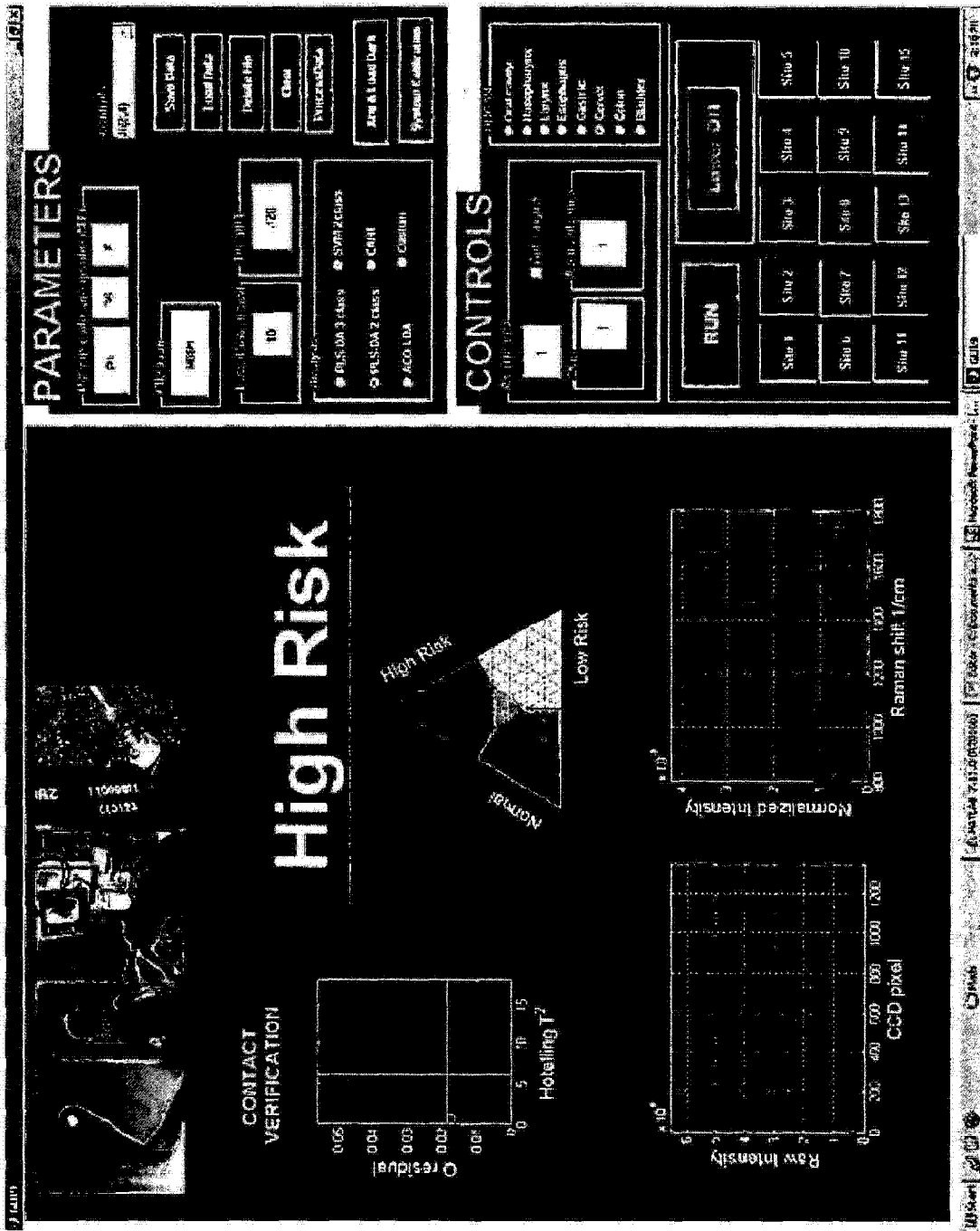


图 22B

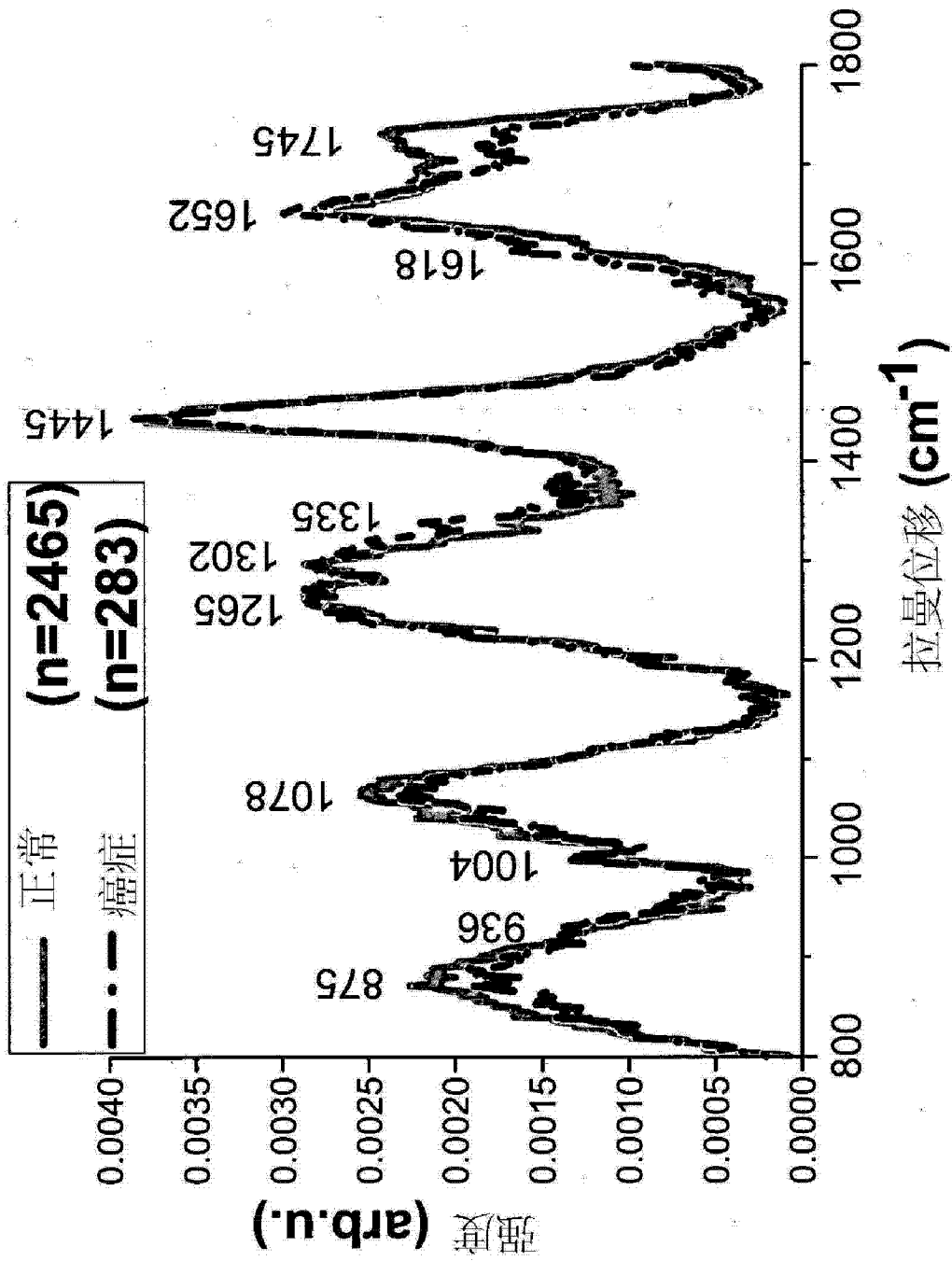


图 23

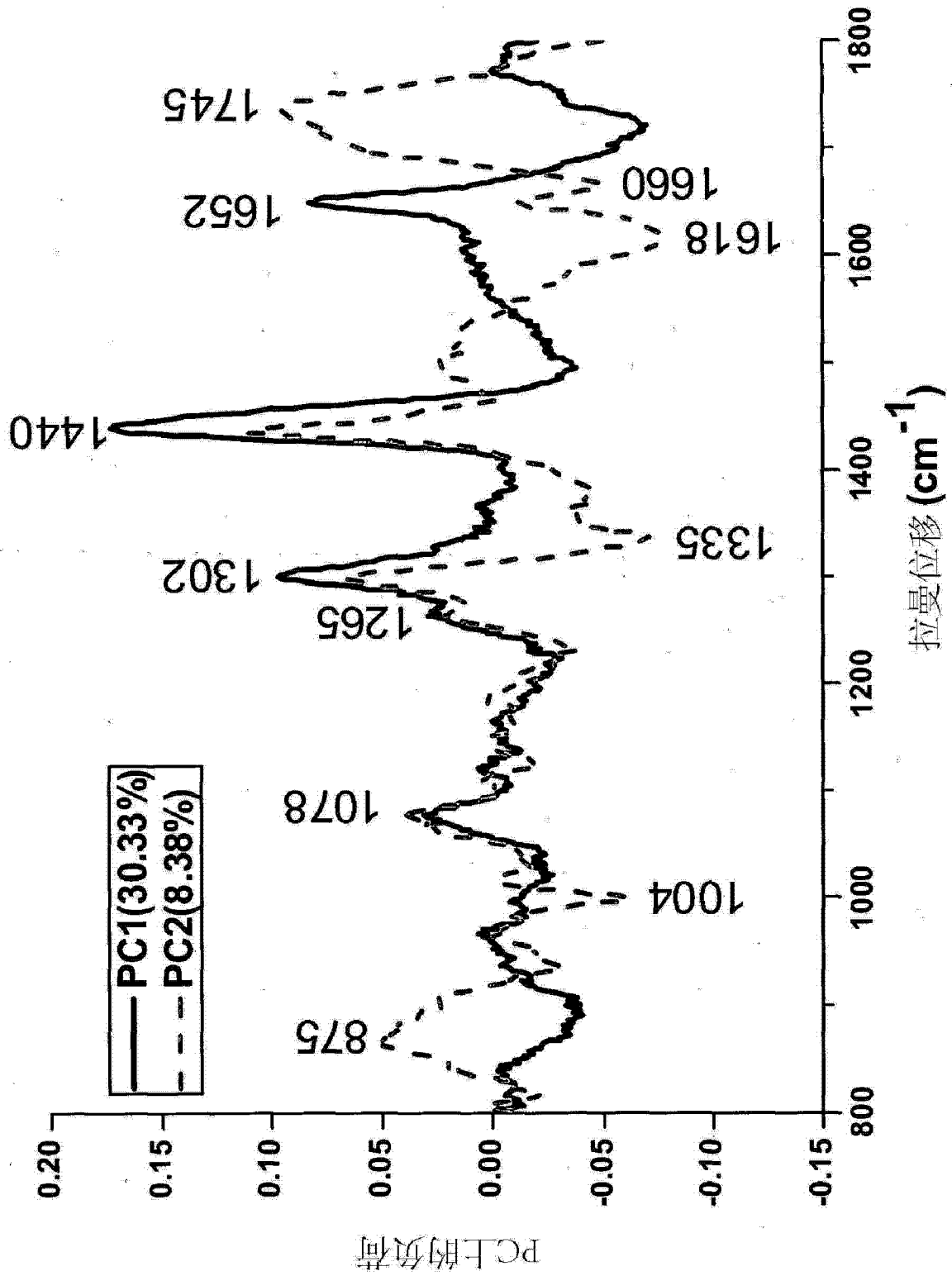


图 24

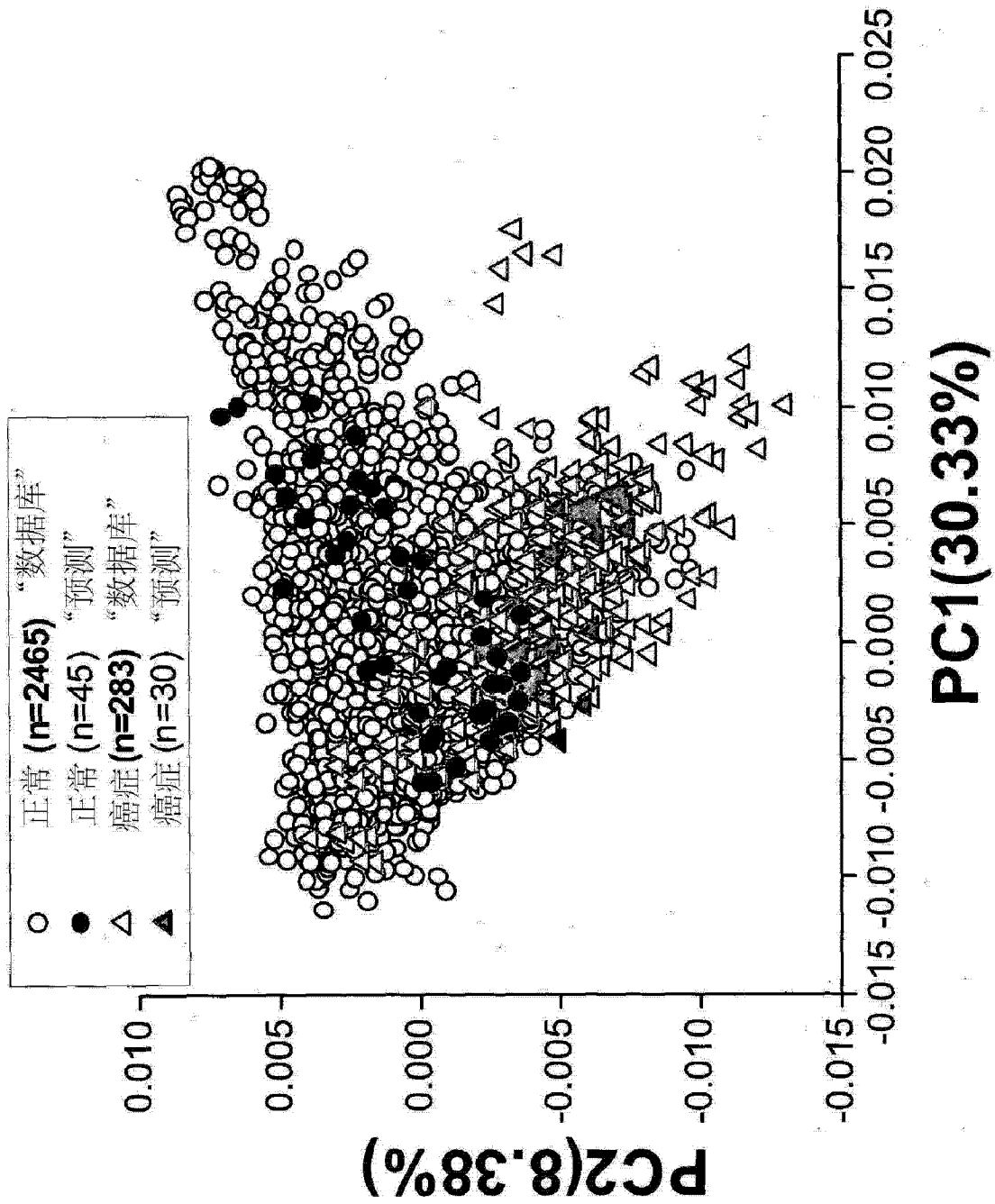


图 25

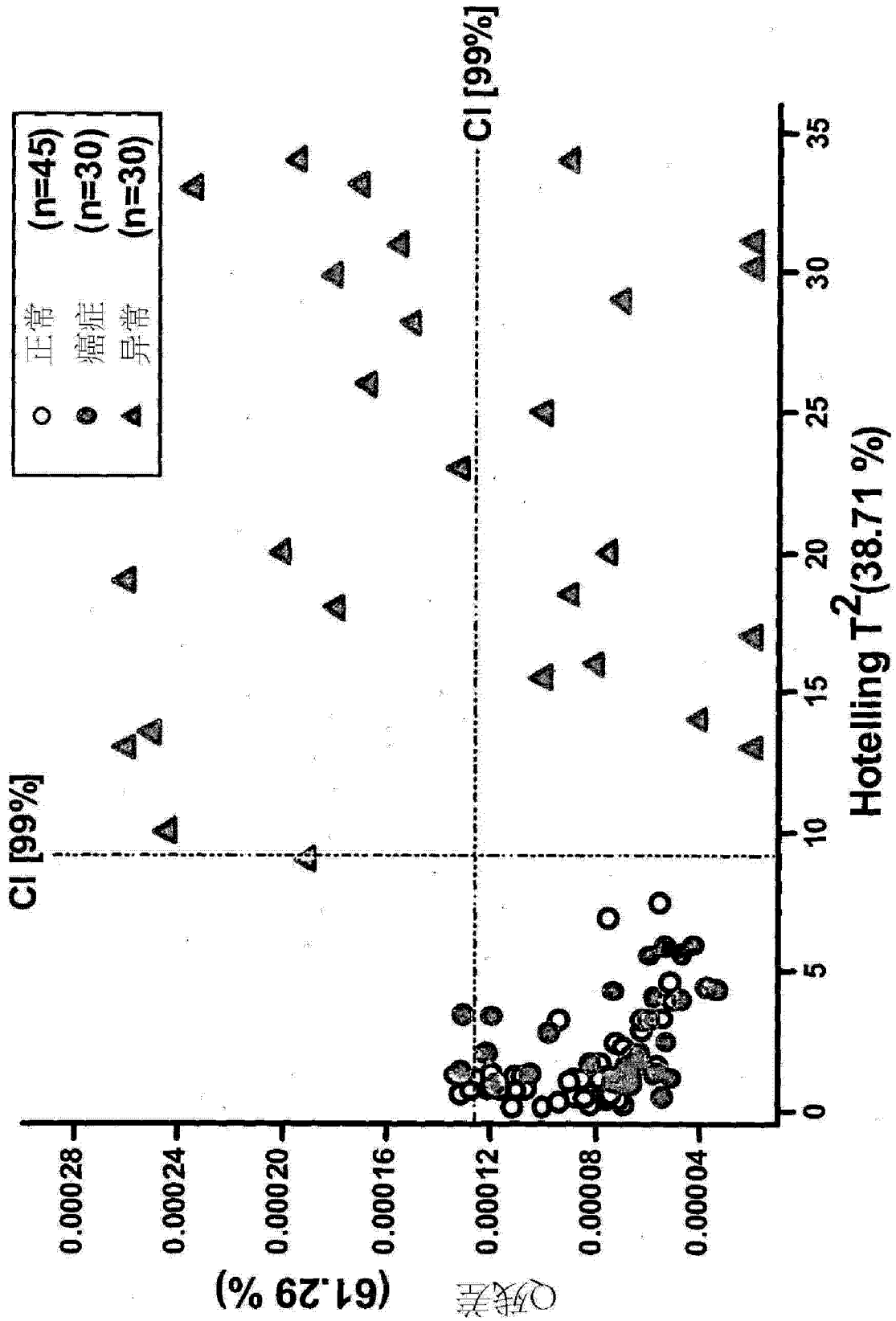


图 26

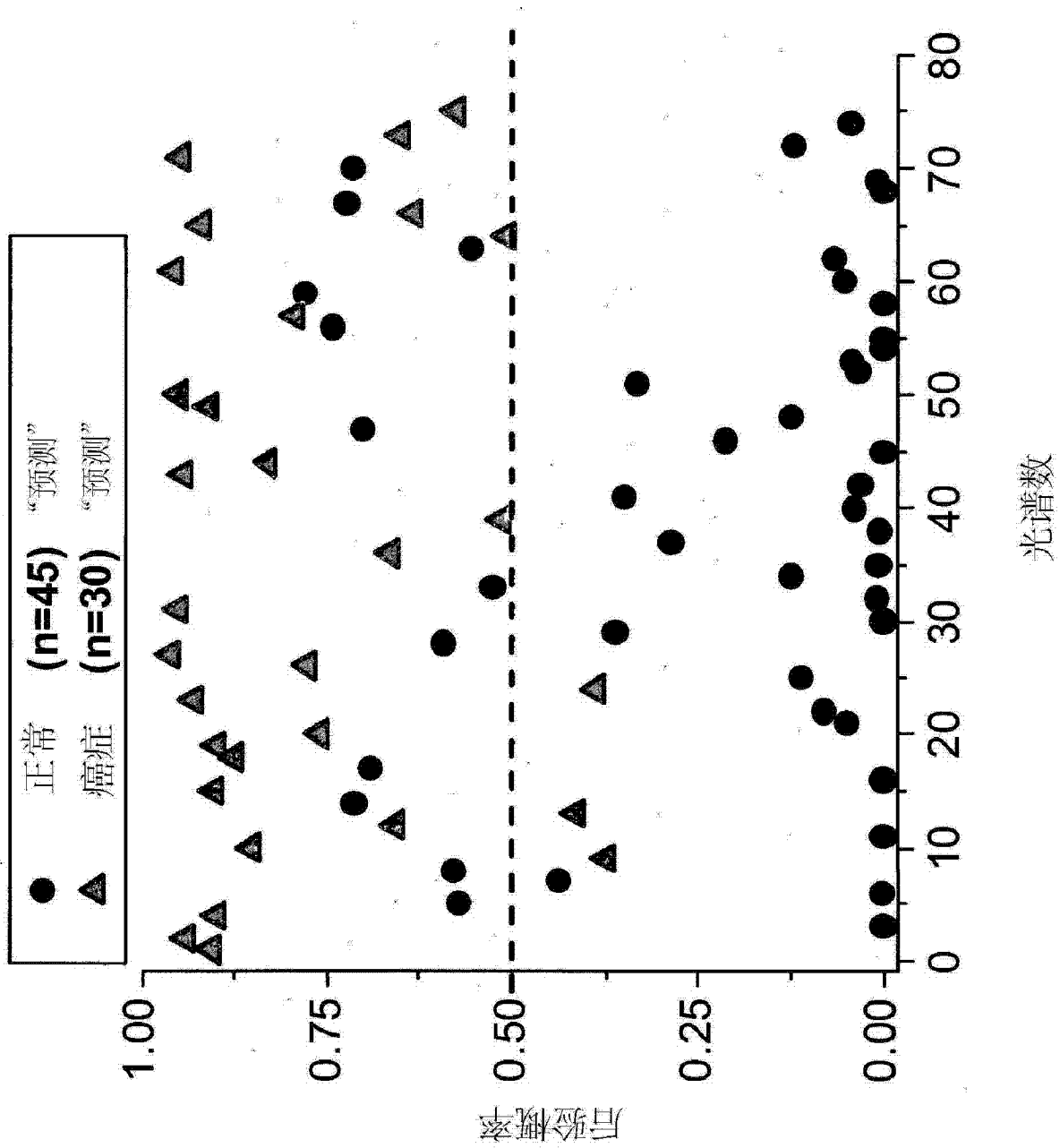


图 27

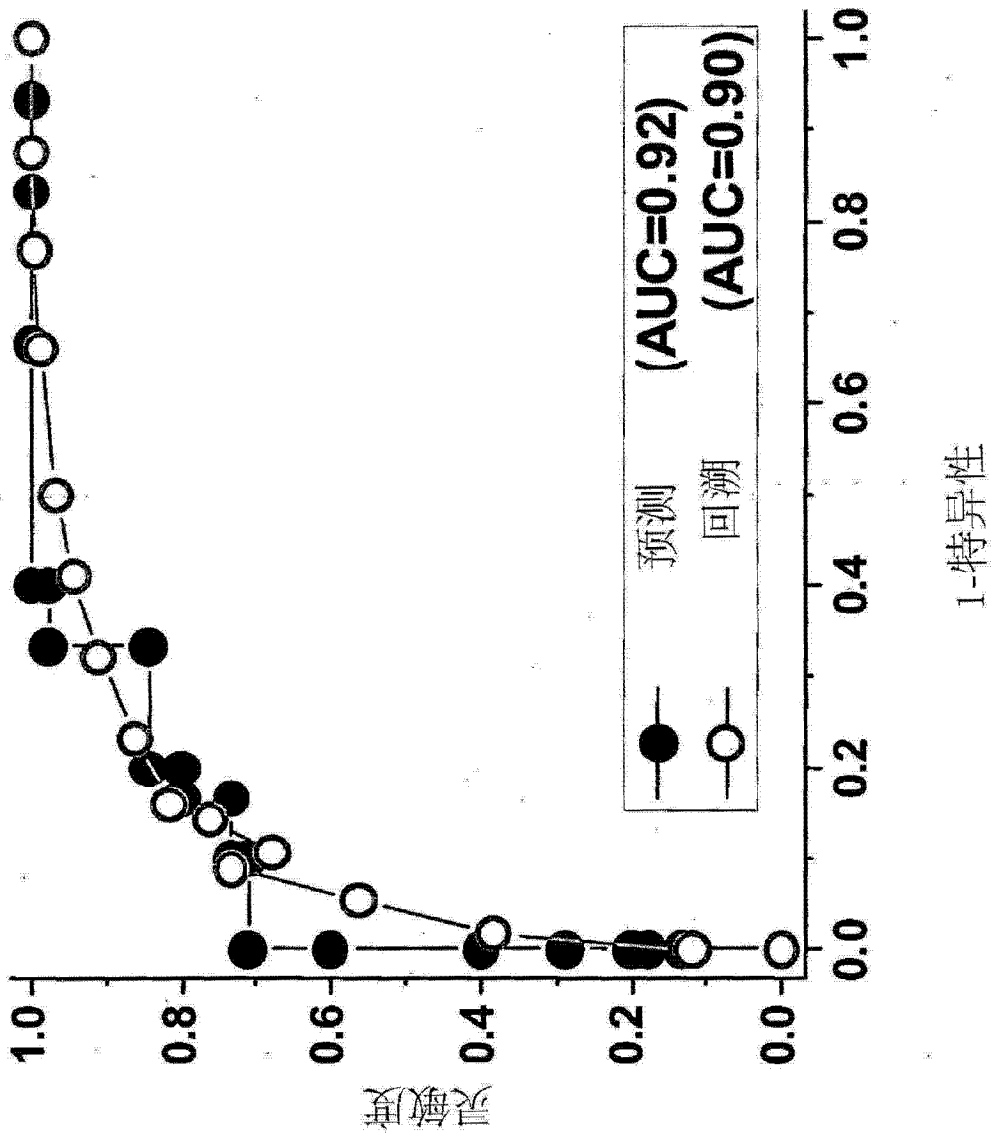


图 28

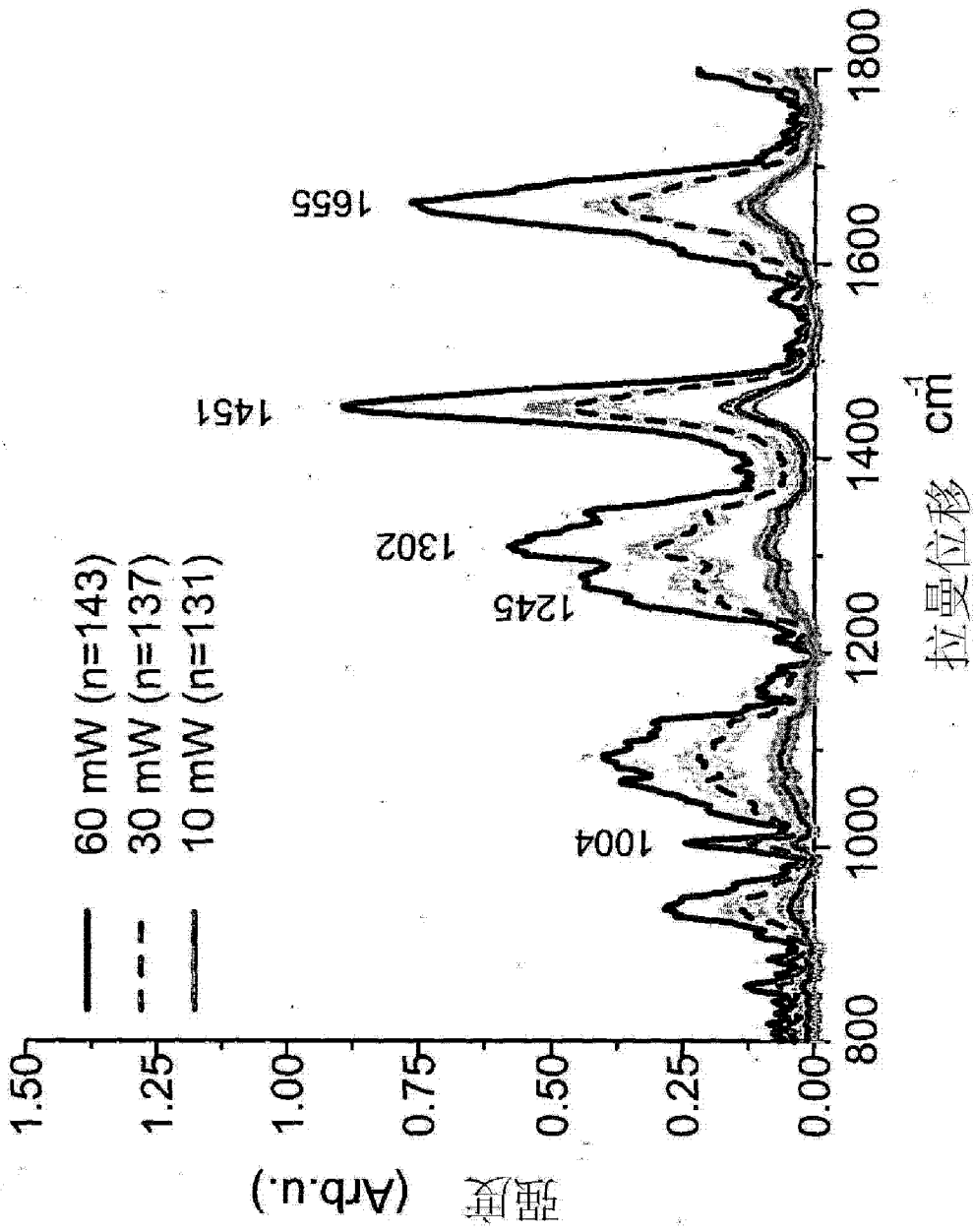


图 29

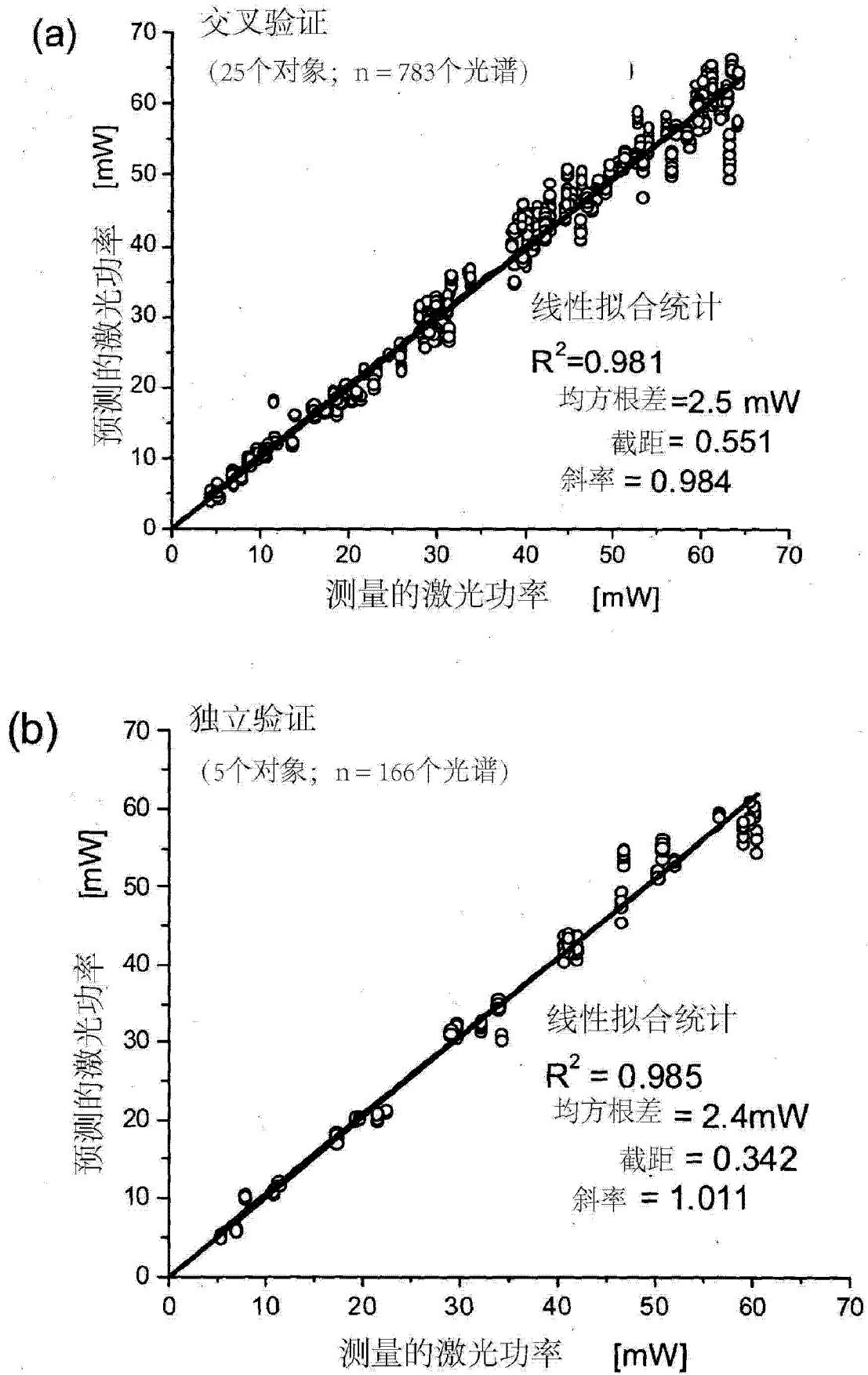


图 30

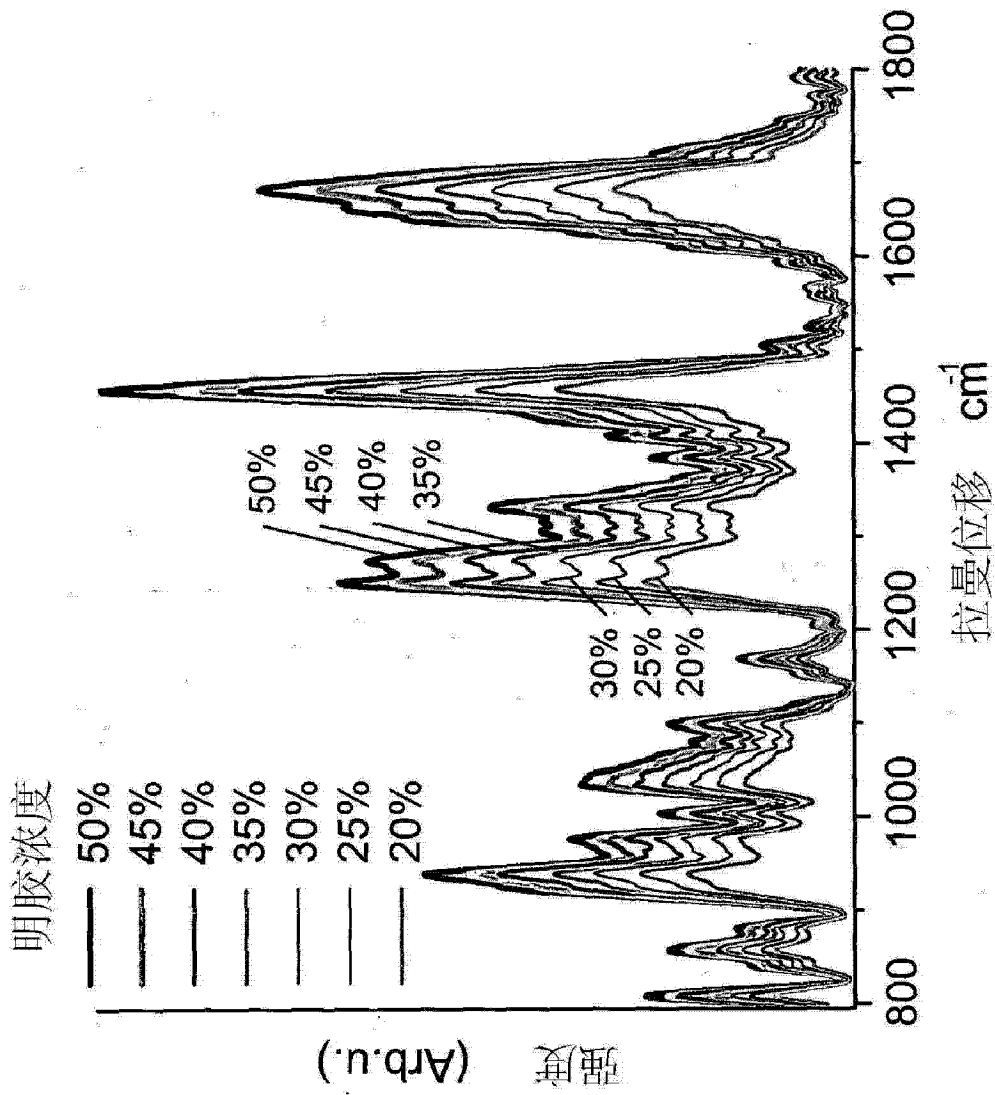


图 31

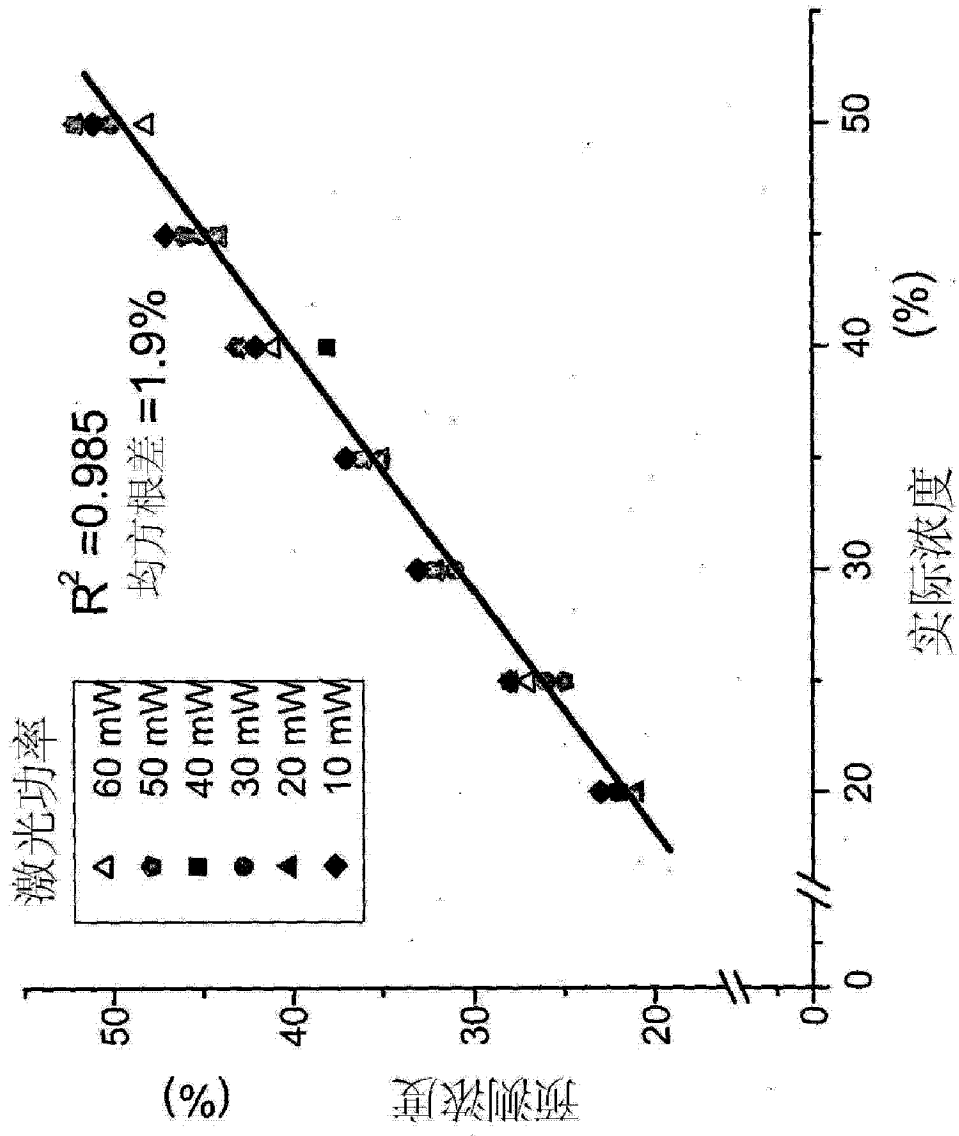


图 32

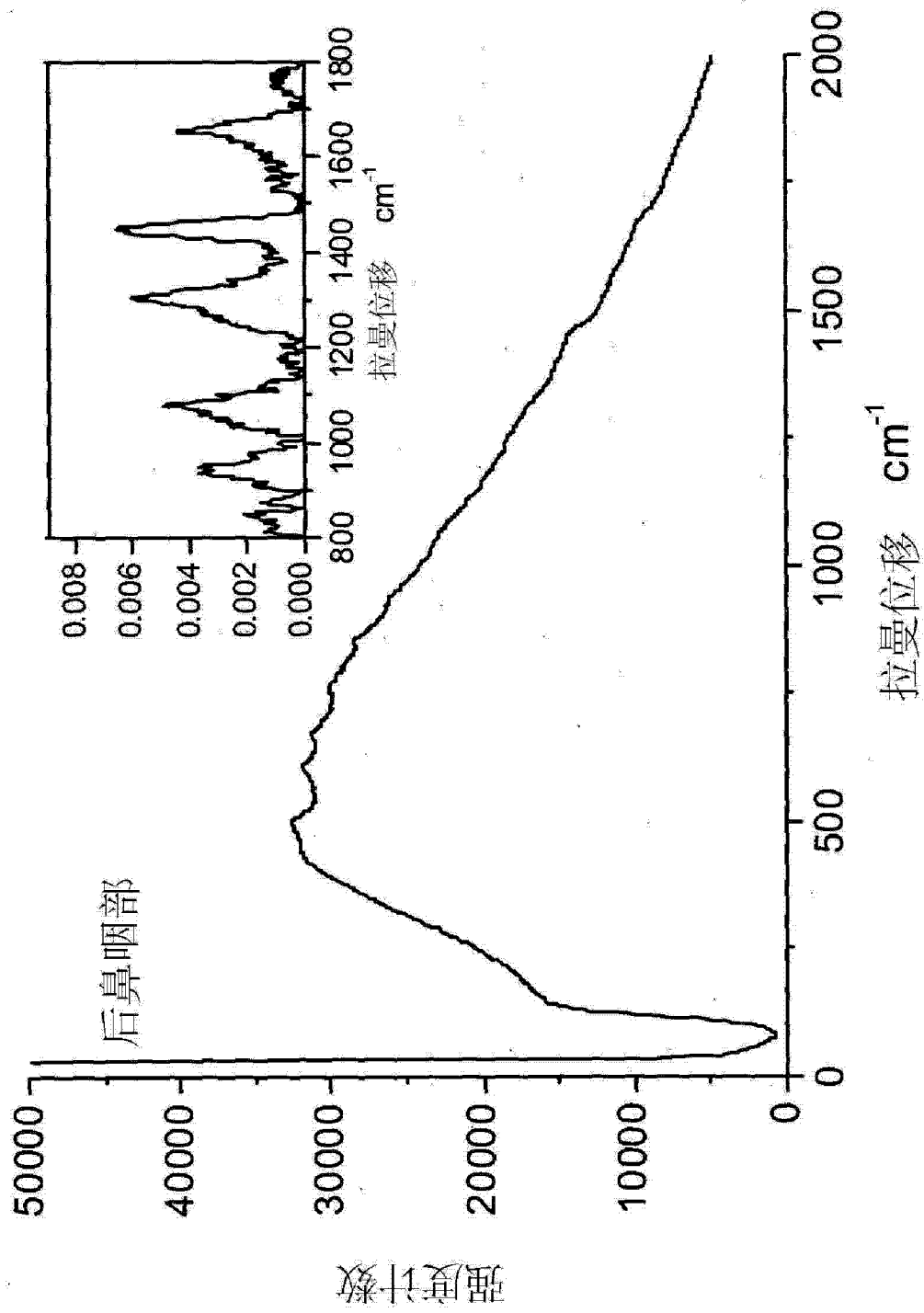


图 33

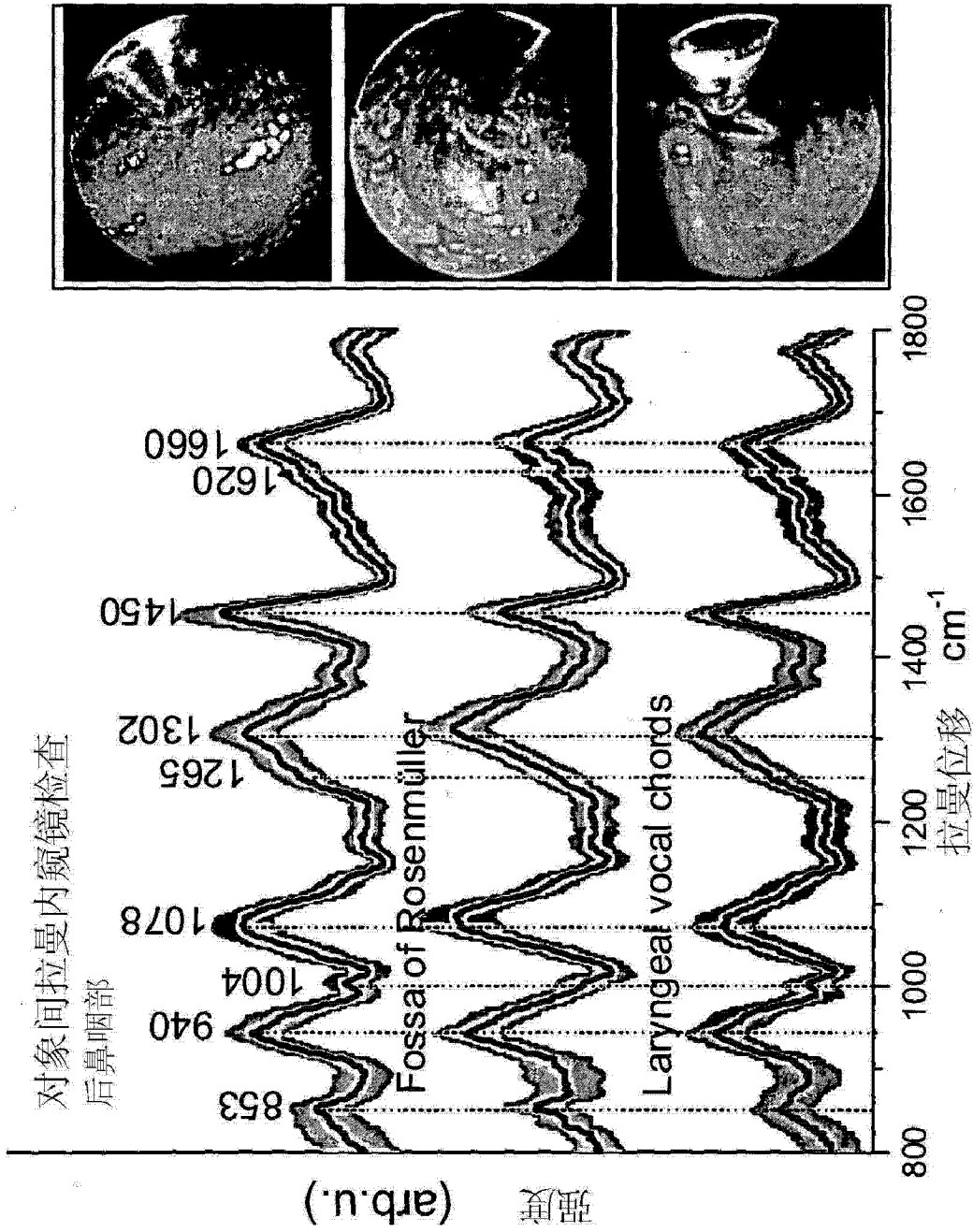


图 34

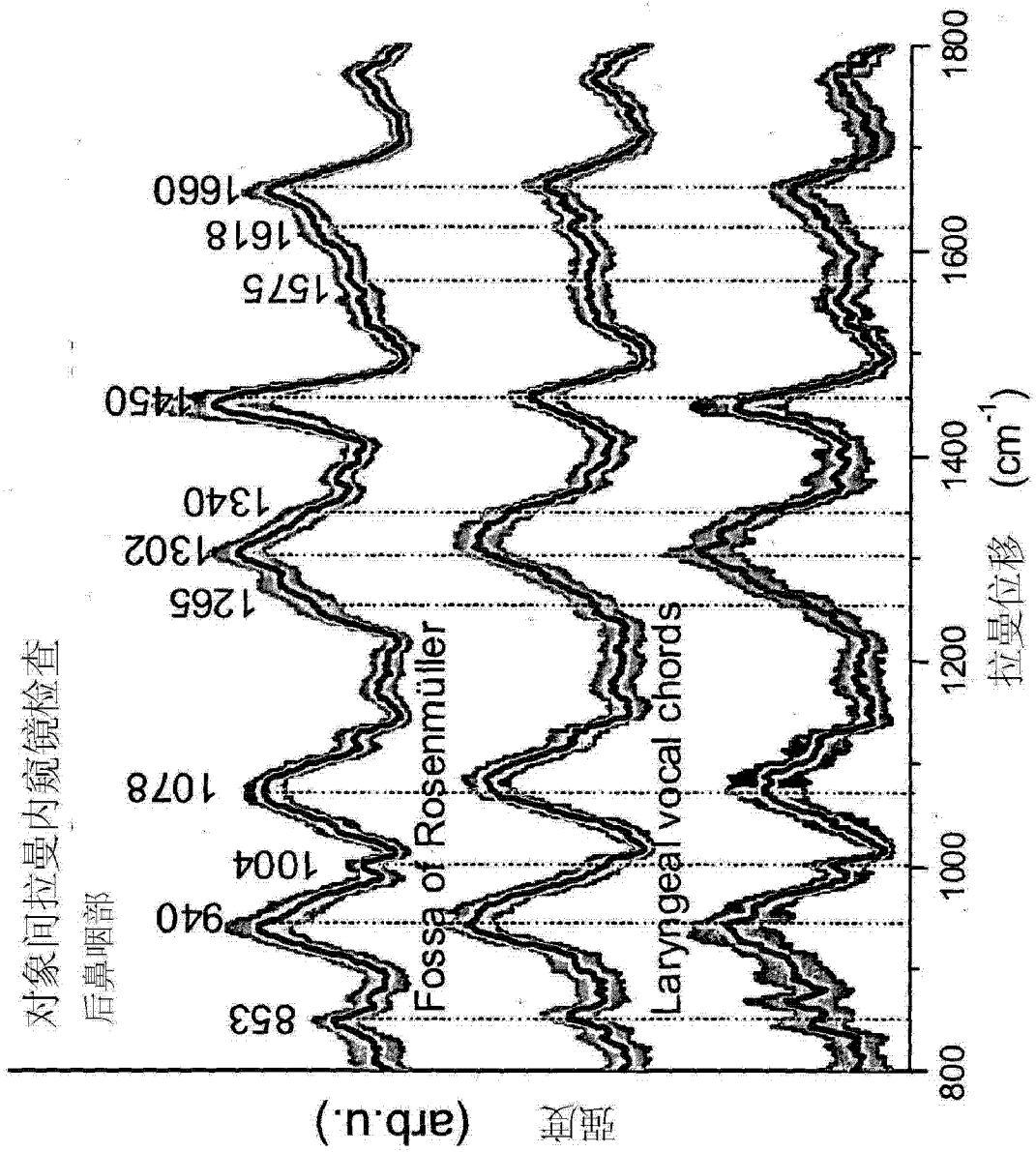


图 35

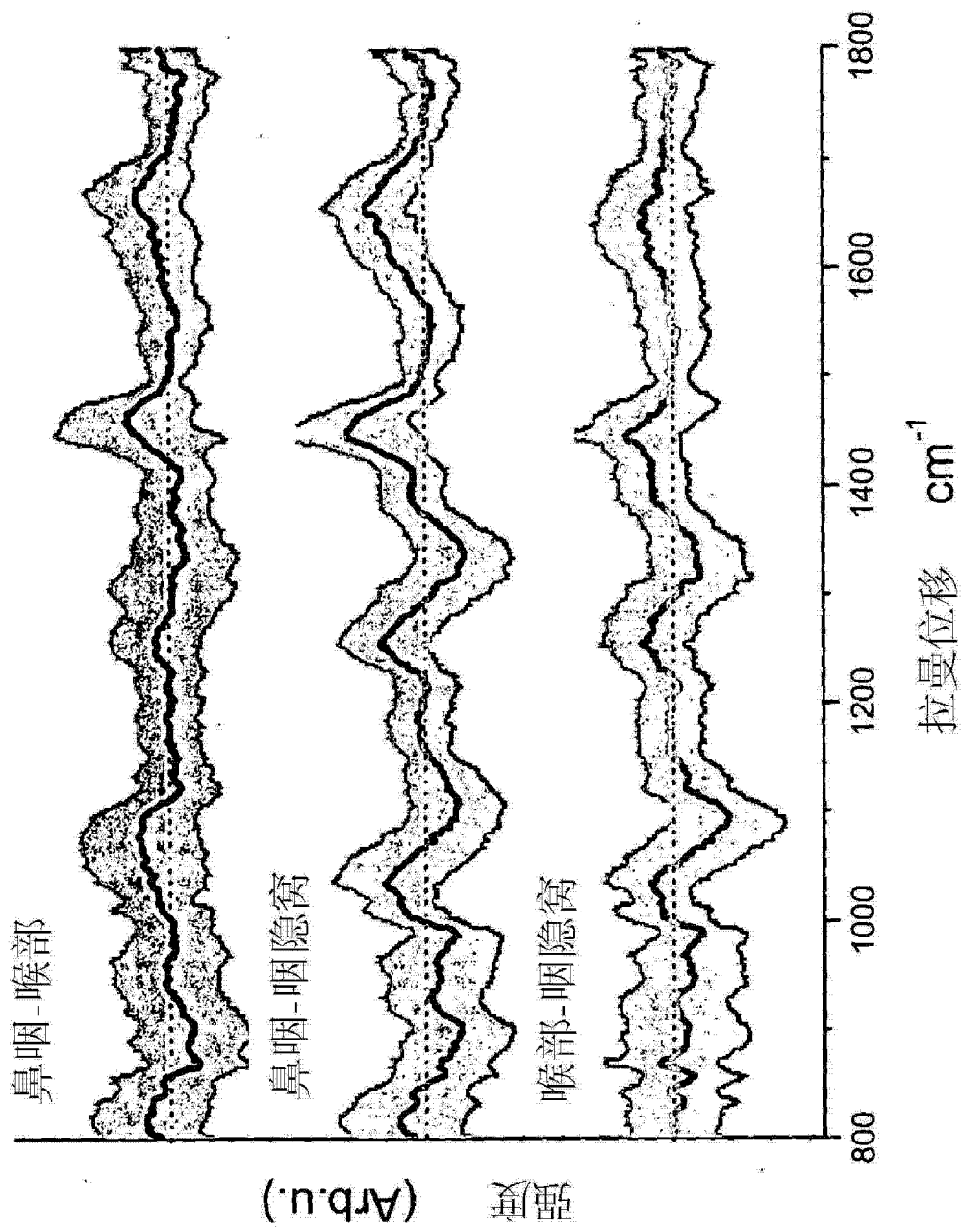


图 36

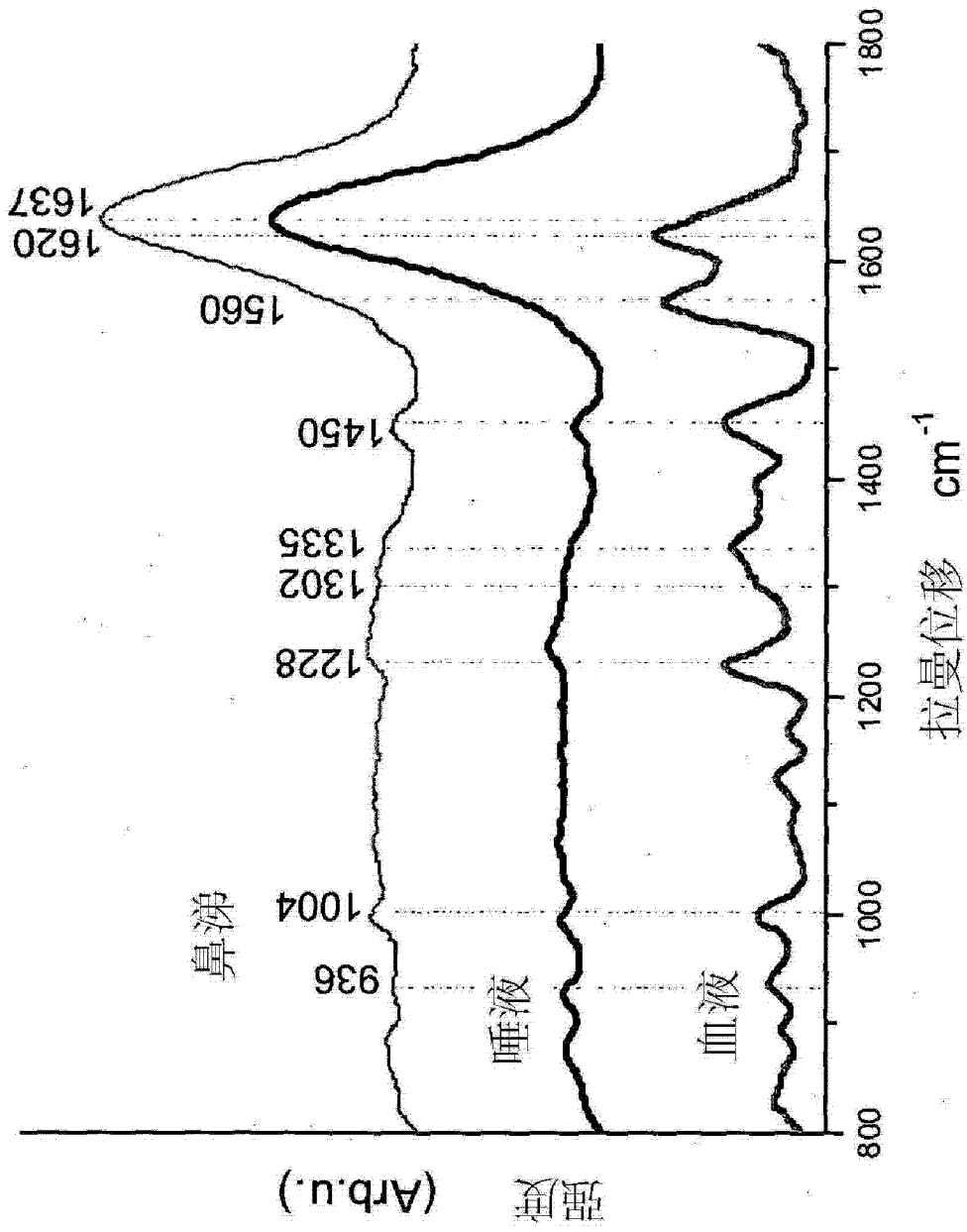


图 37

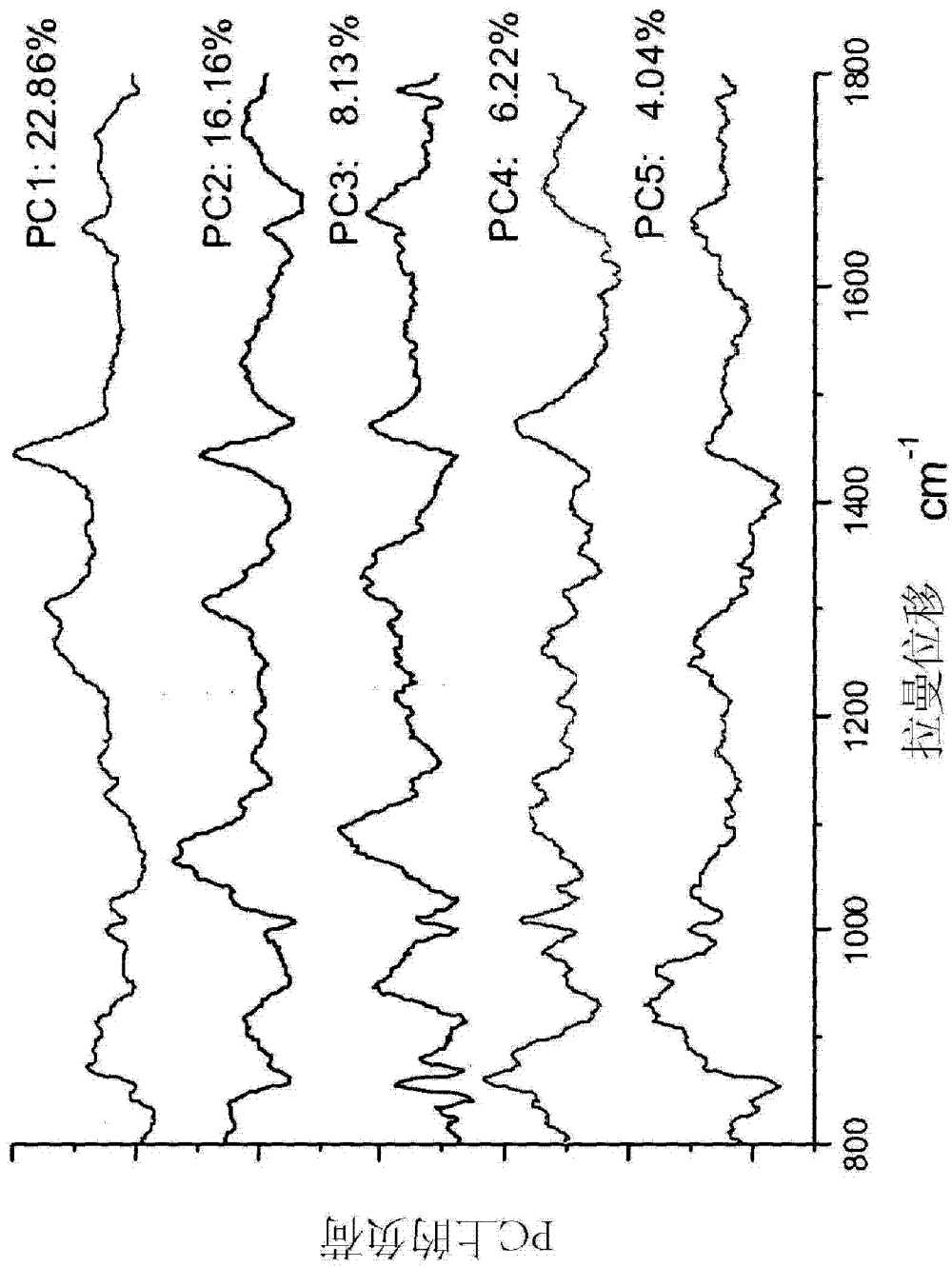


图 38

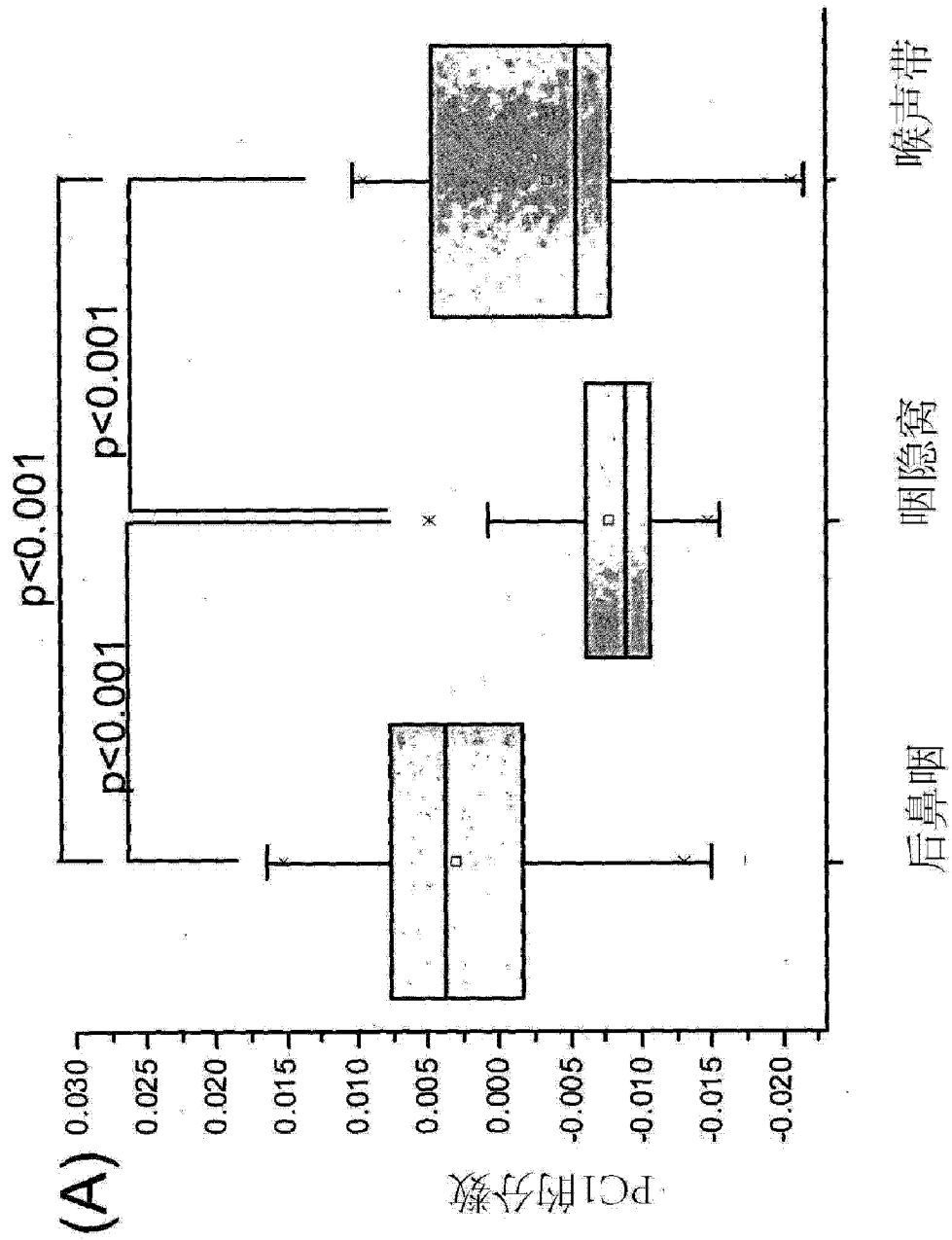


图 39A

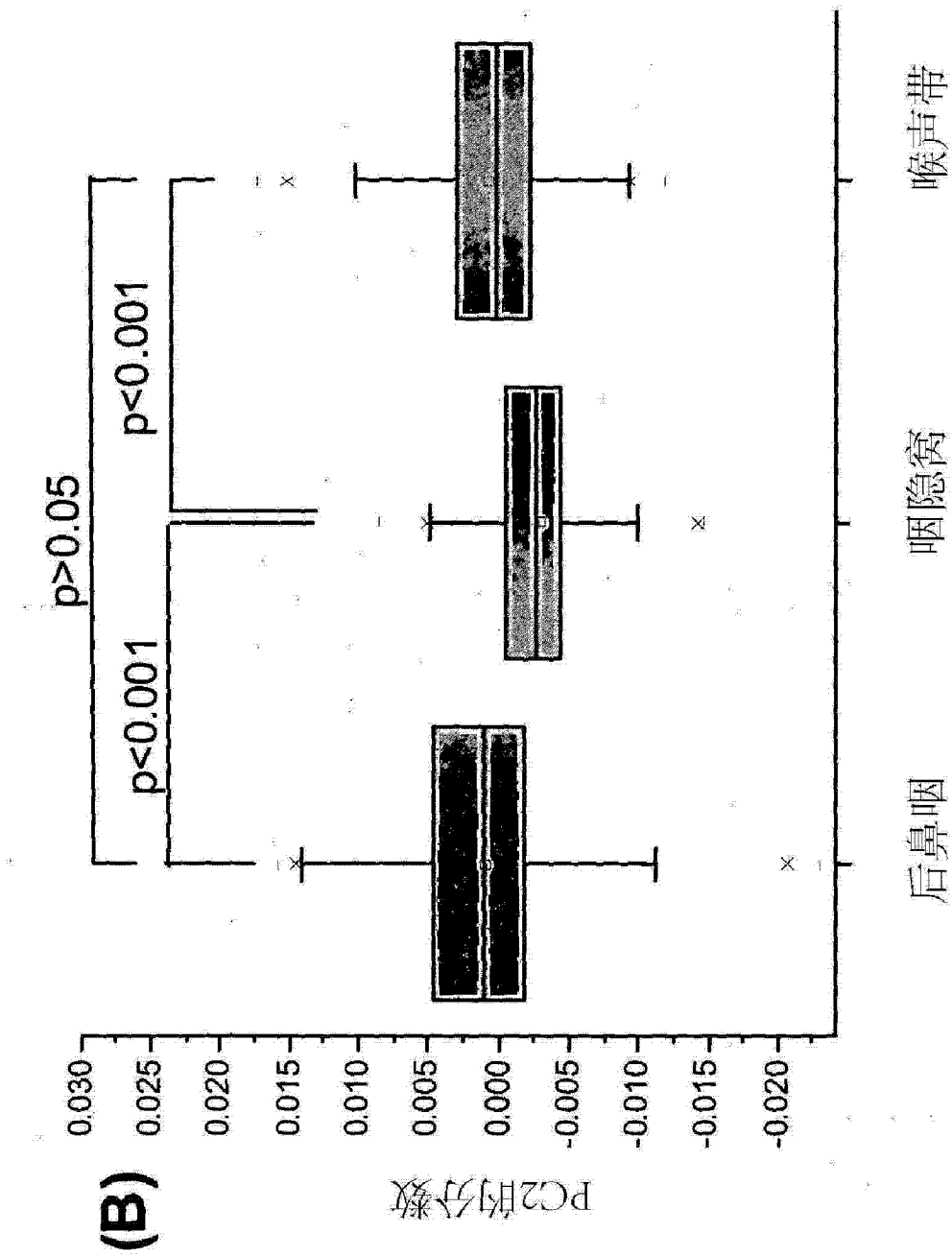


图 39B

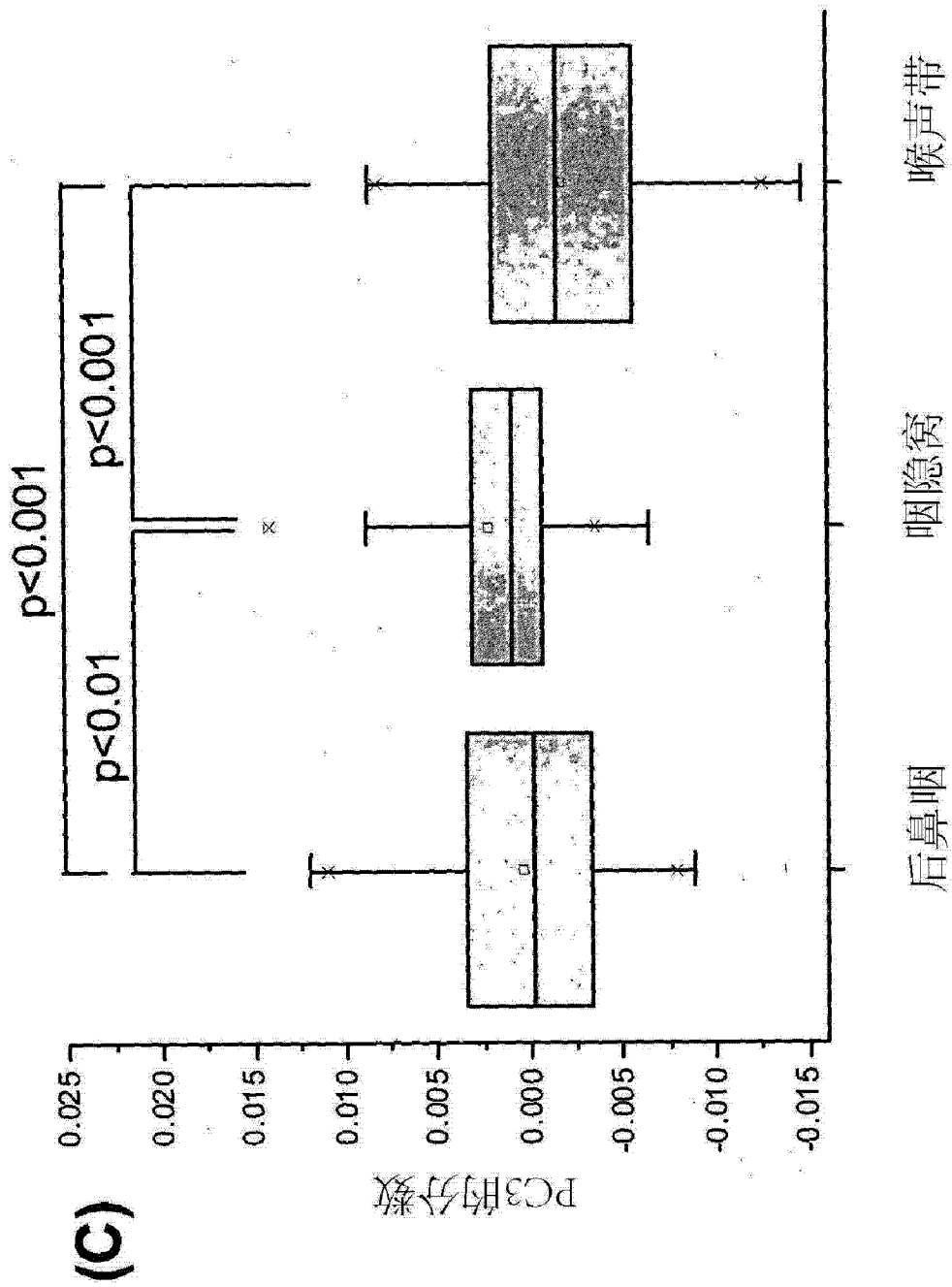


图 39C

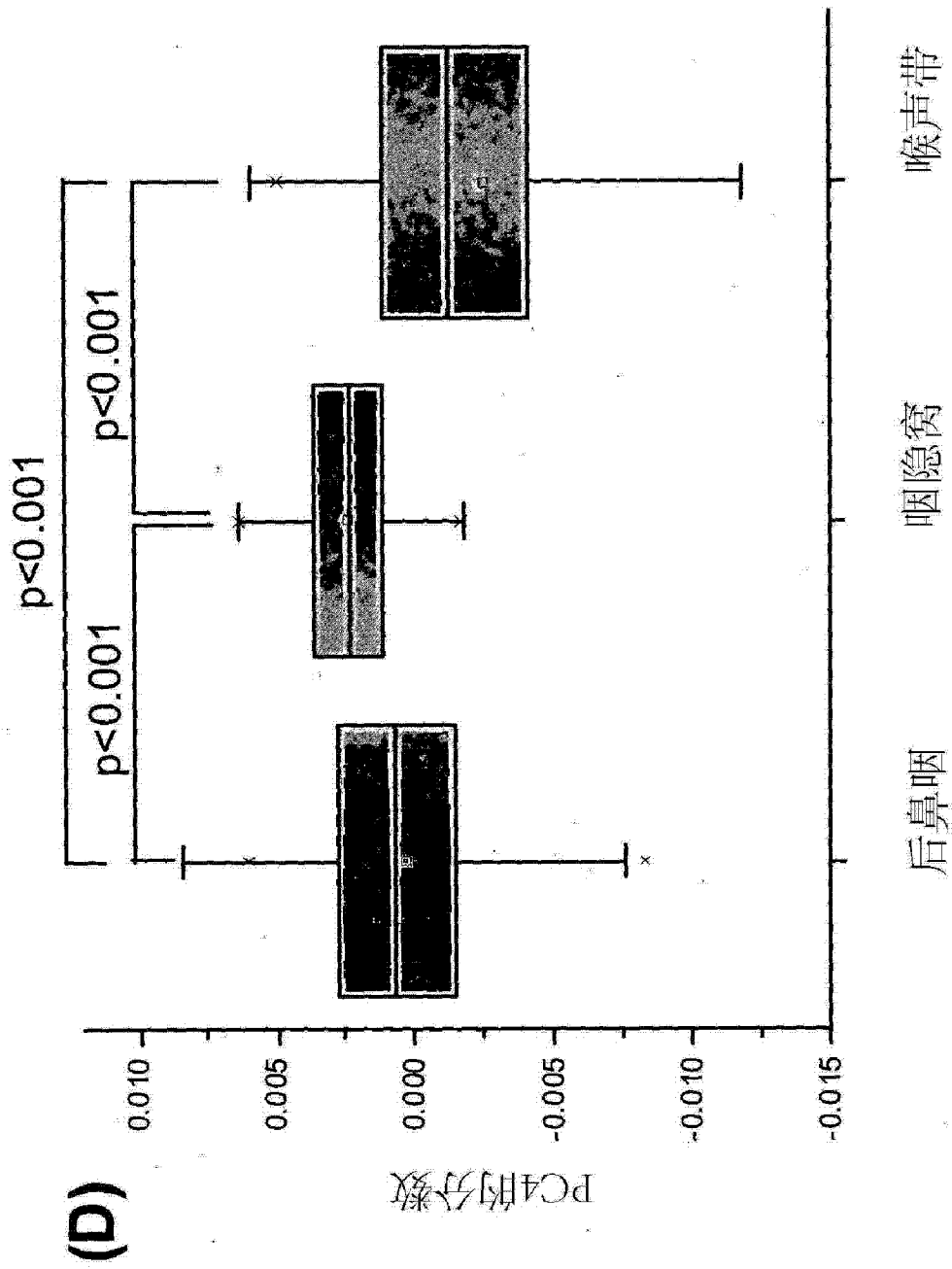


图 39D

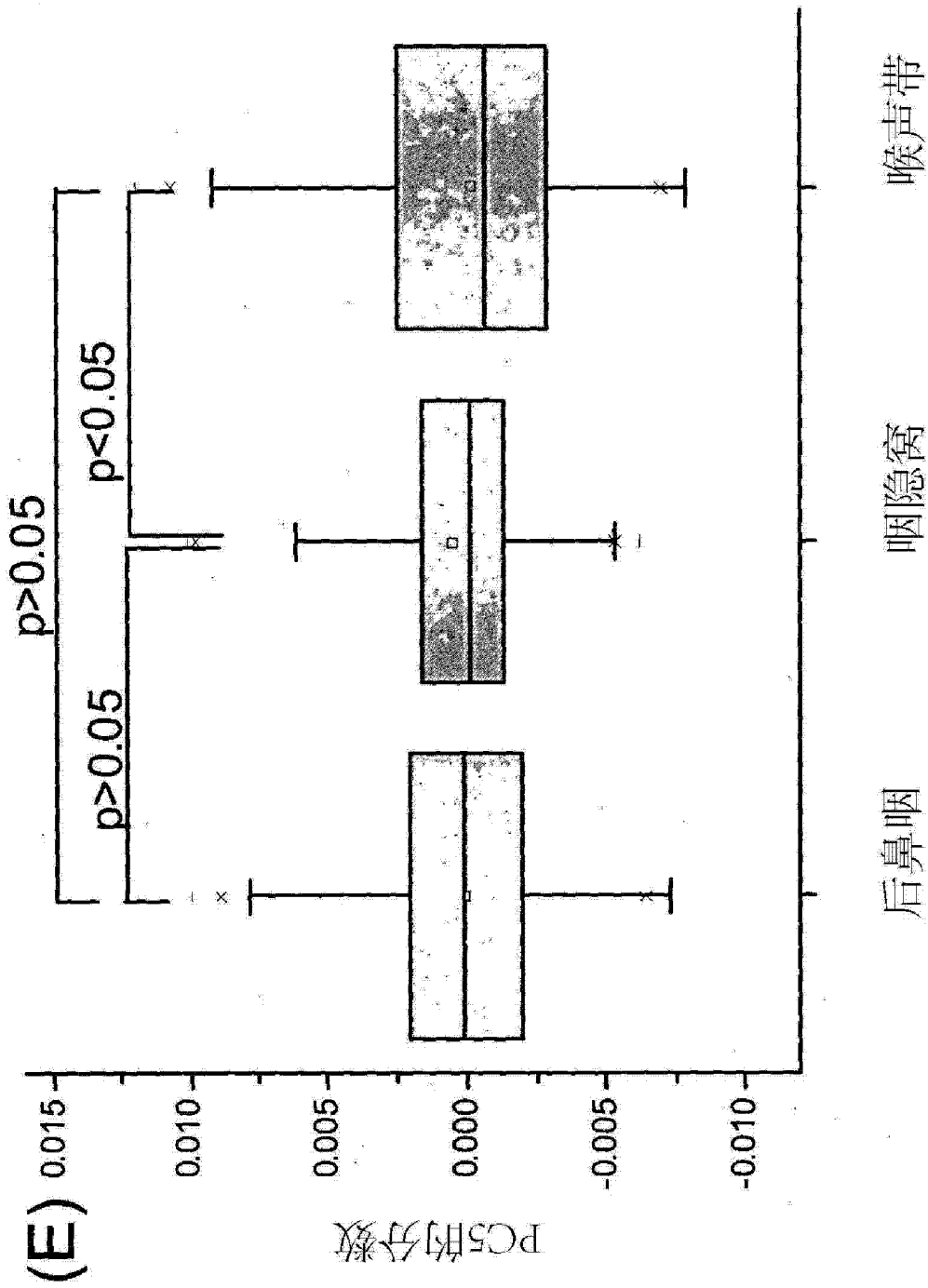


图 39E

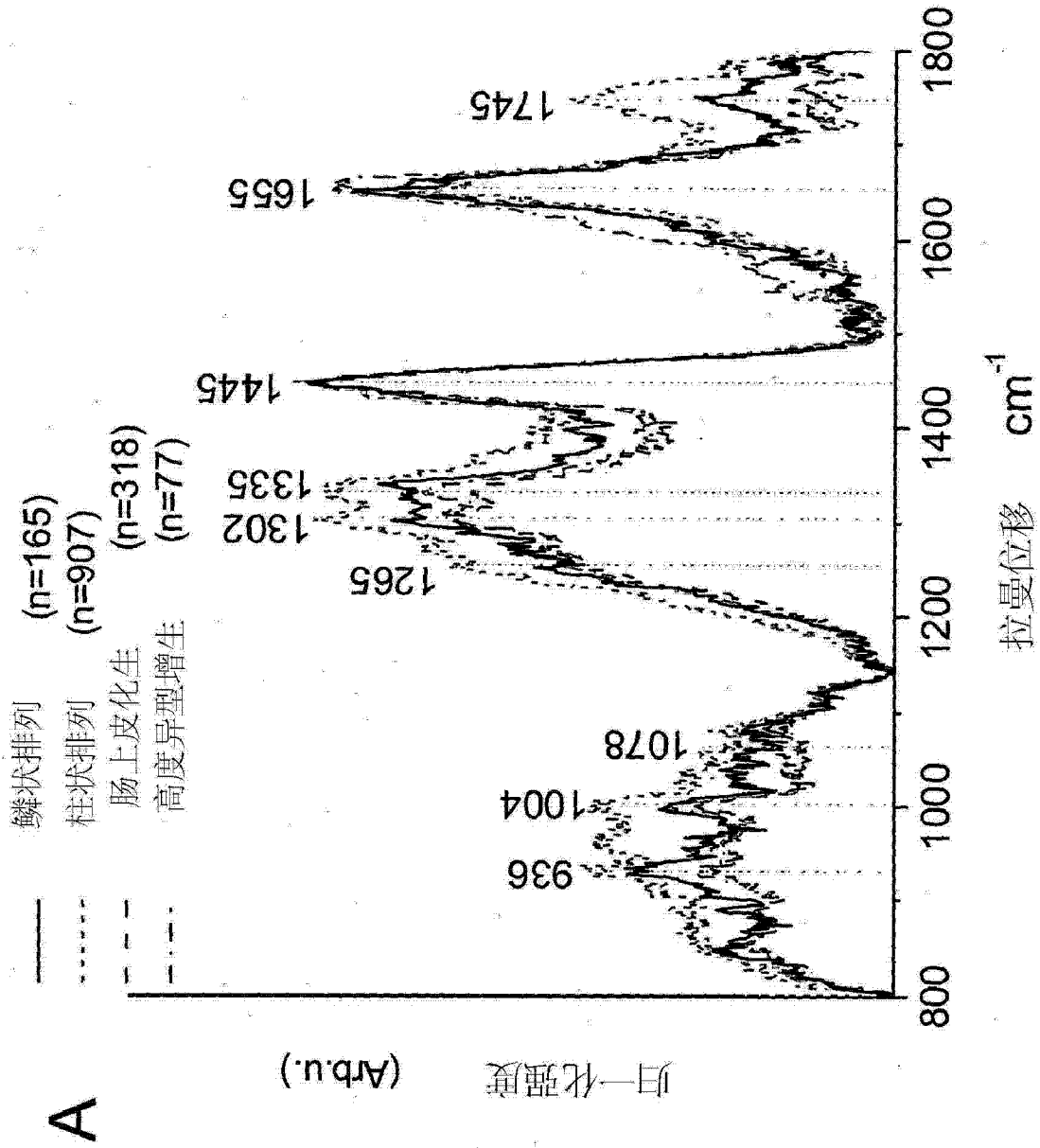


图 40A

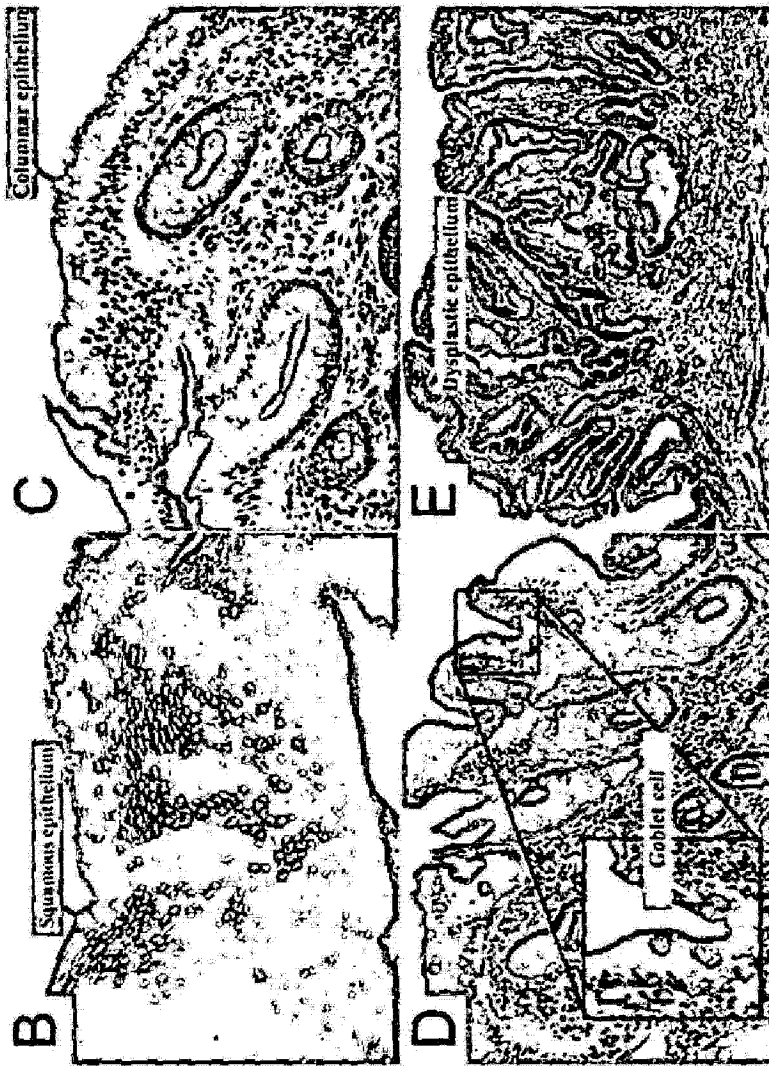


图 40B-E

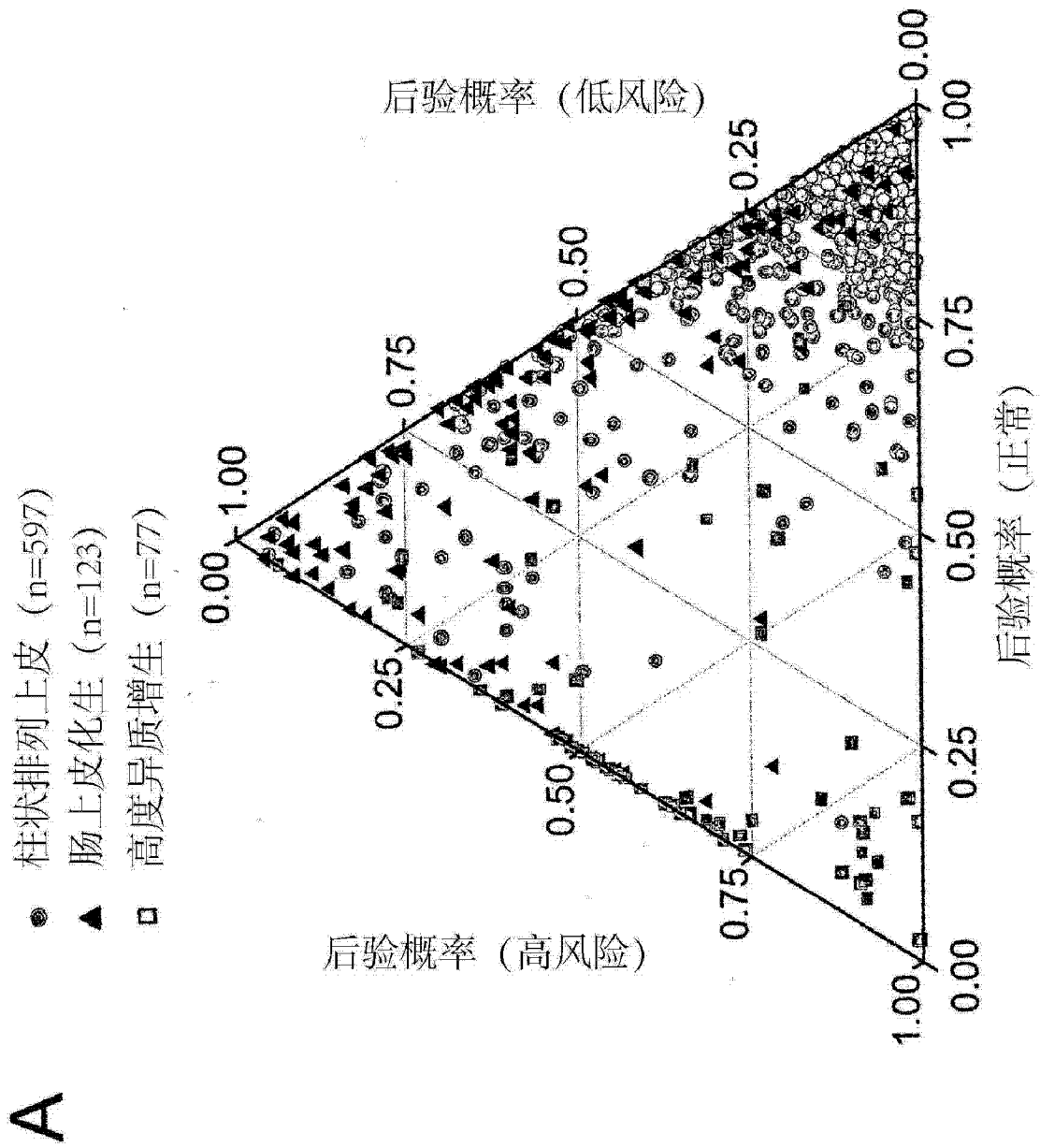


图 41A

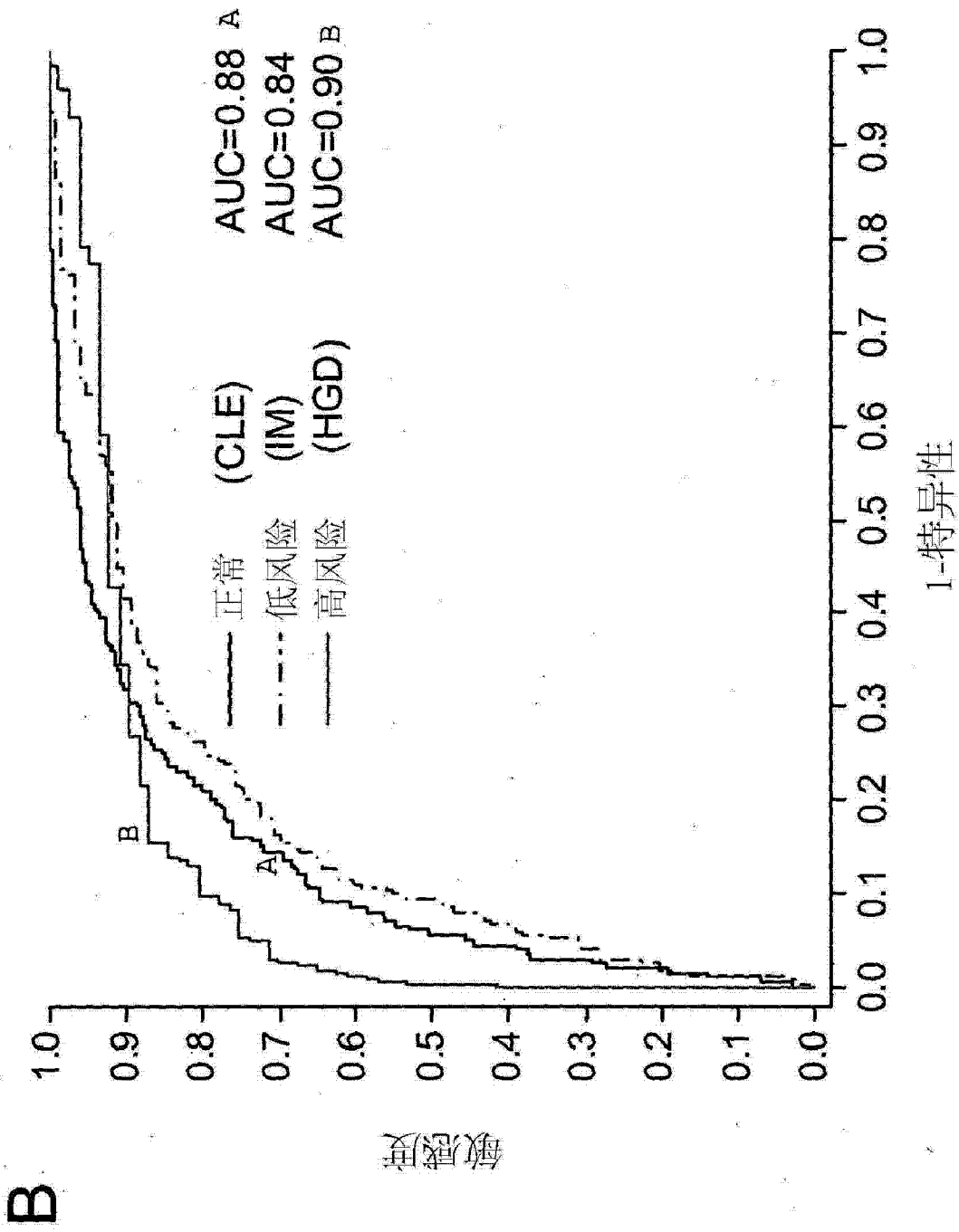


图 41B

专利名称(译)	涉及利用光纤拉曼光谱的内窥镜进行实时癌症诊断的方法		
公开(公告)号	CN104541153A	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201380035488.5	申请日	2013-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
[标]发明人	黄志伟 何凯俞 马兹·西尔维斯特·博格霍尔特 郑伟 杨凯关 西亚马拉·杜莱潘点		
发明人	黄志伟 何凯俞 马兹·西尔维斯特·博格霍尔特 郑伟 杨凯关 西亚马拉·杜莱潘点		
IPC分类号	G01N21/65 A61B5/00 G01J3/44 A61B6/00 G01N33/574		
CPC分类号	G01N21/274 A61B5/0075 G01J2003/4424 A61B2560/0233 G01N21/65 G01N2201/129 A61B5/0084 G01N2021/656 A61B1/00165 G01N2201/08 G01N2201/12753		
代理人(译)	余明伟 郭婧婧		
优先权	2013007338 2013-04-23 GB 61/667384 2012-07-02 US		
其他公开文献	CN104541153B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种实现用于光纤拉曼光谱系统的定量分析的仪器独立测量的方法，该系统包括激光源、光谱仪和光纤探针，该光纤探针将光从激光源发送光到目标，并且将散射光返回到光谱仪，该方法包括从激光源发送光到具有已知光谱的标准目标，记录来自标准目标的散射光的校准光谱，比较已知的光谱和校准系统，并且生成探针和/或探针系统传递函数，以及存储传递函数。本发明还提供了结合其它公开方法可选地执行实时诊断拉曼光谱的方法。

