



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102697510 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201210184208. 4

G01N 21/64(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 10. 26

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/515, 343 2003. 10. 28 US

10/972, 173 2004. 10. 22 US

EP 1205753 A2 , 2002. 05. 15, 全文 .

US 5582168 A , 1996. 12. 10, 全文 .

WO 01/22869 A1 , 2001. 04. 05, 摘要, 说明书第 3 页第 5-20 行, 第 5 页 1-13 行, 权利要求 17-31.

WO 99/02956 A2 , 1999. 01. 21, 全文 .

(62) 分案原申请数据

200480031801. 9 2004. 10. 26

(73) 专利权人 薇拉莱特公司

地址 美国新墨西哥州

审查员 李陆美

(72) 发明人 L·爱德华·赫尔

尼尔·埃迪吉尔·马伍德

克里斯托弗·D·布朗

罗伯特·约翰逊

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 王允方 刘国伟

(51) Int. Cl.

A61B 5/1455(2006. 01)

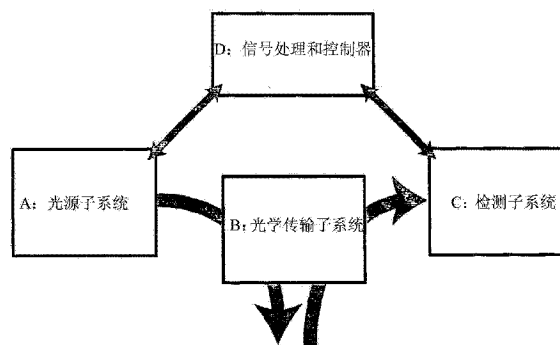
权利要求书2页 说明书16页 附图16页

(54) 发明名称

使用组织荧光确定某一糖化终产物或疾病状态

(57) 摘要

本发明公开一种确定个体中某一组织状态 (例如, 糖化终产物或疾病状态) 的方法。用来自光源子系统 (A) 的激发光照射所述个体组织的一部分并通过检测子系统 (C) 检测因组织内一化学物质响应于所述激发光产生荧光而由所述组织发出的光。检测光可与储存在信号处理器 (D) 中的模型结合, 而将荧光与某一组织状态相关以便确定组织状态。可使用校正技术降低由检测非荧光 (诸如组织反射) 造成的误差。也可将其它生物学信息与荧光性质结合使用以帮助确定某一组织状态。



1. 一种用于确定个体组织的组织状态的装置,其中所述“组织状态”是基于血糖控制的化学变化的测量,所述装置包括:

a. 照射系统,其用于以激发光照射所述个体组织的一部分并检测由所述组织内化学物质所发出的荧光而由所述组织发出的光,所述照射系统包括:复数个激发纤维、和复数个彼此隔开并相对于所述激发纤维进行排列的接收纤维,使得能够优先收集来自皮肤真皮层的荧光信息;

b. 检测系统,其用于将荧光转换成电子信号;

c. 分析系统,其用于从所述电子信号和将荧光与组织状态相关联的模型来测定所述组织状态。

2. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述激发光具有介于 280nm 至 500nm 范围内的波长。

3. 如权利要求 2 所述的装置,其中所述激发光具有介于 315nm 至 500nm 范围内的波长。

4. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述激发光在第一时间具有第一波长,且在第二时间具有不同于所述第一波长的第二波长。

5. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述光在大于所述激发光波长的波长下检测。

6. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述光在介于 250nm 至 850nm 之间的波长下检测。

7. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述光在复数个波长的每一个波长下检测。

8. 如权利要求 7 所述的装置,其中所述激发光具有单一波长,且其中检测由所述组织发出的光包括在复数个波长下检测光。

9. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述激发光波长随时间而变化,且其中检测由所述组织发出的光包括在第一波长下检测光。

10. 如权利要求 1 所述的装置,其中光的检测包括确定激发波长与检测波长下荧光之间的关系,且其中测定组织状态包括将所述关系与模型进行比较,所述模型界定组织状态同所述激发波长与所述检测波长下荧光之间关系的关系。

11. 如权利要求 10 所述的装置,其中光的检测包括确定复数个激发波长下的照射与检测波长下的荧光之间的关系,且其中测定组织状态包括将所述关系与模型进行比较,所述模型界定组织状态同所述复数个激发波长与所述检测波长下荧光之间关系的关系。

12. 如权利要求 10 所述的装置,其中光的检测包括确定激发波长下的照射与复数个检测波长下的荧光之间的关系,且其中测定组织状态包括将所述关系与模型进行比较,所述模型界定组织状态同所述激发波长与所述复数个检测波长下荧光之间关系的关系。

13. 如权利要求 10 所述的装置,其中光的检测包括确定复数个激发波长下的照射与复数个检测波长下的荧光之间的关系,且其中测定由组织状态包括将所述关系与模型进行比较,所述模型界定组织状态同所述复数个激发波长与所述复数个检测波长下荧光之间关系的关系。

14. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述分析系统用于从生物学信息中检测所述组织状态,所述生物学信息与下述有关:所述个体的年龄、所述个体的身高、所述个体的体重、所述个体的家族病史、种族性、皮肤黑色素水平、或其组合。

15. 如权利要求 1 所述的装置,其中根据以下描述确定所述模型:

a. 对于复数个受试者中的每一位:

i. 测定所述受试者组织的一部分的荧光性质;

ii. 确定所述受试者的组织状态；

b. 将多变量法应用于所述复数个荧光性质的测定和相关组织状态的确定中，以形成将荧光性质与组织状态相关联的模型。

16. 如权利要求 1 所述的装置，其中所述组织状态包括糖化终产物的存在、糖化终产物的浓度、糖化终产物浓度的变化、糖化胶原的存在、糖化胶原的浓度、糖化胶原浓度的变化、所述个体的疾病状态、或其组合。

17. 如权利要求 1 所述的装置，其中所述基于血糖控制的化学变化的测量是组织内糖化终产物的测量。

使用组织荧光确定某一糖化终产物或疾病状态

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 10 月 26 日、申请号为 200480031801.9、发明名称为使用组织荧光确定某一糖化终产物或疾病状态的专利申请的分案。

[0002] 对相关申请案的交叉参考

[0003] 本申请案根据 35 U.S.C § 120 主张优先于 2002 年 4 月 4 日提出申请的题目为“Apparatus And Method For Spectroscopic Analysis Of Tissue To Detect Diabetes In An Individual”的美国专利申请案第 10/116,272 号（以引用方式并入本文中），并主张 2003 年 10 月 28 日提出申请的题目为“Determination of a Measure of a Glycation End-Product or Disease State Using Tissue Fluorescence”的美国临时申请案第 60/515,343 号（以引用方式并入本文中）的权利。

技术领域

[0004] 本发明概言之涉及由组织荧光确定组织状态。更具体而言，本发明涉及用于确定组织荧光与组织状态相关的模型的方法和装置和用于测定组织荧光性质的方法和装置、以及用于通过荧光性质与适宜模型确定组织状态的方法和装置。

背景技术

[0005] 糖尿病是美国和世界发达国家以及发展中国家中普遍存在的主要健康问题。2002 年，美国糖尿病协会（ADA）估计有 1820 万美国人（足足占公民的 6.4%）患有某种形式的糖尿病。这其中有 90 至 95% 患有 II 型糖尿病，而有 35%（或约 600 万个体）未得到确诊。参见 ADA 报告，Diabetes Care, 2003。世界卫生组织（WHO）估计全世界有 17,500 万人患有糖尿病；II 型糖尿病亦占全世界所有经诊断患者的 90%。不幸的是，预测表明在接下来的 20 年间此种严峻形势会更加恶化。WHO 预测在 2025 年之前糖尿病患者的总数将加倍。类似地，ADA 预计到 2020 年美国人口的 8.0%（大约 2,500 万个体）会感染此种疾病。假设检测速率停滞不前，那么此预示着不到 20 年每 100 名美国人中就会有 3 名“沉默”糖尿病患者。许多人已将糖尿病在世界范围内的爆发描述成流行病，此不足为奇。糖尿病对个人健康和国家经济带来重大冲击。2002 年美国与糖尿病有关的卫生保健开销超过 1,320 亿美元。由于慢性高血糖症可引起诸多并发症，所以所述开销分布在多种公共医疗卫生服务领域。例如，美国在心血管疾病、肾脏疾病、内分泌和代谢并发症、以及眼部病症领域中的所有支出的 5% 至 10% 均归因于糖尿病。参见 ADA 报告，Diabetes Care, 2003。此等经济和健康负担掩盖了大多数与糖尿病相关的并发症是可预防的这一事实。具有里程碑意义的糖尿病控制和并发症临床研究（Diabetes Control and Complications Trial）（DCCT）确认，一包括葡萄糖监控、锻炼、适宜饮食和胰岛素治疗的严格方案可显著降低糖尿病并发症的加剧和形成糖尿病并发症的风险。参见 DCCT 研究小组，NEng J Med, 1993。此外，正在实行的糖尿病预防计划（Diabetes Prevention Program）（DPP）已证明，处于糖尿病风险中的个体可通过改变生活方式（诸如减肥和增加体育活动）来显著降低其患此种疾病的机会。参见 DPP 研究小组，NEng J Med, 2002。ADA 曾建议，保健服务提供部门可用一或多种疾病风险因

子来筛选个体,遵循:“如果 DPP 证明一或多种 [经测试] 干预可使 II 型糖尿病发病率降低,则对……进行更为广泛的筛选是合理的”。参见 ADA 立场声明 (Position Statement), Diabetes Care, 2003。

[0006] 空腹血浆葡萄糖 (FPG) 测试是两种已接受的用于诊断或筛选糖尿病的临床标准之一。参见 ADA 协会报告 (Committee Report), Diabetes Care, 2003。FPG 测试是在空腹 12 至 14 小时后测量血浆葡萄糖水平的碳水化合物代谢测试。空腹会刺激激素胰高血糖素的释放,其转而会升高血浆葡萄糖水平。在非糖尿病个体中,身体会产生并加工胰岛素以抵抗葡萄糖水平的升高。在糖尿病个体中,血浆葡萄糖水平一直保持较高。ADA 建议在上午实施 FPG 测试,因为午后测试往往会产生较低读数。在大部分健康个体中,FPG 水平会下降至介于 70 至 100mg/dl 之间。药物、锻炼和近来疾病会影响此测试结果,因此在实施所述测试之前应适当了解病史。126mg/dl 或更高的 FPG 水平表明需要随后重新进行测试。如果重新测试时到达相同水平,通常会做出患有糖尿病的诊断。测量结果仅稍高于正常范围需进行额外测试,包括口服葡萄糖耐量测试 (OGTT) 或饭后血浆葡萄糖测试,以确认糖尿病诊断。会导致结果升高的其它病症包括胰腺炎、库欣氏综合症 (Cushing's syndrome)、肝脏或肾脏疾病、惊厥和其它急性疾病 (诸如败血症或心肌梗塞)。

[0007] 因为 FPG 测试对于患者更易于实施且更为方便,所以此测试受到 ADA 的强烈推荐且其应用范围较另一可接受诊断标准 OGTT 更为广泛。即使存在各种缺点,但 OGTT 仍是用于糖尿病诊断的临床黄金标准。出现饥饿状态后,向患者施予葡萄糖溶液口服剂 (75 至 100 克右旋糖),其通常会引起血液葡萄糖水平在第一小时内升高并在三小时内恢复至基线,原因在于身体产生的胰岛素可使葡萄糖水平正常化。可在 3 小时 OGTT 施予过程中测量血液葡萄糖水平 4 至 5 次。平均而言,所述水平通常在施予口服葡萄糖剂后的 30 分钟至 1 小时达到峰值 160 至 180mg/dl,且随后在 2 至 3 小时内恢复至空腹水平 140mg/dl 或更低。诸如年龄、体重、及种族等因素皆会影响结果,如近来疾病和某些药物等。例如,50 岁以上的老年个体每年葡萄糖耐量增加的上限为 1mg/dl。现行 ADA 指南指出,如果在不同日期分开实施的两次 OGTT 中 2 小时负荷后血糖值均大于 200mg/dl,则可诊断为糖尿病。

[0008] 除这些诊断标准外,ADA 也认可两种反映偏离血糖正常的“前期糖尿病”病况,尽管所述二者是异常的,但不足以作为糖尿病诊断的标准。当一个体的单一 FPG 测试降至介于 100 至 126mg/dl 之间时认为所述个体具有“空腹葡萄糖异常” (IFG)。类似地,当 OGTT 的 2 小时负荷后葡萄糖值介于 140 至 200mg/dl 之间时,通常诊断为“葡萄糖耐量异常” (IGT)。所述两种病症被视为糖尿病的风险因素,且在糖尿病预防计划 (Diabetes Prevention Program) 中使用 IFG/IGT 作为入选标准。IFG/IGT 也与心血管疾病风险增加有关。

[0009] 在进行 OGTT 和 FPG 测试时,由于需要在测试前空腹、侵入性血液抽取和多日进行重复测试而共同使此等测试不方便施予患者且施予时很昂贵。此外,此等测试的诊断准确性具有较大改良空间。例如参见, M. P. Stern 等人, Ann Intern Med, 2002 和 J. S. Yudkin 等人, BMJ, 1990。过去曾进行多种尝试来避免 FPG 和 OGTT 在糖尿病筛选中的缺点。例如,曾尝试过根据患者病史和纸笔形式测试进行风险评定,但此等技术通常会造成诊断准确性变差。此外,曾提出使用糖化血红蛋白 (HbA1c) 进行糖尿病筛选。然而,因为 HbA1c 是数周时间内的平均血糖指标,因此其固有可变性结合与当前可用 HbA1c 分析有关的实验不确定性使 HbA1c 作为糖尿病指剂相当不佳。参见 ADA 协会报告, Diabetes Care, 2003。糖尿病患者

者的 HbA1c 水平会与非糖尿病患者的 HbA1c 水平重叠,此使得 HbA1c 作为筛选测试存在问题。需要可靠、方便且成本有效的方法来筛选糖尿病。同样,用于测量糖尿病效应的可靠、方便且成本有效的方法会有助于治疗所述疾病并避免所述疾病的并发症。

[0010] 美国专利第 5582168 号 (Samuels) 公开用于测量生物组织和类似材料特性的装置和方法。所阐述的这些装置和方法与人眼测量有关。此外,这些发明者阐述的校正方法仅涉及弹性散射激发光的测量。Samuels 阐述了一种简单的线性校正技术。Samuels 并未公开可通过其经由非侵入性测量判别组织疾病状态的演算法或方法。

[0011] 美国专利第 6505059 号 (Kollias) 公开了用于非侵入性组织葡萄糖水平监控的设备和方法。Kollias 并未阐述任何可通过其对所测量荧光的组织吸收和散射作用进行校正的方法。尽管 Kollias 指出可通过实施组织反射测量来直接测量组织散射,但其并未指出人们如何使用此信息来获得与组织荧光光谱有关的信息。而且, Kollias 并未公开可通过其由非侵入性测量确定组织疾病状态的演算法或方法。

[0012] 美国专利第 6571118 号 (Utzinger) 公开了用于在一样品上实施荧光和空间分辨反射光谱法的方法和装置。尽管 Utzinger 阐述了一种其中使用荧光和反射测量组合确定生物组织特性的技术,但所述申请案与皮肤光谱法无关。此外, Utzinger 所述反射测量在自然界中具有空间分辨性,即反射光谱法可在一或多个具体光源-接受器间距下实施。最后,并未阐述其中可使用组织反射测量校正所测量荧光以得到或接近所述组织的固有荧光光谱的演算法或方法。

[0013] 美国专利申请案第 20030013973 号 (Gaorgakoudi) 公开了用于测量组织特性的荧光、反射以及光散射光谱法的系统和方法。Georgakoudi 讨论了使用反射性质评估固有荧光(如用于检测食管癌和巴瑞特氏食道症 (Barrett's esophagus))。Georgakoudi 并未阐述用于所述评估的任何具体技术。

[0014] 美国专利第 6088606 号 (Ignotz) 公开了用于确定医学病症持续时间的系统和方法。Ignotz 提及荧光,但并未使用反射光谱来获得或评估固有荧光光谱。此外, Ignotz 阐述了有关确定疾病持续时间而非诊断或筛选疾病存在或定量具体化学分析物浓度的方法。最后, Ignotz 并未提出皮肤可用作测量部位。

[0015] 美国专利第 5601079 号 (Wong) 阐述一种通过受激荧光以非侵入性方式定量葡萄糖控制、老化和高级美拉德 (Maillard) 反应产物的装置。Wong 具体定量了血液中而不是皮肤及/或其结构蛋白中的高级糖化终产物。此外,荧光校正方法仅涉及弹性散射激发光的测量。Wong 仅阐述一种简单的线性校正技术。最后, Wong 并未公开通过其可经由非侵入性测量判别组织疾病状态的演算法或方法。

[0016] 国际专利申请案第 WO 01/22869 号 (Smits) 阐述一种用于以非侵入性方式测定皮肤自发荧光的装置。所述装置由通过可互换光学带通滤波器照射皮肤的宽带 uv 光源 (blacklight) 构成。所得皮肤荧光经由光导纤维偶连至袖珍光谱仪上。所述申请案提出,可由皮肤自发荧光的定量评定推断皮肤中 AGE 浓度,但其并未阐述可通过其使用所述装置和测量技术定量 AGE 含量的任何方法。所述装置欲用来评定健康个体中皮肤荧光,且并未提出所述装置在疾病确定中的用途。所述申请案指出个体皮肤颜色和结构可能是一种测量干扰因素,但其未提及可补偿这些可变特性的技术或方法。

发明内容

[0017] 本发明提供一种用于确定一个体内组织状态的方法。用激发光照射所述个体组织的一部分,然后检测因组织内一化学物质响应于所述激发光所发出的荧光而由所述组织发出的光。检测光可与荧光与疾病状态相关的模型组合以确定所述个体的疾病状态。本发明可包括单一波长的激发光、激发光扫描(在复数个波长下照射组织)、在单一波长下检测、检测波长扫描(在复数个波长下检测发射光)、及其组合。本发明也可包括可降低因光检测而非来自组织内化学物质荧光的测定误差的校正技术。例如,如果未采用适当校正,则组织反射会引起误差。

[0018] 本发明也可包括能够使荧光与疾病状态相关的多种模型,包括用于形成所述模型的多种方法。其它生物学信息可与荧光性质组合使用以帮助确定组织状态,例如,包括所述个体的年龄、所述个体的身高、所述个体的体重、所述个体的家族病史、种族性、皮肤黑色素水平、或其一组合。也可使用拉曼或近红外光谱检测提供额外信息,例如,如阐述于美国专利申请案第10/116,272号(题目为“Apparatus And Method For Spectroscopic Analysis Of Tissue To Detect Diabetes In An Individual”,2002年4月4日提出申请)中者。本发明也包括适用于实施所述方法的装置,包括适宜光源、组织取样设备、检测器、及用于使所检测荧光与疾病状态相关的模型(例如,于计算机上实现)。

[0019] 本文所用“确定一疾病状态”包括测定糖尿病的存在或发病可能性;糖尿病进展程度;糖尿病存在、发病可能性或进展的变化;具有、不具有、形成、或不形成糖尿病的可能性;糖尿病并发症的存在、不存在或发病可能性。“糖尿病”包括多种血糖调节病症,包括I型、II型和妊娠性糖尿病、由美国糖尿病协会(参见ADA Committee Report, Diabetes Care, 2003)认可的其它类型糖尿病、高血糖症、空腹葡萄糖异常、葡萄糖耐量异常、及前期糖尿病。“组织反射特性”包括可用于校正检测光的任何组织反射性质,例如包括荧光激发波长下的组织反射、荧光发射波长下的组织反射、以及可用于评估组织固有荧光光谱的其它波长下的组织反射。“由血糖控制引起的化学变化”表示由血糖控制而引起的组织化学特性的任何变化,实例包括浓度、组织内糖化终产物的存在、浓度、或浓度变化的测量值;所述终产物积累速率或积累速率变化的测量值;组织膜厚度或所述厚度变化、变化速率或变化方向的测量值;诸如张力强度、应变、或压缩性等组织性质或所述性质的变化、变化速率或变化方向。“糖化终产物的量”表示与高血糖症有关的组织的存在、时间、程度、或状态的任何测量值,例如,包括组织中糖化终产物的存在、浓度、或浓度变化的测量值;所述终产物的积累速率和速率变化的测量值;荧光在已知与组织糖化终产物有关的波长下的存在、强度、或强度变化的测量值;以及所述荧光的积累速率或速率变化的测量值。“一组织状态的确定”包括疾病状态的确定、由血糖控制引起的化学变化的测定、组织中糖化终产物测量值的测定、或其一组合。应了解,当论及光具有“单一波长”时,所述光实际上可能包括复数个波长下的光,但也应了解,光中大部分能量以单一波长或在接近单一波长的波长范围内传递。

附图说明

[0020] 附图未必按比例绘制,其旨在阐述实例性实施例而不欲限制本发明范畴。

[0021] 图1是一激发光谱的曲线图,其中在315至385nm范围内扫描所述激发波长,而在为400nm的固定波长下测量发射荧光。

[0022] 图 2 是一发射扫描数据的曲线图,其中所述激发固定在 325nm 处且通过在 340 至 500nm 范围内扫描检测子系统来监测荧光。

[0023] 图 3 是一图 1 和 2 中光谱的测量光谱(实线,“未校正”)与固有-校正光谱(虚线, $k = 0.5$, $n = 0.7$)的插入方差的图示。

[0024] 图 4 是一在最终目标是使用模型来评定组织疾病状态时通常采用的模型构建步骤的示意图。

[0025] 图 5 是一其中判别功能可达成两组间最佳分隔的方式的图示。

[0026] 图 6 是一数据设置和相应波长范围的图示。

[0027] 图 7 是一用于所有研究参与者的糖尿病类别成员资格的交叉验证后验概率的盒须图。

[0028] 图 8 是一与本发明有关的受试者工作特征曲线和与空腹血浆葡萄糖测试有关的受试者工作特征曲线的图示。

[0029] 图 9 是一交叉验证结果的图示,其中在每次迭代中均轮流使用来自单一研究参与者的所有数据。

[0030] 图 10 是一与本发明有关的受试者工作特征曲线和与空腹血浆葡萄糖测试有关的受试者工作特征曲线的图示。

[0031] 图 11 是一本发明装置组件或子系统的图式。

[0032] 图 12 是一实例性皮肤荧光计的图式。

[0033] 图 13 是一本发明装置一部分的示意图。

[0034] 图 14 是一本发明装置一部分的示意图。

[0035] 图 15 是一适用于本发明的组织界面的示意图。

[0036] 图 16 是一多通道光纤组织探针几何排列的示意图。

[0037] 图 17 是一多通道光纤组织探针环形排列的示意图。

[0038] 图 18 是一多通道光纤组织探针线性排列的示意图。

[0039] 图 19 是一部分多通道光纤组织探针垂直排列的截面图示意图。

[0040] 图 20 是一部分多通道光纤组织探针倾斜排列的截面图示意图。

[0041] 图 21 是一部分多通道光纤组织探针倾斜排列的截面图示意图。

[0042] 图 22 是一光纤组织探针的等角透视图示意图。

[0043] 图 23 是一多通道光纤组织探针在各种激发和接收器间距下探寻组织体积的示意图。

具体实施方式

[0044] 蛋白质暴露于葡萄糖中一般会导致非酶催化的糖化和糖氧化,一种称作美拉德反应的过程。美拉德反应的稳定终产物总称为高级糖化终产物(AGE)。不存在显著性清除时,所述 AGE 以与平均血糖水平成正比的速率聚集。可将美拉德反应视作在健康状态下定期出现而在糖尿病患者中因存在慢性高血糖症而加速出现的老化过程。在皮肤中,胶原是最为丰富的蛋白质且易于经受糖化。皮肤胶原 AGE 通常呈荧光交联物和加成物形式;戊糖素(pentosidine)(交联物)和羧甲基赖氨酸(CML,加成物)是两种得到较好研究的皮肤-胶原 AGE 实例。其它 AGE 实例包括氟联(fluorolink)、pyrraline、crossline、N'-...-(2-羧

乙基) 赖氨酸 (CEL)、乙二醛 - 赖氨酸二聚体 (GOLD)、甲基乙二醛 - 赖氨酸二聚体 (MOLD)、3DG-ARG 咪唑酮、vesperiysine A、B、C 和 threosidine。一常用的聚集 AGE 产生和伴生胶原交联的量度是胶原相关荧光 (CLF) 水平。通常在 370nm 处或 370nm 附近激发后通过于 400 至 500nm 范围内监测经化学分离的胶原的荧光发射体外测量 CLF。参见 Monnier, NEJM, 1986。

[0045] 皮肤胶原相对较长的半衰期 ($t_{1/2} = 15$ 年) 与其多种相关 AGE 的荧光性质使这些物质成为组织血糖累积的潜在指示剂。CLF 强度和具体皮肤 AGE 的水平与终末器官糖尿病并发症 (诸如关节僵硬、视网膜病、肾病和动脉僵硬) 的出现和严重程度有关。参见 Buckingham, Diabetes Care, 1984; Buckingham, J Clin Invest, 1990; Monnier, NEJM 1986; Monnier, J Clin Invest 1986; Sell, Diabetes, 1992。迄今在大量此类研究中, DCCT 皮肤胶原辅助研究小组 (DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group) 通过由大部分研究参与者捐赠的穿刺活检评估了多种皮肤胶原变量。这些研究者发现, 皮肤 AGE 与糖尿病神经病变、肾病和视网膜病的出现以及临床等级紧密相关。参见 Monnier 等人, Diabetes, 1999。

[0046] 本发明可使用一或多种非侵入性荧光测量确定一受试者的糖尿病状态。本发明可用激发光照射个体组织的一部分 (例如, 皮肤的一部分) 并检测由所述组织发出的荧光。荧光测量可包括至少一组与上文所述 CLF 窗口相对应的激发和发射波长。荧光特性可在探寻状态下传输与组织疾病状态有关的信息。本发明可将额外的处理演算法应用于经测量的荧光上, 其后提供简单数值阈值或更为详细的数学模型以将光学信息与疾病状态相关。在其它实施例中, 阈值处理方法或数学模型的输出可以是个体组织中糖尿病诱发的化学变化的定量量度, 在测量所述化学变化时未考虑所述个体的糖尿病状态。在另一些实施例中, 本发明可使用糖尿病诱发的化学变化的定量量度来进一步推断经历测量的个体中糖尿病状态或对其加以分类。

[0047] 确定组织的荧光性质

[0048] 当用可促使各种分子物质中电子达到激发能级的光照射组织时即可引发组织荧光。某些受到激发的分子放射衰减, 发射光的同时电子返回较低能态。释放的荧光总是具有长于激发光的波长 (较低光子能量)。生物分子的吸收光谱和荧光光谱通常为宽谱且重叠。大部分组织会吸收较宽范围的波长。对于一给定激发波长, 释放的荧光光谱通常相应较宽。若干因素会影响到激发波长和发射波长的可用范围。发荧光物质 (例如戊糖素) 通常在 UVA (315 至 400nm) 范围内吸收最强且在 UVA 至整个短波长可见光范围内 (340 至 500nm) 释放。所述激发和发射范围的长波长界限通常受到发荧光组份电子结构的影响。出于光学安全性考虑会将最短的实际应用激发波长限制在 UVA 或更长波长范围内。对于 315nm 以下的波长, 用于光学曝光的阈值界限值会显著降低。因此, 用于 UVB (280 至 315nm) 范围内波长的安全曝光时间对有效光谱数据获取而言会过短。

[0049] 如果荧光计激发或发射部分的光谱选择性相对较粗略, 则仅会获得有关生化和形态学的总体组织信息。更有用的方法是考虑因响应于具有单个或窄范围波长的光的激发而在一特定波长 (或窄范围波长) 下的发射 - 激发 / 发射对。实际上, 可监测一特定波长对下的荧光信号, 或可获得对应于激发 / 发射对集合的信号。在光源波长固定时形成发射光谱 (或发射扫描) 且在一定发射波长范围内获取荧光信号。类似地, 尽管光源波长变化但

可通过固定经检测的发射荧光的波长来获取激发光谱。可使用激发-发射图谱来代表作为覆盖一定范围激发和发射波长地形面的荧光信号。发射和激发光谱对应于此一图谱的垂直剖面。落入激发-发射图谱对角线上的值点（即，在激发和发射波长相等之处）表示由组织反射回检测系统的弹性散射光子的强度。这些“反射”测量值可通过荧光计中激发和发射单色仪二者的同步扫描或通过分开的专用装置获得。可使用荧光和反射测量值二者来确定光学上混浊介质（如生物组织）的真正或“固有”荧光性质。

[0050] 当激发光发射到组织上时，其会经历散射和吸收过程，此随所探寻部位的光学性质、激发波长和光学探针几何结构而变化。因发射荧光会在出射和收集之前传播通过组织，所以其也会经历波长相依性和位置相依性的吸收以及散射。通常，感兴趣的组织性质是其“固有”荧光，将其定义为均一、无散射和光学上稀薄的样本发射的荧光。为准确辨别感兴趣组织的固有荧光光谱，可去除施加于激发和发射光上的散射和吸收的光谱改变作用。由受试者-受试者差异和部位-部位差异造成的变化会胜过指示组织状态的细微光谱变化。基于每一受试者的组织光学（在与荧光测量相同的部位，或在与所述部位具有可预测关系的不同部位）进行光谱校正能够发现感兴趣分子的固有荧光光谱。这种固有校正可减轻跨受试者和受试者内的变化，发现与疾病存在和疾病状态有关的光谱特征。

[0051] 使用 SkinSkan 荧光计（由 Jobin-Yvon, Edison, NJ, USA 出售）收集本实例中所述数据。SkinSkan 系统的激发侧和发射侧具有双重扫描 1/8-m 光栅单色仪，可达成~5nm 的系统带通。激发光由 100W 的 Xe- 弧灯提供且为与含有 31 个光源纤维和 31 个检测纤维的双支纤维探针相匹配的 f/ 数。所述纤维具有 200 微米的芯径且可以直径为 6-mm 的环形束随机排列于套圈内，其远端作为皮肤界面。检测纤维的输出端堆叠在输入套圈内，且纤维宽度形成通向第一输入单色仪的入口狭缝。光学检测可用光电倍增管达成，其增益可通过软件来控制。不论何时实施非侵入性光谱法，皆需达成均一反射材料（2% Spectralon, UabSphere, North Sutton, NH, USA）的背景测量以促进仪器谱线形状的移动。此外，SkinSkan 系统提供一种可独立监测激发灯的硅光电检测器，以用于校正灯亮度的波动。因此，如下报告“所测量的”皮肤荧光值 (F_{meas})：

$$[0052] \quad F_{\text{meas}}(\lambda_x, \lambda_m) = \frac{F_{\text{tiss}}(\lambda_m) - I_{\text{DC}}}{L(\lambda_x; t_{\text{tiss}})} \cdot \frac{L(\lambda_m; t_{\text{back}})}{R_{\text{back}}(\lambda_m) - I_{\text{DC}}},$$

[0053] 方程式 1

[0054] 其中 λ_x 为激发波长， λ_m 为发射波长， F_{tiss} 为检测器上“未经处理的”荧光， I_{DC} 是 PMT 暗电流， L 是激发灯亮度， t 表示时间，back 表示 Spectralon 背景，且 R_{back} 是 Spectralon 背景的反射。类似地，可如下报告所测量的皮肤反射值 (R_{meas})：

$$[0055] \quad R_{\text{meas}}(\lambda) = \frac{R_{\text{tiss}}(\lambda) - I_{\text{DC}}}{L(\lambda; t_{\text{tiss}})} \cdot \frac{L(\lambda; t_{\text{back}})}{R_{\text{back}}(\lambda) - I_{\text{DC}}}$$

[0056] 方程式 2

[0057] 其中 R_{tiss} 是检测器上“未经处理的”组织反射信号。当 SkinSkan 系统用于荧光和反射测量二者时，对于每一测量形式需要使用不同的 PMT 偏置电压以避免检测器饱和。

[0058] 典型所测量的皮肤荧光光谱示于图 1 和 2 的左侧图示内。这些图显示在两个不同波长范围内于不同收集形式下获得的光谱。图 1 显示激发光谱，其中在 315 至 385nm 范围内扫描激发波长，而在为 400nm 的固定波长下测量发射荧光。图 2 呈现发射扫描数据，其中激

发固定在 325nm 且通过在 340 至 500nm 范围内扫描检测子系统来监测荧光。所有光谱均来自年龄在 40 至 60 岁之间的 17 位糖尿病受试者和 17 位非糖尿病受试者的手臂获得。这些图的中间图示描述所测量的反射光谱。每一反射光谱对应一具体荧光光谱且在相同受试者的同一部位获取。荧光和反射光谱证明存在由探针的不良重新定位、环境变化和受试者 - 受试者生理差异造成的典型变化。这些变化会超过由疾病状态引起的光谱变化并妨碍所测量光谱用于诊断。为准确判别或定量疾病状态,应用额外的组织 - 特异光谱校正来获得固有组织荧光。一种评估固有荧光光谱的近似值 (F_{corr}) 包括用所测量的荧光光谱除以激发及/或发射波长下所测量反射的方根值 (例如,参见 Finlay 等人, Photochem Photobiol, 2001 和 Wu 等人, Appl Opt, 1993) :

$$[0059] \quad F_{corr}(\lambda_x, \lambda_m) = \frac{F_{meas}(\lambda_x, \lambda_m)}{R_{meas}(\lambda_x)^k R_{meas}(\lambda_m)^n}; n, k < 1$$

[0060] 方程式 3

[0061] n 和 k 的最佳值需根据光源和检测器纤维的排列确定且可按经验确定。使用方程式 3 的校正函数并用 $k = 0.5$ 及 $n = 0.7$ 的数值由图 1 至 2 光谱得到的固有荧光光谱示于这些图的右侧图示中。需注意,固有校正已排除大部分的患者内部变化,且可直观分辨对应于疾病状态的光谱粗略组别。

[0062] 对图 1 和 2 中阐明的固有校正中所用 n 和 k 的数值加以选择以最小化与研究参与者前臂重复插入测量器械有关的光谱变化。如果一次患者检查中由每一参与者收集到多个光谱,则可将受试者 j 的第 i 个光谱的光谱插入偏差 (S_{insert}) 表示为来自所述受试者中值光谱的绝对偏差:

$$[0063] \quad S_{insert,i,j}(\lambda, n, k) = \text{abs}[F_{corr,i,j}(\lambda, n, k) - \text{median}(F_{corr,j}(\lambda, n, k))] / \text{median}(F_{corr,j}(\lambda, n, k)).$$

[0064] 方程式 4

[0065] 则综合插入偏差是 S_{insert} 的方差:

$$[0066] \quad v_{insert}(\lambda, n, k) = \text{var}(S_{insert}(\lambda, n, k)). \quad \text{方程式 5}$$

[0067] 图 3 绘示图 1 和 2 光谱中所测量 (实线,“未校正”) 光谱和固有 - 校正光谱的 (虚线, $k = 0.5$, $n = 0.7$) 插入方差。由其可知,在整个波长范围内固有校正处理可使插入方差大约降低 4 倍。在假设组织固有荧光不会因插入不同而发生改变的情况下,此程序会减轻一部分组织光学性质变化的破坏影响。

[0068] 多种其它程序可达成固有荧光校正。例如,曾阐述过可通过其使用所测量的反射、组织光学性质和探针相依性参数的知识校正所测量荧光的多种方法。例如参见, Gardner 等人, Appl Opt, 1996, Zhang 等人, Opt Lett, 2000; Muller 等人, Appl Opt, 2001。此外,可使用一其中对于一给定荧光探针的校正参数可通过测量一或多种组织模拟材料 (对于其, 荧光、吸收和散射性质已得到充分辨别) 来形成的程序进行固有荧光校正。本程序亦可通过光学探针对具有已知光学性质介质的反应的 Monte-Carlo 模拟或其它计算机模拟来达成。可使用这些方法中的任一种来校正非侵入性皮肤荧光测量中组织光学性质的影响。本文所述多通道光学探针可使组织光学性质的测量成为可能。光学性质可通过求解多通道荧光及/或反射测量所给出的分析公式来确定。或者,可通过和可使所测量值与光学性质预定值相关的查找表进行比较,由光谱测量值评估光学性质。所述查找表可由在一定模拟光学性质范围内模拟多通道强度测量的数值模型形成。查找表亦可通过跨越一定光学性质范围的

组织样模拟材料的实验测量值构建。然后可应用所测量的或经估测的光学性质校正其对入射光和荧光诱发的光谱失真。可通过与按数值或经验推导的探针校准表进行比较来达成校正。所测量或经估测的组织光学性质已得到确定后,也可应用荧光光谱法的逆向算法求出皮肤固有荧光。用于组织荧光多通道光学校正的替代方法包括软模型技术,诸如上文所述(方程式 3)。可使用多通道测量减轻表皮色素沉着和表面血液含量的影响。例如,通过计算相邻通道中反射量度的比值(方程式 6),可基本排除表皮滤波作用,得到两个通道的转移函数的比值且从而得到其探寻的组织层的转移函数的比值。

$$[0069] \quad R_1 = I_0 \exp(-\mu_{a, \text{epi}} \cdot 2t_{\text{epi}}) T_1(\lambda_{a, \text{derm}}, \mu_{s, \text{derm}}),$$

$$[0070] \quad R_2 = I_0 \exp(-\mu_{a, \text{epi}} \cdot 2t_{\text{epi}}) T_2(\mu_{a, \text{derm}}, \mu_{s, \text{derm}}),$$

$$[0071] \quad R_{\text{norm}} = R_1/R_2 = T_1/T_2, \quad \text{方程式 6}$$

[0072] 将按照方程式 6 的技术应用于各个通道的荧光信号上可产生荧光转移函数,所述转移函数可提供其中已很大程度地消除了表皮和真皮上层遮蔽作用的有用荧光信息。来自各个通道的光谱数据可合并及/或结合以便为多变量技术提供可产生更准确及/或更强大定量和分类模型的附加光谱信息。

[0073] 尽管本文所述实例一般在涉及稳态荧光测量时未考虑偏振,但有可能将这些方法应用于其它荧光测量形式。例如,频域荧光光谱法可适用,其中在 RF 频率下对激发光进行调幅并监测发射光的相位和调制。另一适宜方法包括时间分辨技术,其中将短脉冲激发光施加于组织上,之后抽查所得荧光发射的时间演化。频域和时间分辨测量二者均会增加监测器性能,例如,荧光寿命(可提供额外判别力的参数)。此外,有可能使用偏振激发光和偏振灵敏检测测量荧光各向异性,由 $r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2I_{\perp})$ 定义,其中 $I_{||}$ 和 $I_{\perp}$ 分别是具有与线性偏振激发光束的偏振平行和垂直的偏振的荧光强度。荧光各向异性测量可分离来自具有重叠光谱但具有不同旋转相关时间或分子定向的荧光团的信号。此外,这些技术中的任何一种均可与成像法(诸如激发光束的显微镜镜检或宏观扫描)联合使用以便获取有关荧光团空间分布的信息。上述方法中的任何一种可与能够辨别深度的测量技术(诸如共聚焦检测系统或光学相干断层扫描)联合使用,以增加关于荧光团在组织表面下分布深度的信息。

[0074] 确定荧光性质与疾病状态或化学变化相关的模型

[0075] 当目测检查光谱数据时一或多个波长下组织荧光性质与糖尿病疾病状态之间的关系并不明显。鉴于此种情况,有必要使用固有荧光光谱构建多变量数学关系或“模型”以对组织疾病状态进行分类或定量化学变化。此种模型的构建一般按两个时期进行:(I) 收集“校准”或“训练”数据,和(ii) 建立训练数据与疾病状态或训练数据中呈现的参考浓度之间的数学关系。

[0076] 在训练数据收集期间,可能期望收集来自多个个体的荧光数据,以代表希望用拟构建的模型来表征的所有疾病状态或参考值。例如,如果希望构建一可使糖尿病患者与非糖尿病患者分开的模型,则会需要收集来自两种类型个体的众多代表性光谱。重要的是以最小化疾病状态与其它可导致荧光变化的参数间相关性的方式收集这些数据。例如,健康状况下胶原 AGE 的天然形成会导致皮肤 AGE 含量与实足年龄间的相关性。因此重要的是获得来自跨越期望适用分类模型的年龄的糖尿病患者和非糖尿病患者的光谱。或者,如果希望构建可定量具体皮肤胶原 AGE 水平的模型,则可建议每天收集跨越宽范围 AGE 参考值的

光谱数据而不是测量所有在研究早期具有最小 AGE 浓度的个体和所有在研究后期具有较大 AGE 浓度的个体。在后种情形下,会产生 AGE 浓度与时间之间的假相关性,并且如果在研究过程中存在仪器倾向,那么所得模型可能是针对设备状态而非针对分析物浓度进行校正。

[0077] 在收集训练数据的同时,可收集额外参考信息以便随后构建一适宜分类模型。例如,如果所述分类模型用于预测糖尿病状态,则可收集训练集合中代表的某些或全部个体的糖尿病状态并使之与相应光谱训练数据有关。或者,分类模型可预测皮肤中某种化学物质的水平,诸如糖化胶原、糖化弹性蛋白、具体 AGE (诸如戊糖素或 CML)、或由与糖尿病有关的高血糖病症改性的其它蛋白质。在这些情形中,可在训练数据收集期间自诸多个体中收集皮肤活检样本。此外,如果在进行后期疾病状态评定中使用其它辅助信息(诸如年龄、身体质量指数、血压、HbA1c,等等),则可收集训练集合中某些或所有光谱的此类信息。

[0078] 收集训练数据后,可构建一多变量模型以使与训练数据有关的疾病状态与相应光谱信息相关。可根据训练时期的最终目标选择准确模型。至少有两种类型人们能够构建的多变量模型。在第一类中,训练过程的目标是形成可正确分类所测量组织疾病状态的模型。在此一情形中,所述模型的输出是一或多个分立类别或组别的分配。这些类别或组别能够代表特定疾病的不同等级或表现。其也能够代表感染特定疾病或与所述疾病状态有关群体的其它亚群的各种风险程度。对于第二类模型类型,目标是提供系统中某种糖尿病诱发的化学变化的定量估测。这种模型的输出在相关变化范围内连续变化且不必指示疾病状态。

[0079] 组织疾病状态的分类

[0080] 通常当最终目标是使用模型评定组织疾病状态时所进行的模型构建步骤以图表方式阐述于图 4 中。第一步是光谱预处理,涉及光谱数据的预处理(如果需要),包括(例如)上文所述的背景校正和固有荧光校正步骤。第二步中,可通过采用因子分析法降低数据集维度。因素分析法可使个体光谱是由其在一组因子上的得分来阐述而非由其在各收集波长下的光谱强度阐述。可在这步中使用多种技术:主分量分析(PCA)是一种适宜方法。例如,也可使用由偏最小二乘(PLS)回归对与疾病状态有关的参考变量产生的因子。已产生各种因子后,可选出那些对分类最为有用的因子。有价值因子通常展现出类别间的较大分离而在具有较小的种类内部方差。可根据分离性指数选择因子;一种可用于计算因子 f 的分离性指数的方法是:

$$[0081] \quad \text{分离性}_f = \frac{|\bar{x}_{1,f} - \bar{x}_{2,f}|}{s_{1,f}^2 + s_{2,f}^2}, \quad \text{方程式 6}$$

[0082] 其中 $\bar{x}_{1,f}$ 是类别 1 的平均分值, $\bar{x}_{2,f}$ 是类别 2 的平均分值,且 s^2 代表一个类别内的方差。

[0083] 最后,可选择一种用于将数据分成各种类别的技术。有多种算法适合,且可根据训练数据的结构选择最优算法。在线性区别分析(LDA)中,构建可将多维光谱数据最佳地分成训练期间观察到的参考类别的单个线性函数。在二次区别分析中,构建二次区别函数。图 5 阐明其中区别函数能够找到两个组别间最佳分离的方式—其需视数据结构而定。在一些情形中(图 5(a)),线性区分函数足以将各类别区分开。然而随着各类别多维结构变得更加复杂,需要更为复杂的分类函数,诸如二次函数(图 5(b))。在一些情况下(图 5(c)),数

据结构使得即使用二次区别分析也很困难而其它分类方法更为适宜。存在多种适宜分类算法。例如, k-最近邻法、逻辑斯蒂回归、分层聚类算法(诸如分类和回归树(CART))、以及机器学习技术(诸如神经网络)全部为适宜和有用技术。所述技术的详细论述可在下列文献中得到: Huberty, Applied Discriminant Analysis, Wiley & Sons, 1994 和 Duda、Hart 与 Stork, Pattern Classification, Wiley & Sons, 2001。

[0084] 糖尿病诱发的化学改变的定量

[0085] 如果最终目标是定量组织内含的一种分析物或一类分析物的浓度,则在模型构建过程中采用一不同方法。在这种情形中,对于训练集合中某些或全部光谱可得到所述一或多个分析物的一组(通常为连续的)参考数值。例如,在模型是用于定量皮肤胶原中戊糖素水平的情形中,与训练集合中各光谱有关的参考浓度可于皮肤穿刺活检样本(校准期间得到)上实施的戊糖素分析中获得。在活检法对于研究参与者侵入性过强的情形中,也可采用 AGE 相关化学变化的某种替代物。例如,在假设 FPG 值随糖尿病进展程度增加而增加的情形下,适度折衷方式为收集 FPG 数据以作为皮肤 AGE 浓度的替代物。可类似使用 HbA1c 和 OGTT 信息。

[0086] 用于预测与测试集合有关的定量数值的校准模型可通过形成参考数值与相关光谱数据间的数学关系来构建。有多种算法适用。例如,在主分量回归法(PCR)中首先将校准数据分解成正交分值和载入值的集合,且随后使参考数值回归至最初 NPCA 因子的分值上。另一适宜方法是偏最小二乘(PLS)回归,其中构建一因子集合以使参考数值与各个连续 PLS 负荷向量上的分值之间的平方协方差最大。这些程序和其它程序已由 Martens 和 Naes 概述于 Multivariate Calibration, Wiley & Sons(1989) 中。

[0087] 当然定量校准模型并不限于上文所述的回归技术。熟习此项技术者会认识到,可使用多种其它方法,包括其它回归技术、神经网络、以及其它非线性技术。

[0088] 由荧光性质确定疾病状态或化学变化

[0089] 构建模型之后,可在具有未知疾病状态或糖尿病相关化学变化的新样本上进行荧光测量。通过其可确定新样本疾病状态或化学性质的方法需取决于训练时期所构建模型的类型。

[0090] 组织疾病状态的分类

[0091] 如上所述,可使用多种模型根据所测量的荧光性质判别各种糖尿病状态。例如,当使用二次区别分析法时,将新荧光光谱投射到分类模型构建期间用训练数据形成的因子上,以对于测试光谱形成一新的分值向量, x_i 。对于各类别 j 计算覆盖先前所选因子的训练集合分值的平均值 $\bar{x}_j$ 和协方差矩阵 S_j 。例如,对于两类(即,糖尿病对非糖尿病患者)问题 $j = 1, 2$ 。然后通过下式对各分值向量计算由样品 i 到类别 j 的马哈拉诺比斯距离(Mahalanobis distance), $D_{i,j}$ 。

$$[0092] \quad D_{i,j} = (x_i - \bar{x}_j)^T S_j^{-1} (x_i - \bar{x}_j) \text{ 方程式 7}$$

[0093] 可使用方程式 8 计算测试样品 i 是一类别 j 中成员的后验概率 $p(i|j)$ 。同所有概率一样,此数值介于 0 至 1 范围内;概率接近 1 表明观察结果靠近糖尿病类别,而概率接近 0 表明观察结果靠近非糖尿病类别。样品 i 是一类别 j 成员的概率由下式给出:

$$[0094] \quad p(i \in j) = \frac{\pi_j e^{-D_{ij}/2}}{\sum_j \pi_j e^{-D_{ij}/2}} \text{ 方程式 8}$$

[0095] 其中 π_{ij} 为测试样品 i 是一类别 j 成员的基于其它知识（风险因素等等）的先验概率。先验概率是可在部分依赖于分类算法诊断应用的预测时期加以调整的参数。

[0096] 最后,可使用对特定组织疾病状态进行新荧光测量值赋值的阈值。例如,能确定的是,将产生大于 0.75 的糖尿病后验概率的所有荧光测量值赋值给糖尿病类别。与先验概率一样,确认中所采用的精确阈值需视多种因素而定,包括应用、患病率和阳性与阴性测试结果的社会经济学结果。

[0097] 糖尿病诱发的化学改变的定量

[0098] 定量校准模型的输出可以通过内积将经校正的荧光光谱转换成定量分析物预测的回归向量：

$$[0099] \quad \hat{a} = F_{\text{corr}} \cdot b, \text{ 方程式 9}$$

[0100] 其中 $\hat{a}$ 是分析物预测而 b 是回归向量。

[0101] 用于产生定量输出的方法可随训练时期所构建的模型改变。可通过不同方法使用（例如）神经网络的最终分析物定量但也会产生类似输出。

[0102] 构建各类多变量模型（即,用于化学变化的定量模型或用于组织疾病状态的分类模型）后,可通过预测与经充分辨别的“确认”光谱有关的疾病状态来测试模型的准确性。对于达成此项任务也存在多种技术。在留一法交叉验证中,从模型构建过程中删除来自训练集合的单个光谱或成组光谱,且随后使用所得模型预测与自模型中删除的光谱有关的疾病状态。通过重复此过程足够次数,能够在新条件下形成模型性能的数学评估。新构建模型的更为严格的测试是将所述模型应用于全新数据集合或“测试”集合。在这种情形中,与各光谱有关的疾病状态是已知的,但在不同于训练数据收集的时间收集“测试”光谱（例如,于模型构建之后）。通过比较对“测试”数据的预测与和这些数据有关的参考数值,可不依赖训练数据对所述模型的诊断准确性进行评定。

[0103] 实例实施例

[0104] 图 6 至 10 绘示在 3 个月时间内实施的大型校准研究的结果。在这些实验中,使用市售荧光计 (SkinSkan, Jobin-Yvon, Edison, NJ, USA) 由研究参与者手臂皮肤获得非侵入性荧光和反射光谱。在训练时期,通过荧光光谱法对 57 位 II 型糖尿病受试者和 148 位非糖尿病受试者加以测量。根据其年龄和自身报告的糖尿病状态选择研究参与者。除受试者自身报告的本身疾病状态外,也收集本研究中所有糖尿病患者和一部分非糖尿病患者的 FPG 和 OGTT 参考信息。对于这些个体,分别在两个不同日期收集 FPG 和 2 小时 OGTT 数值。在第 3 天收集光谱测量值,且未对研究参与者强加具体空腹要求和其它测试前准备。

[0105] 在本研究中,获得若干荧光数据集合。以 2.5-nm 数据间隔收集 3 个不同发射扫描集合:(1) $K = 325\text{nm}$, $\lambda_m = 340$ 至 500nm , (2) $\lambda_x = 370\text{nm}$, $\lambda_m = 385$ 至 500nm , 和 (3) $\lambda_x = 460\text{nm}$, $\lambda_m = 475$ 至 550nm 。此外,也收集 3 个不同激发扫描集合 (2.5nm 的数据间隔):(1) $\lambda_m = 460\text{nm}$, $\lambda_x = 325$ 至 445nm , (2) $\lambda_m = 520\text{nm}$, $\lambda_x = 325$ 至 500nm , 和 (3) $\lambda_m = 345\text{nm}$, $\lambda_x = 315$ 至 330nm 。也收集低分辨 (10-nm 的数据间隔) 的激发-发射图谱 (EEM) 以及跨越荧光数据获取中所用激发和发射波长范围的皮肤反射数据。这些数据集合及其相应波长

范围以图形方式绘示于图 6 中,其中黑色空心圆表示激发扫描,灰色实心圆表示发射扫描,灰色 x 符号表示 EEM,而黑色 x 符号表示反射扫描。对于每一研究参与者获取这些数据集合中每一数据的两个重复。光谱数据集合的每一重复从手臂的不同物理区域获得。

[0106] 用这些训练数据构建两个不同的多变量模型。第一个模型根据其明显的糖尿病状态分类新测量值。第二个模型使用作为皮肤-胶原 AGE 含量替代物的 FPG 参考数值定量糖尿病诱发的化学变化。

[0107] 组织疾病状态的分类

[0108] 完成训练数据收集之后,将所有非侵入性测量值连同参考信息(自身报告的糖尿病状态、FPG 和 OGTT 参考数值)收集在一起。首先在所有荧光数据上实施后处理,包括使用方程式 3 中所述方法($k = 0.5$ 且 $n = 0.7$)校正固有荧光。此处呈现的结果是通过将上文所述的 3 组激发扫描合并成单个大型荧光光谱获得。使用 PCA 因子分析法降低所述数据集合的维度,并使用 QDA 使用前 25 个主分量中 5 个分量的分值使用方程式 6 中指出的分离性指数构建分类函数以判别出那些最适用于类别区分的 PCA 因子。使用留一交叉验证方法评定 QDA 分类函数的诊断准确性。在本实例中,单个患者的所有光谱数据均由训练数据提供,构建独立的 QDA 模型,并计算糖尿病类别中每一光谱成员资格的后验概率。图 7 是一所有研究参与者中糖尿病类别成员资格的交叉验证后验概率的盒须图。由其可知糖尿病个体一般展现出高于非糖尿病患者的糖尿病概率。对于诊断测试这时常有情况,没有单个测试阈值能够利用实例数据将所有糖尿病患者与所有非糖尿病患者完全分开。汇总 QDA 分类函数诊断准确性的一种方法是对于测试阈值范围绘制真阳性率(即,灵敏度)-假阳性率(即,1-特异性)曲线。对于完美分类测试而言所得受试者工作特征(ROC)曲线下面积接近 1,而对于几乎是随机偶然的测试而言则接近 0.5。来自上文所述 QDA 交叉验证程序的 ROC 曲线如图 8 中实线所述。所述 ROC 曲线下面积是 0.82,而在所述曲线拐点处,当假阳性率约为 20%时获得大约 70%的灵敏度。有关的相等错误率(灵敏度和假阳性率相等时的所在点)约为 25%。所有这些 ROC 参数有利于同来自 FPG ROC 曲线的相当数值(作为用于比较的虚线示出)比较。由覆盖参与 1988 至 1994 年进行的美国第三次国家健康和营养检查调查(Third National Health and Nutrition Examination Survey)的 16,000 名个体的数据库计算 FPG 测试的 ROC 曲线。通过将各种测试阈值应用于 FPG 测试数值上使用研究参与者自身如实公开的糖尿病状态来产生所述曲线。

[0109] 糖尿病诱发的化学改变的定量

[0110] 与其用荧光测量值直接为未知样本指定糖尿病疾病状态,不如产生与糖尿病出现或进展有关的化学变化定量程度更有价值。例如,可通过皮肤活检分析戊糖素、CML 或另一皮肤胶原 AGE 的浓度。所述参考数值可用于构建如上文所述的多变量模型。但在本实例中,所述参考数据不可用,而使用训练时期收集到的 FPG 数值作为此化学信息的替代物。

[0111] 由相同的上文所述经校正荧光数据构建定量 PLS 校准模型。此处呈现的结果通过将上文所述的 3 个激发扫描合并成单个大型荧光光谱获得。总共 3 个潜在变量或 PLS 因子由非侵入性荧光数据构建并用于模拟 FPG 参考数值的改变。因为大部分荧光波长集中在 CLF 窗口周围,因此推测光谱变化(至少部分地)源于胶原交联和相关糖尿病进展。因此,预计所述 FPG 测试数值不能作为疾病进展的最佳替代物。

[0112] 交叉验证的结果呈现于图 9 中,其中在每次迭代中均轮流应用所有来自单个研究

参与者的数据。3 个模型因子的 PLS 估计值绘示于 y- 轴上 ; 因为据推测荧光变化源于 AGE 化学性质, 所以将此轴标为“化学进展 (Chemical Progression)”, 且量纲可是任意的。相应的 FPG 值标示在横坐标上。来自糖尿病受试者的数值以灰色实心圆绘示, 而非糖尿病受试者由空心圆代表。由此图可知, 一般而言较大参考数值对应于化学进展的较大 PLS 估计值, 但正如所预料的, 未呈现理想的线性关系。此外, 由此图可知, 平均而言糖尿病个体展现出大于非糖尿病个体的化学进展估计值。与真正疾病进展更为接近直线关系的参考数值 (诸如一或多种皮肤 - 胶原 AGE) 能够产生更符合线性关系的模型。

[0113] 尽管糖尿病相关化学变化的定量模型仅能报告测试数值 (即, 不能表现与组织疾病状态有关的分类), 但也有可能使用此种模型的输出以用于分类目的。此程序的一个实例在图 10 中说明, 它是由图 9 中所述 PLS 化学进展估计值使用研究参与者自身如实报告的糖尿病状态形成的 ROC 曲线。来自图 8 的 FPG ROC 曲线再现于图 10 中以供比较之用。所述 ROC 曲线下面积是 0.81, 且在所述曲线拐点处于 20% 的假阳性率下达到 65% 的灵敏度。有关的相等错误率 (灵敏度和假阳性率相等时的所在点) 约为 25%。所有这些 ROC 参数再次有利地同来自 FPG ROC 曲线的相当数值比较。

[0114] 实例性装置

[0115] 由组织荧光表征及 / 或定量疾病状态的装置的组件或子系统在图 11 中说明。照射子系统包括适于照射组织从而以电子激发组织内内源发色团的光源 A。照射子系统包括光学系统 B, 其可将由光源 A 产生的光与组织耦接起来并从组织样品收集所得荧光并且将收集到的荧光与检测子系统 C 耦接起来。在检测子系统中, 通常将荧光转换成电子信号。通过分析或数据处理和控制系统 D 测量并表征对应于组织荧光的信号。处理 / 控制系统也可控制或更改其它子系统的作用。

[0116] 此种系统的实例 I 包括作为光源核心元件的高强度弧光灯、光闸、单色仪和准直器。光耦合子系统由可将激发光与组织耦接起来并收集由组织发出的荧光的双支纤维束构成。双支纤维束的第二条引线将经收集到的荧光与检测子系统耦接起来。检测系统包含一单色仪 (不同于组件 A 的单色仪) 和一检测器, 诸如光电倍增管。使与组织荧光相对应的电信号数字化、对其进行处理并由计算机储存 (组件 D)。所述计算机也可控制其它子系统的功能, 诸如单色仪的调谐和光闸的开关。

[0117] 实例 II 中, 用透镜和反射镜系统取代实例 I 的双支光线束以将来自光源的激发光传送到组织且随后收集由组织发射的荧光并将其转输至检测子系统。

[0118] 在实例 III 中, 用一或多个离散光源 (诸如 LED 或激光二极管) 取代实例 I 中由高强度弧光灯和单色仪构成的宽波段光源。LED 会需要适宜光学带通滤波器来产生波长足够窄的激发光。LED 或激光二极管可以连续波、经调制或脉冲方式操作。可通过光学子系统 (诸如实例 I 的光纤束或实例 II 中所述反光镜及 / 或透镜的集合) 将这些光源的输出与组织耦接起来。

[0119] 在实例 IV 中, 用摄谱仪和检测器阵列或 CCD 阵列取代实例 I 中由单色仪和单个检测器构成的检测系统。

[0120] 一皮肤荧光计的实例呈现于图 12 中。照射子系统由耦接有双单色仪的氙弧灯构成。将来自单色仪的窄光谱输出耦接入双支纤维束中。接触组织的套圈中的纤维可随机排列 (如图 13 中所示) 或可以具体光源 - 检测器纤维间距进行设计来构建 (如图 14 中所

示)。一装有可与所述受试者皮肤接触的纤维束的夹具实例(在本实例中,为前臂支架)示于图 15 中。所述支架提供一种可使受试者舒适放置其手臂同时前臂下侧皮肤与纤维束传输/收集端相接触的方式。所述支架也便于手臂部位相对于光纤束的定位重现。双支纤维束内由检测器纤维收集到的荧光形成通向荧光计第二单色仪的入口狭缝,如图 12 中所示。单色仪可过滤输入荧光并允许窄频带落至检测器、光电倍增管(PMT)或通道光电倍增管上。可由足够敏感的硅雪崩光电二极管或常规硅光电二极管取代 PMT。光源和检测器单色仪二者中的可调谐光栅对可允许每一部分的波长经单独调谐。使来自 PMT 的信号数字化并通过计算机记录,所述计算机也可调谐光栅、调节检测器并控制单色仪光闸。

[0121] 其可用于择优收集来自真皮的信息。图 14 是一适用于本发明的组织界面的图示。所述组织界面包括复数个可用于与光源进行光通信并适于向组织传输激发光的激发纤维。其进一步包括复数个可用于与检测器进行光通信并适于接受所述组织因响应于激发光而发射的光的接收纤维。接收纤维彼此隔开并相对于所述激发纤维进行排列,使得能够择优收集来自皮肤真皮层的荧光信息而无需对真皮进行物理暴露。

[0122] 如先前所论述,对于组织光学性质的测量也可采用经由多通道择优收集来自真皮的信息。图 16 是一适用于本发明的组织界面的图示。所述组织界面包括复数个可用于与光源进行光通信并适于将激发光传输至组织的激发纤维(例如,如实心圆所示)。其进一步包括复数个可用于与检测器进行光通信并适于接收所述组织因响应于激发光而发射的光的接收纤维(例如,如空心圆和有水平线阴影的圆二者所示)。在所述图示中,空心圆包括接收纤维的第一通道且有阴影的圆包括接收纤维的第二通道。在每一通道中,接收纤维彼此隔开并相对于所述激发纤维进行排列,使得能够择优收集来自皮肤真皮层的荧光信息而无需对真皮进行物理暴露。通过多个检测器或通过通道与单个检测器之间的切换来逐个检测由每一接收通道从皮肤收集而来的光。

[0123] 图 17 和 18 绘示允许进行信息多通道收集的激发和接收纤维的其它排列。图 17 显示一种圆形纤维排列,其中传输激发光的中心(实心圆)纤维由接收纤维的第一通道(空心圆)环绕,所述接收纤维的第一通道又进一步由接收纤维的第二通道(有阴影的圆)环绕。图 18 显示一种线性纤维排列,其中复数个激发纤维(实心圆)排列成一行。接收纤维的第一通道(空心圆)排列成与激发行平行(且稍有距离)的一排。接收纤维的第二通道(有阴影的圆)也排列成与激发行平行(且距离更远一些)的一排。

[0124] 图 19 至 22 显示多通道光纤组织探针相对于取样表面的可能排列的多种视图。图 19 是一垂直排列的多通道光纤组织探针一部分的截面图示意图,其中实心纤维可代表激发纤维,空心纤维代表第一接收通道,而有直线阴影的纤维代表第二接收通道。在这种排列中,可对激发纤维与第一和第二接收通道间的间距加以选择以适合可用于组织光学性质确定的经证明的期望信息。图 20 是一倾斜排列的多通道光纤组织探针一部分的截面图示意图。偏离激发纤维垂线的倾斜角度可以是 0 至 60 度。同样,第一和第二接收通道(分别为空心纤维和有阴影纤维)的倾斜可在激发纤维的相反方向上倾斜 0 至 80 度,且不必一定倾斜相等或相反的量。图 21 是一倾斜排列的多通道光纤组织探针一部分的截面图示意图。此处第一和第二接收通道分别置于中央激发纤维的任一侧。图 22 是一显示如何排列若干倾斜纤维以增加光通过量的等角透视图。

[0125] 图 23 是一在多种激发和接收器间距下探寻组织体积的多通道光纤组织探针的示

意图。在 4 个图示的每一个中,均有由指向组织体积(以黑色显示)的向下箭头表示的单个倾斜激发纤维。所述激发纤维的对面是 4 个接收纤维通道,每一个均与所述激发纤维分开一定距离。由左至右,图示显示出经探寻的组织区域随激发纤维和接收通道间距变化。这些分开的接收通道允许择优收集来自真皮的可用于组织光学性质测量的信息。

[0126] 熟习此项技术者会认识到,本发明可以多种不同于本文所述并涵盖的具体实施例的形式表现。因此,可在不偏离随附权利要求书中所述的本发明范畴和精神的情况下对本发明进行形式与细节上的改变。

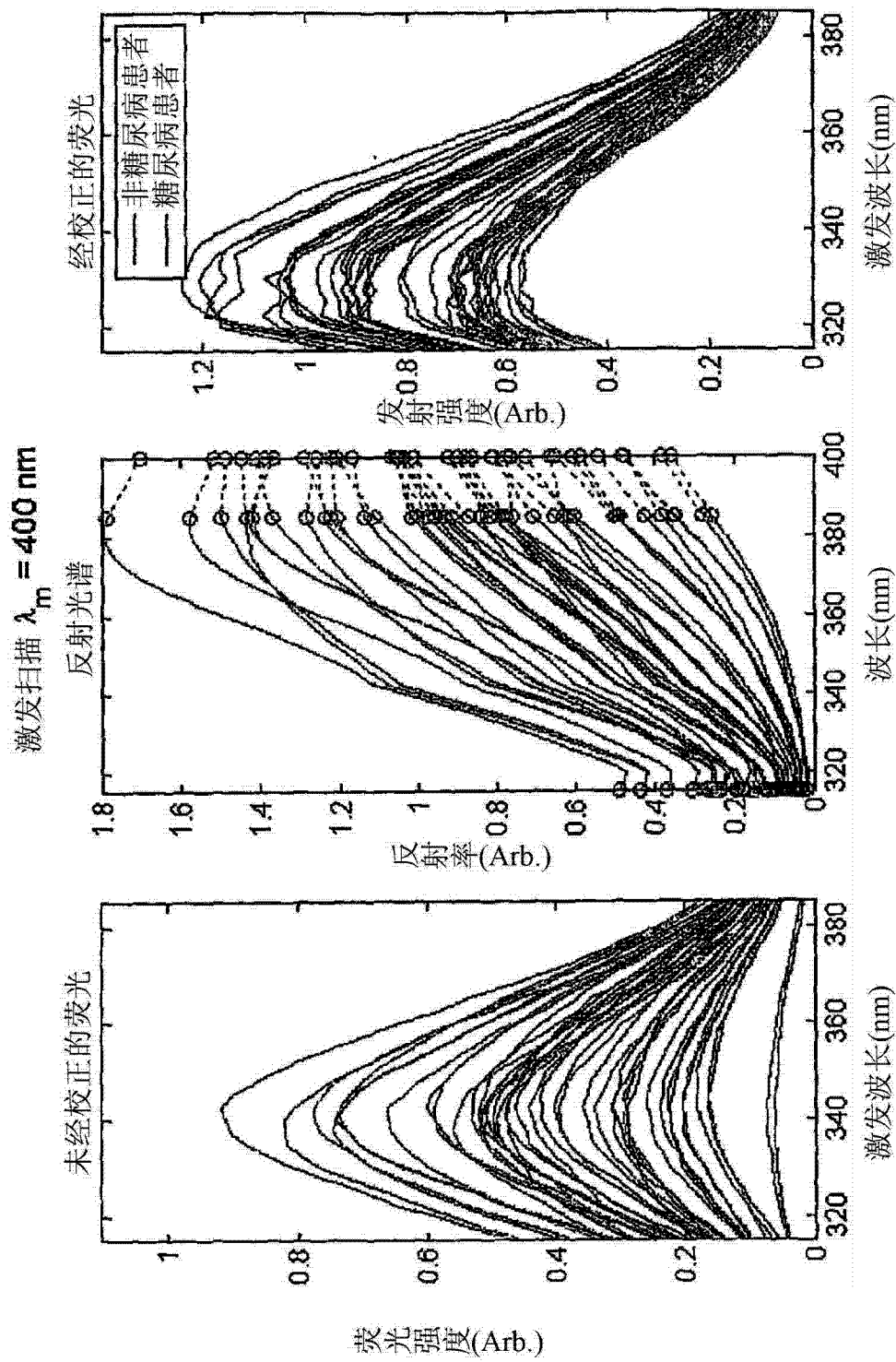


图 1

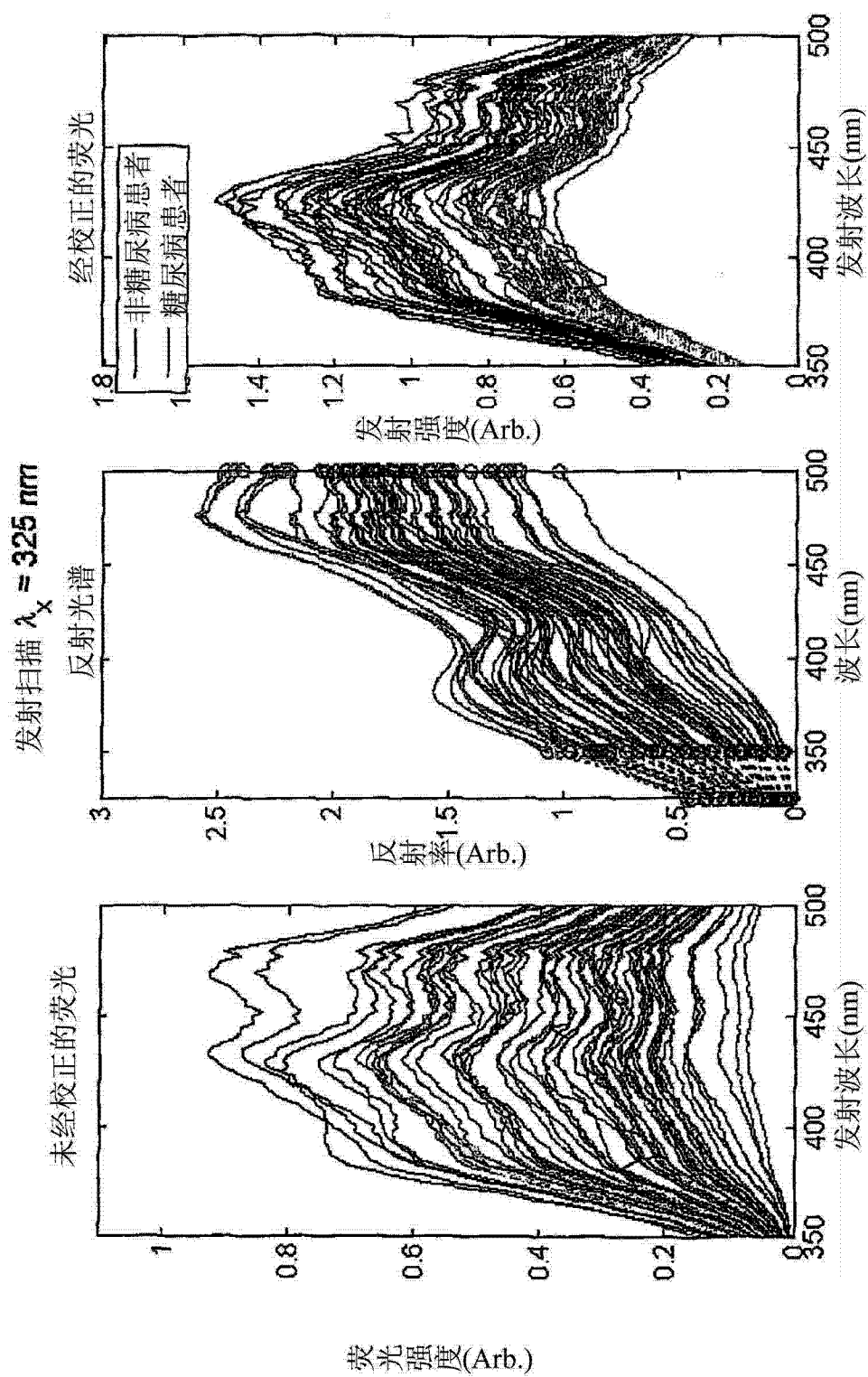


图 2

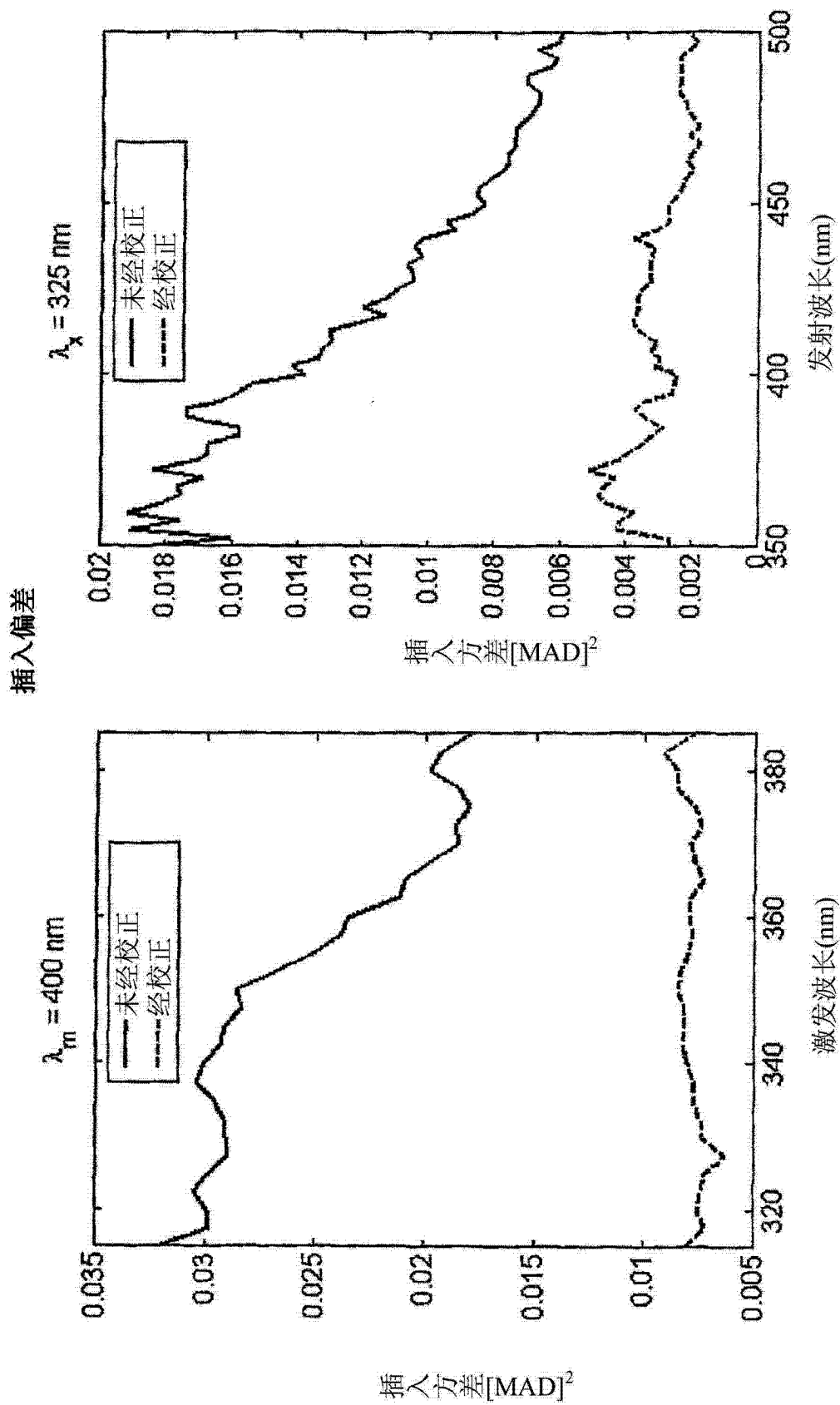


图 3

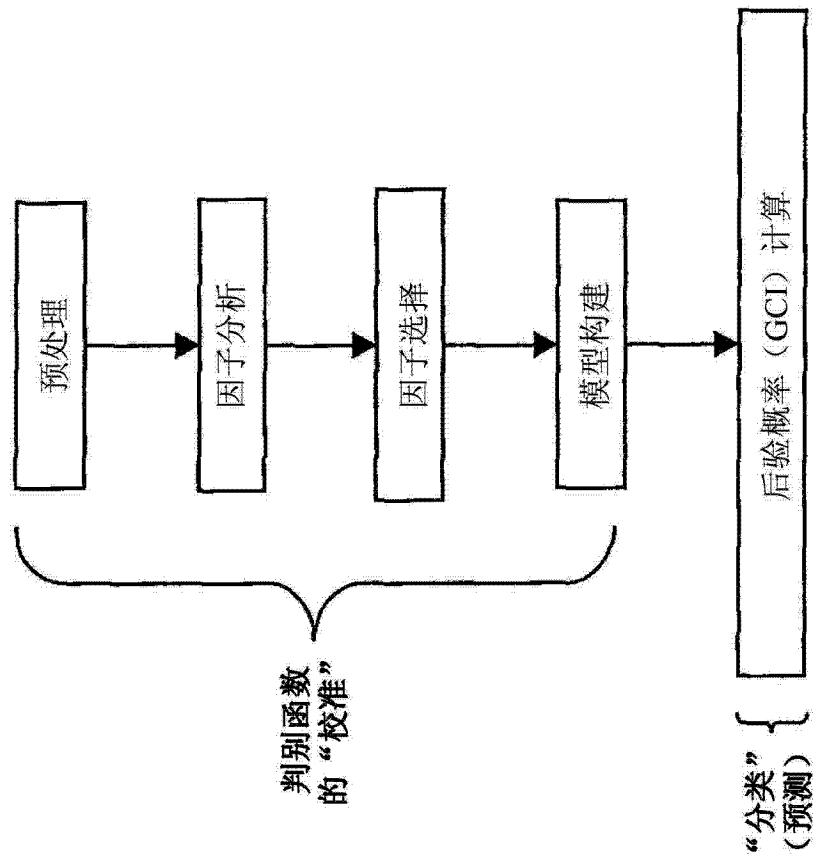


图 4

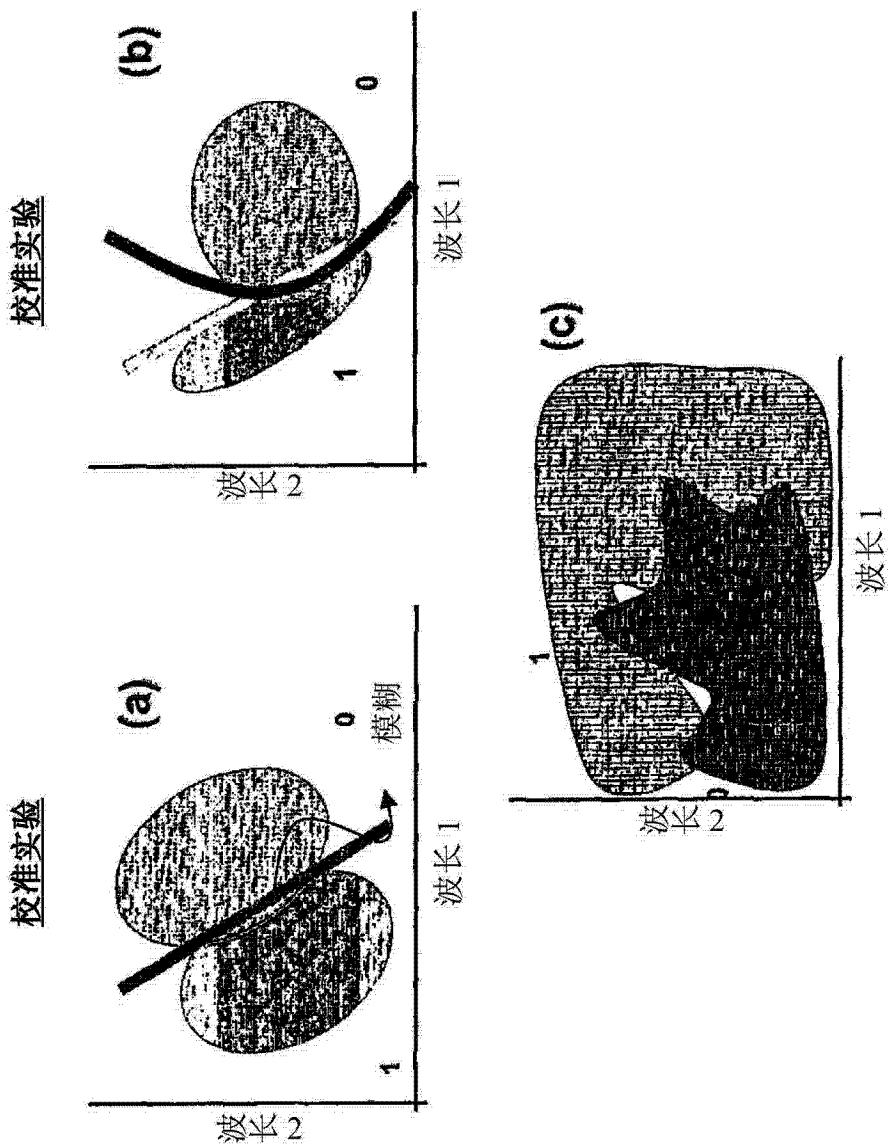


图 5

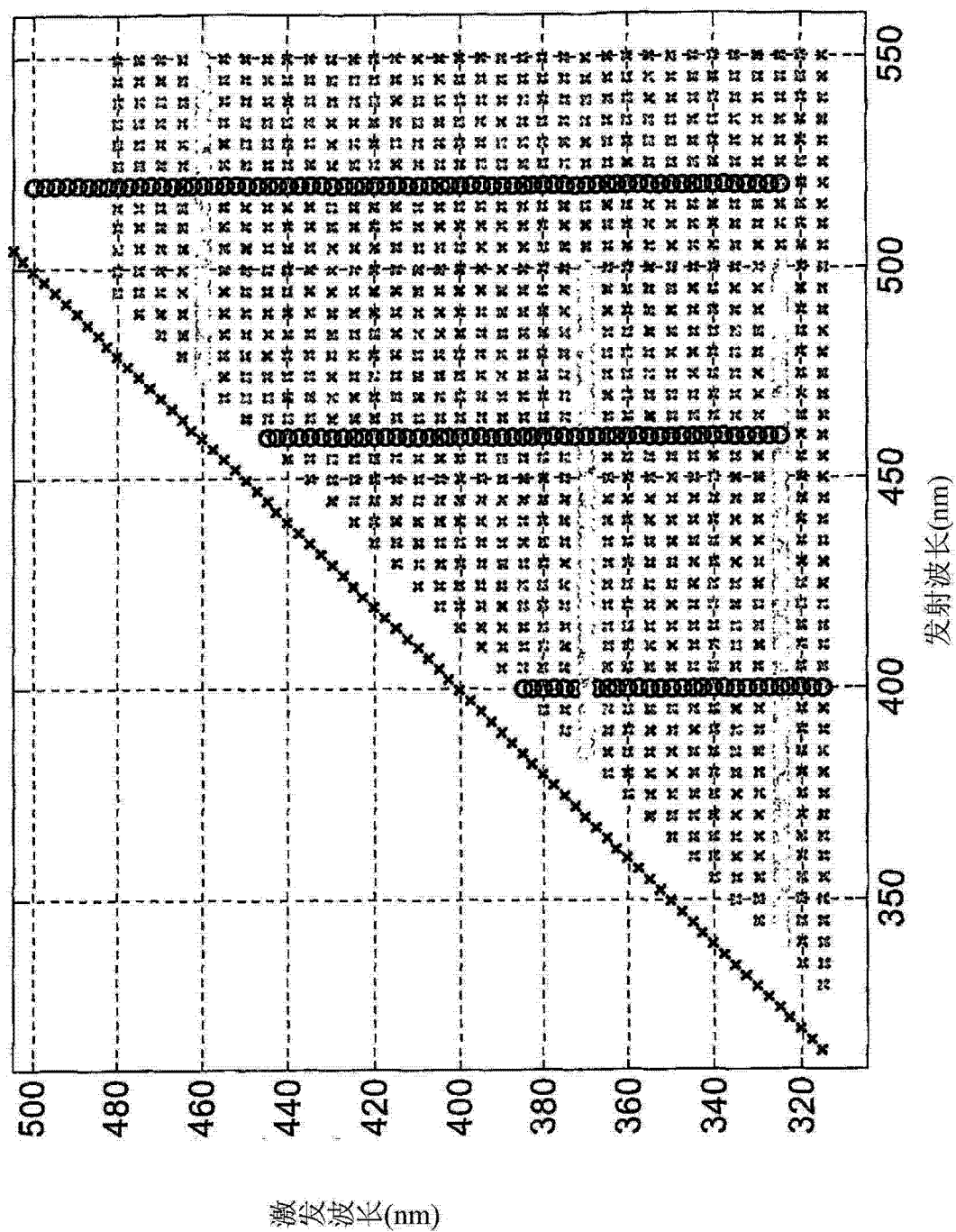


图 6

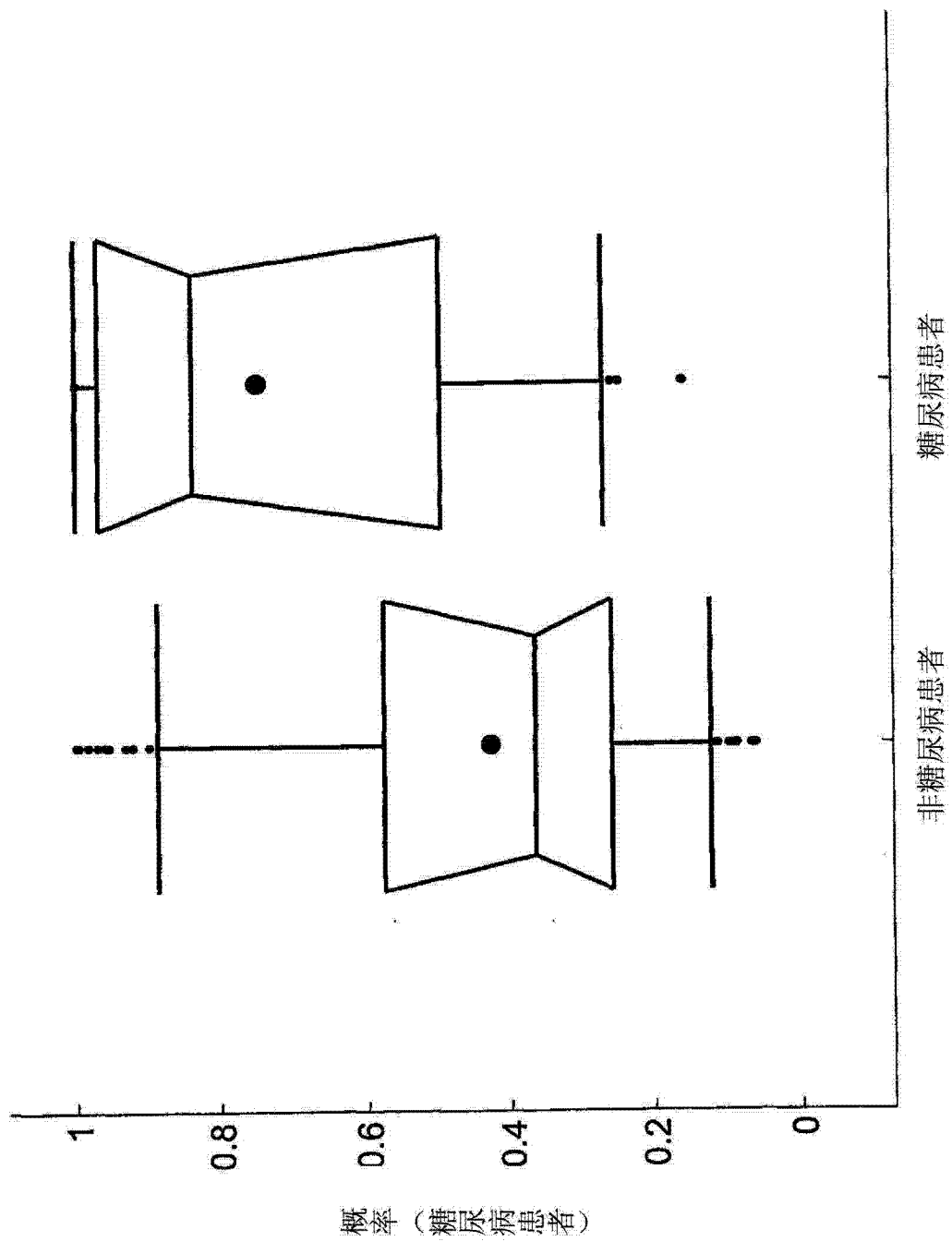


图 7

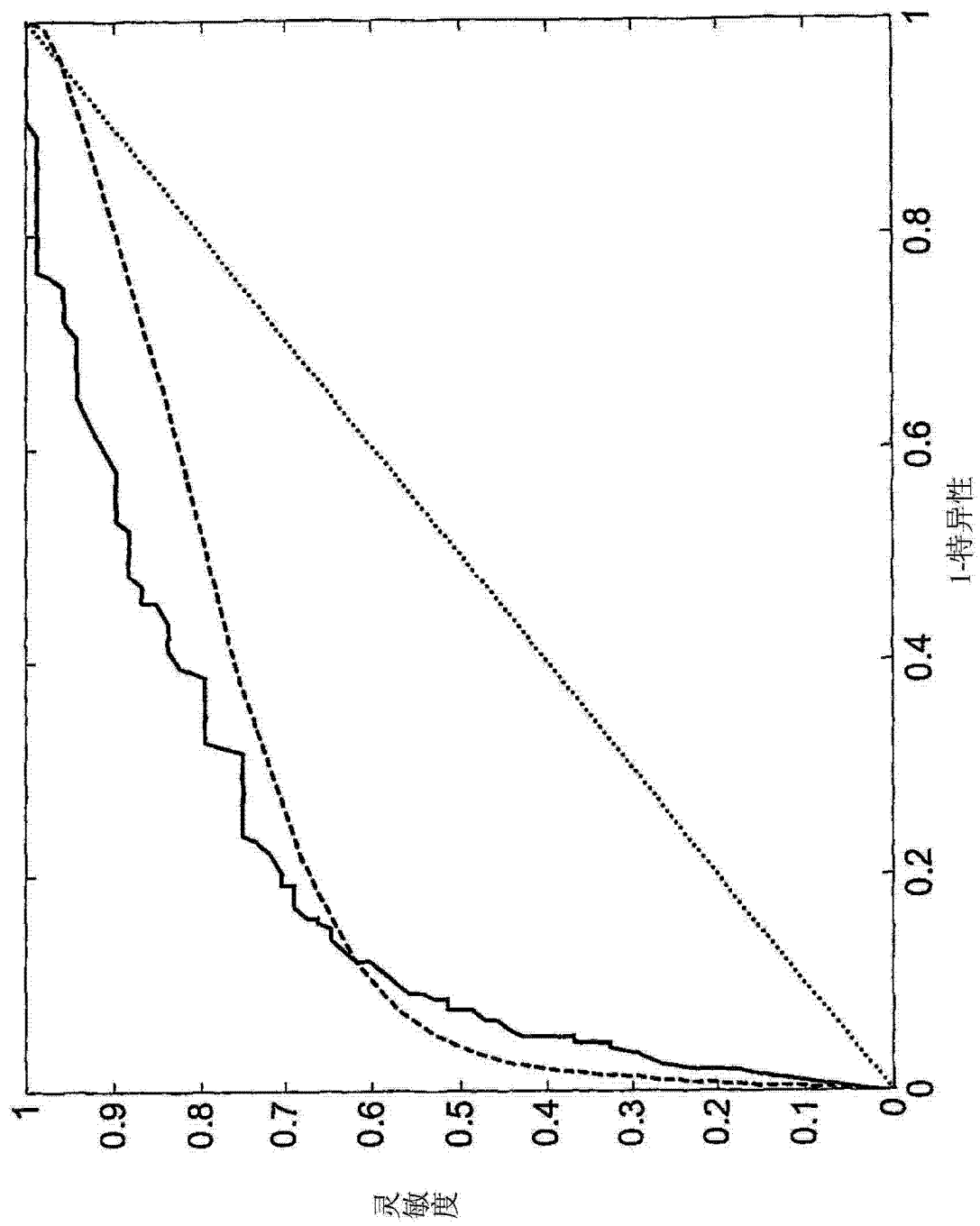


图 8

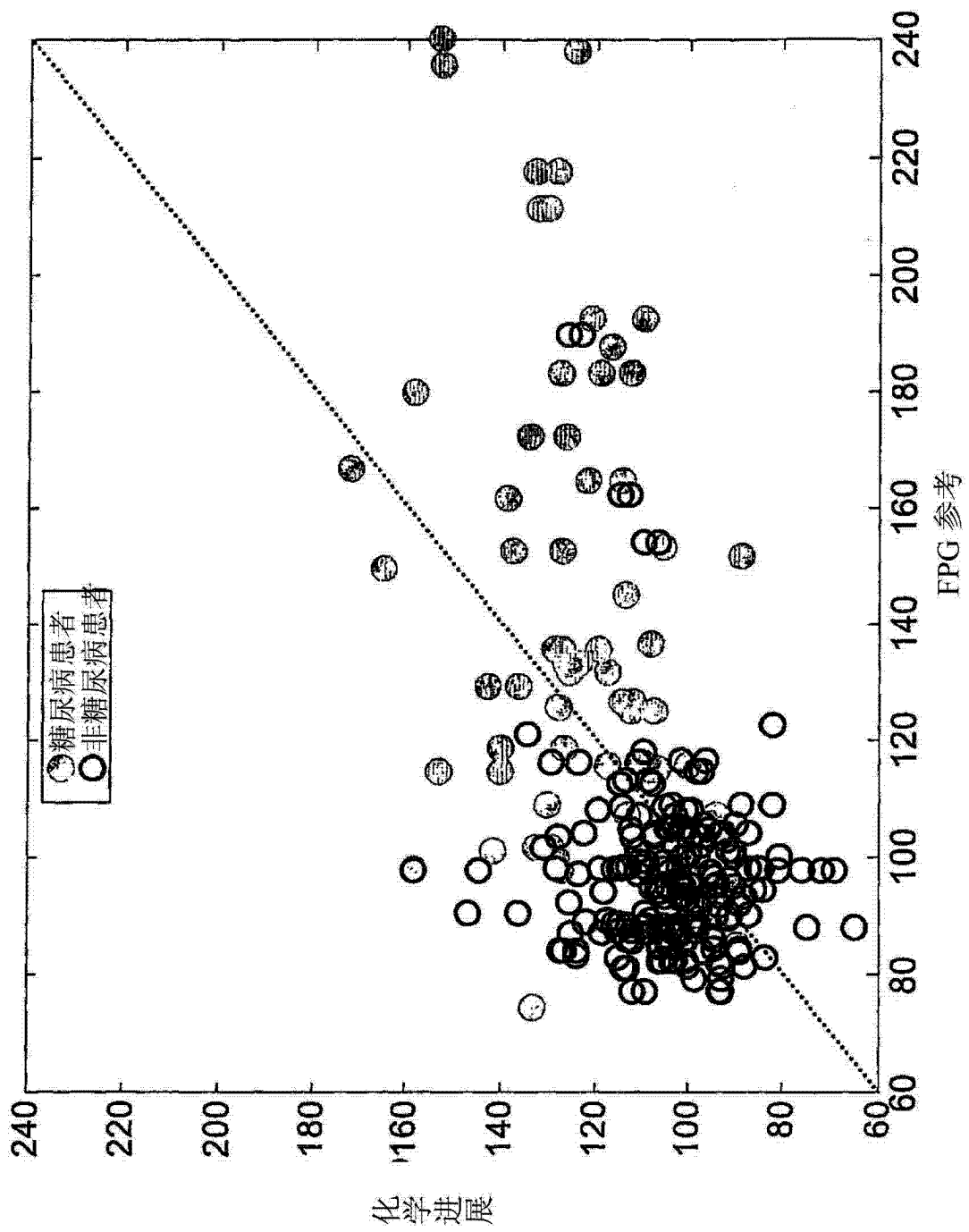


图 9

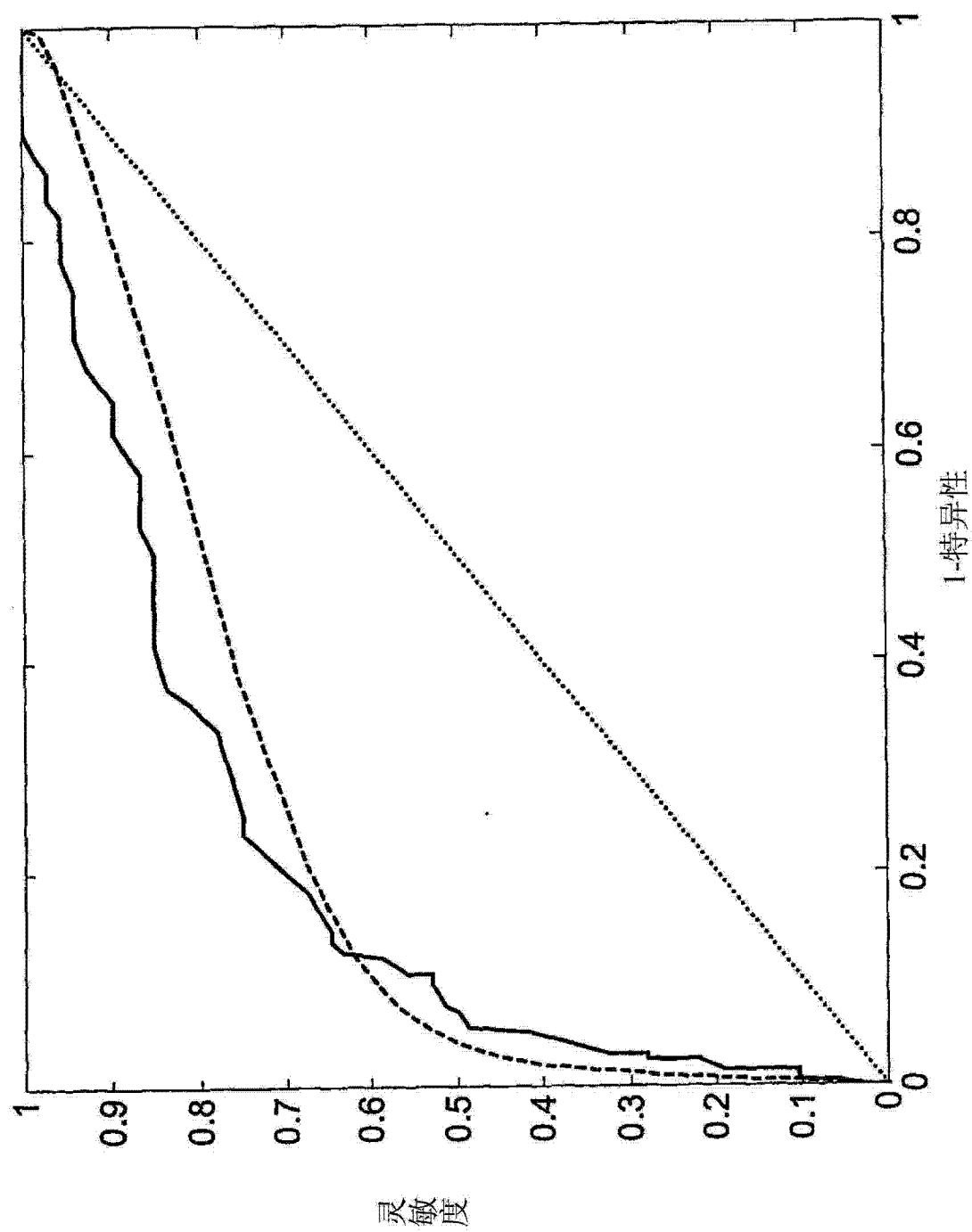


图 10

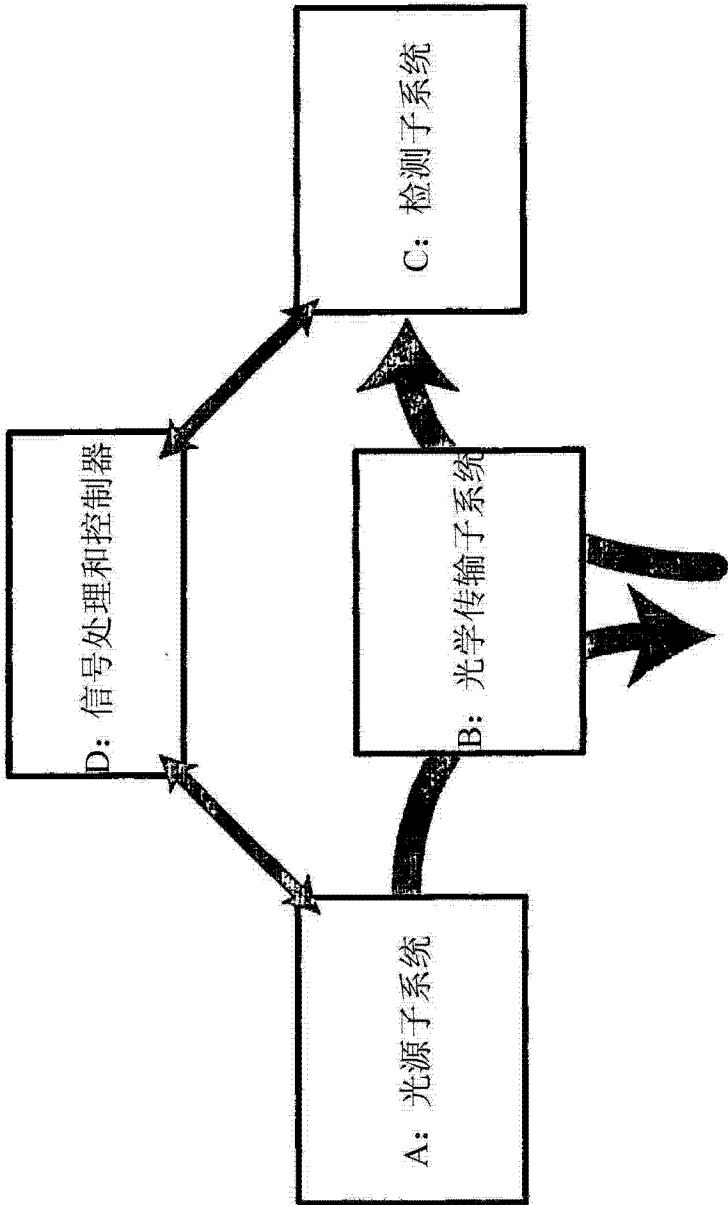


图 11

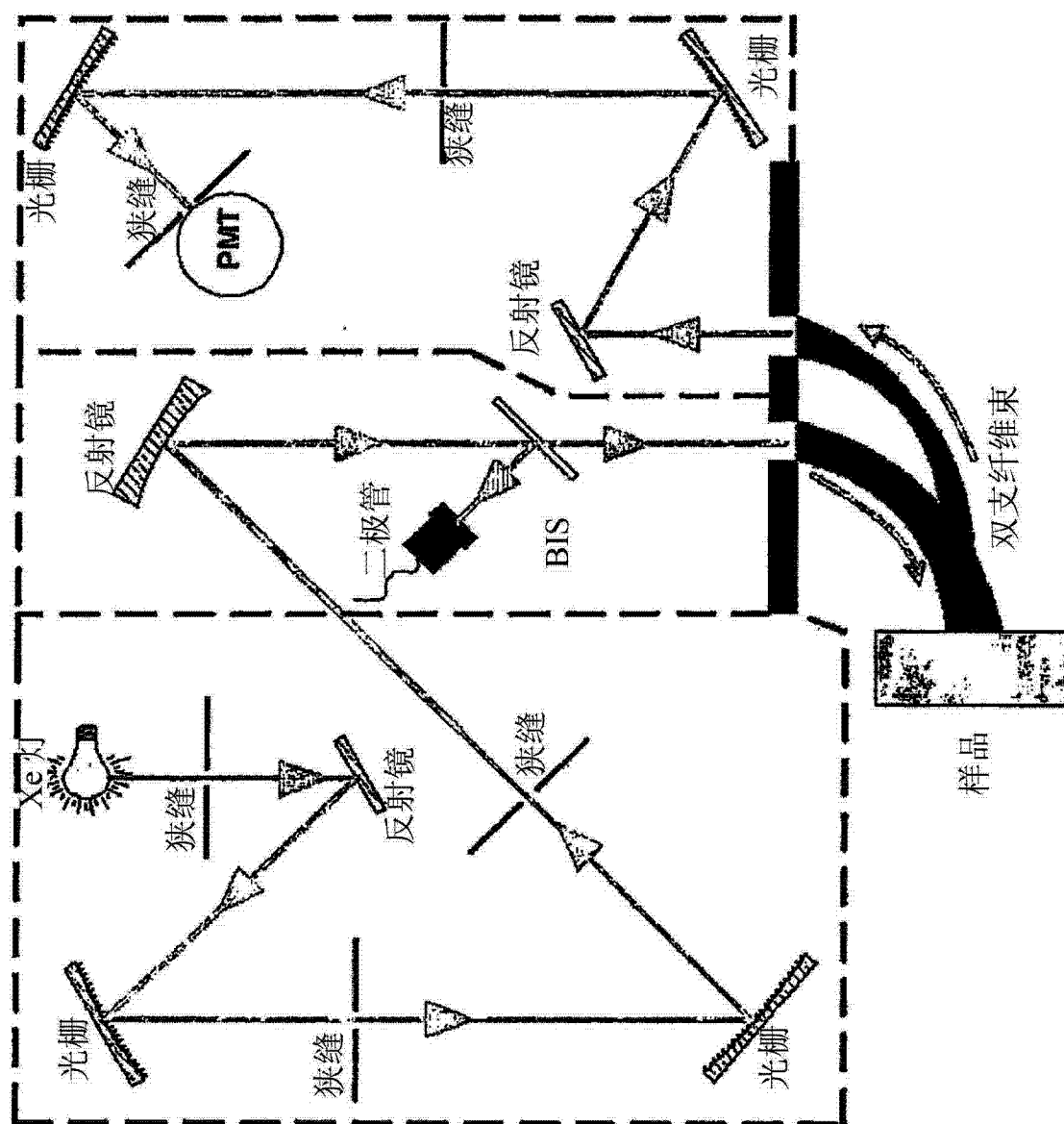


图 12

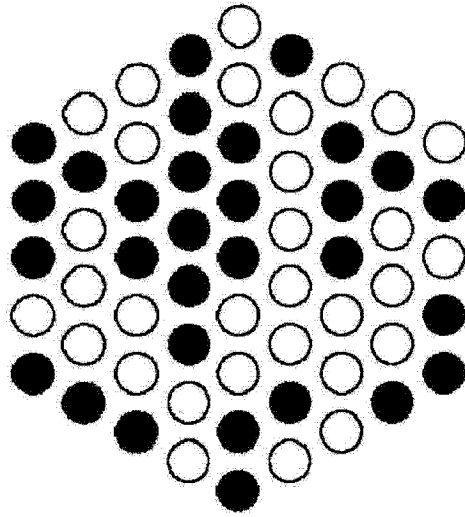


图 13

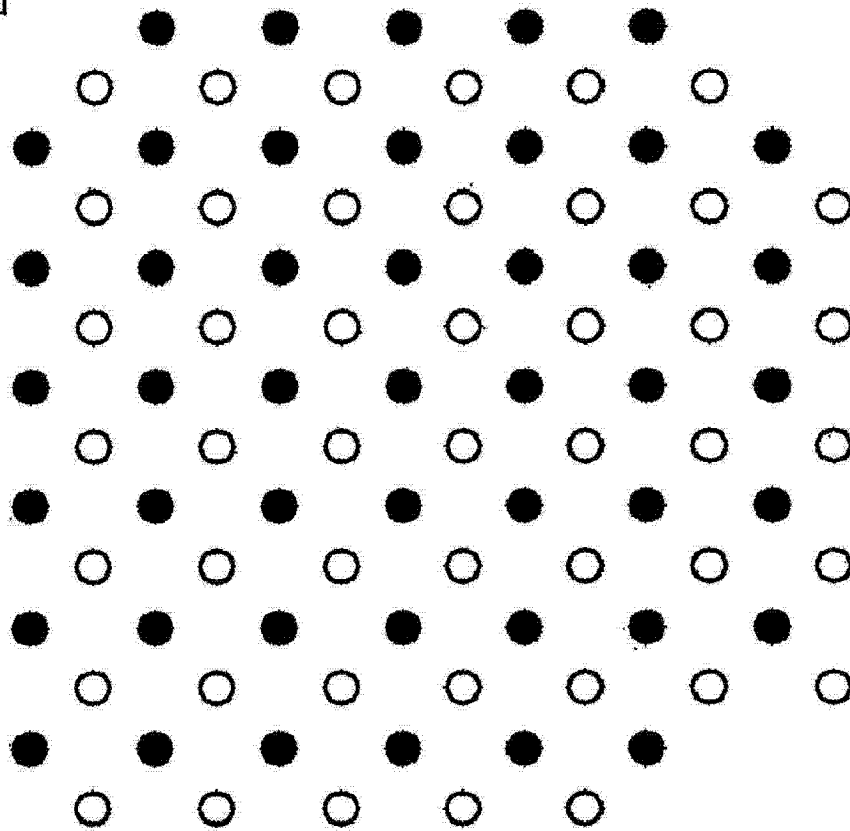


图 14

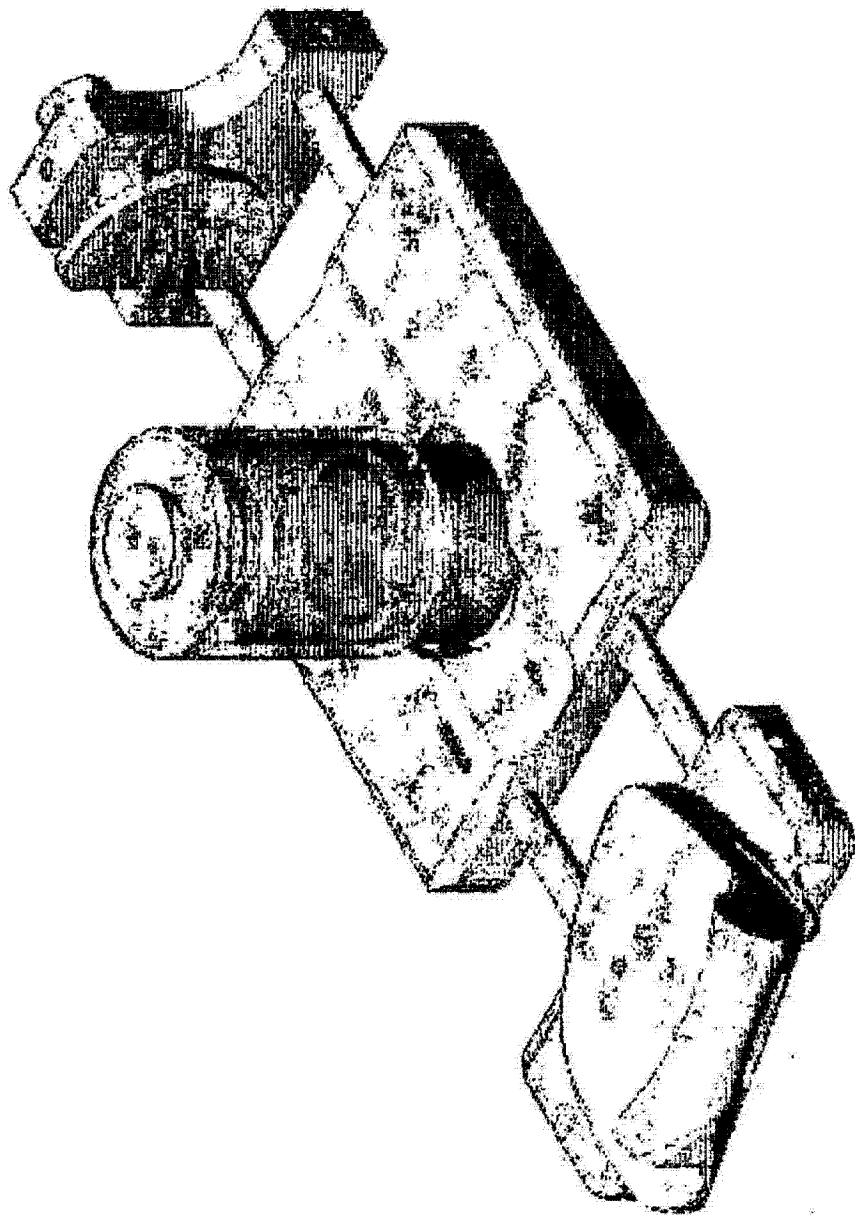


图 15

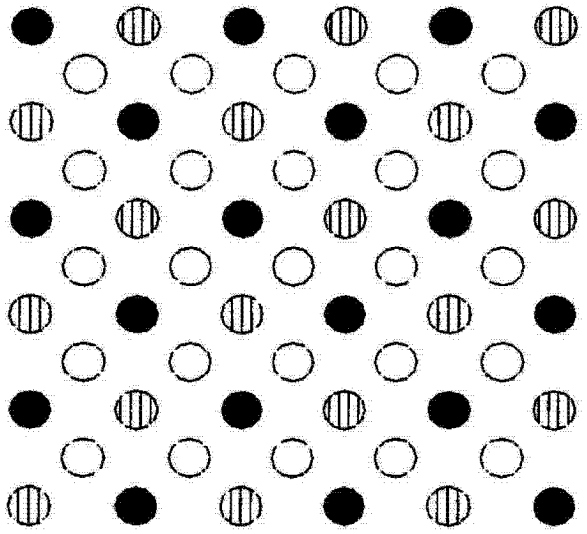


图 16

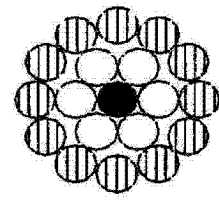


图 17

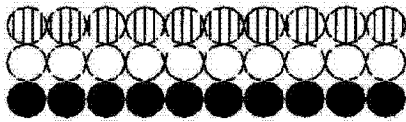


图 18

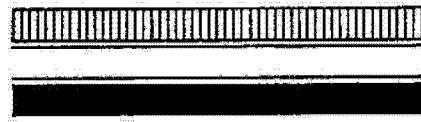


图 19

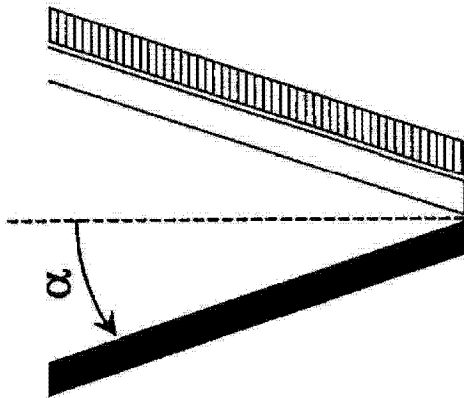


图 20

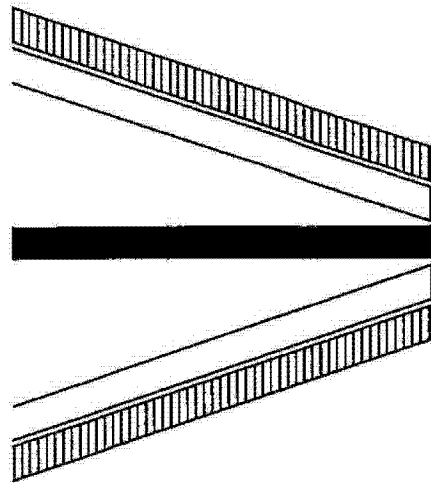


图 21

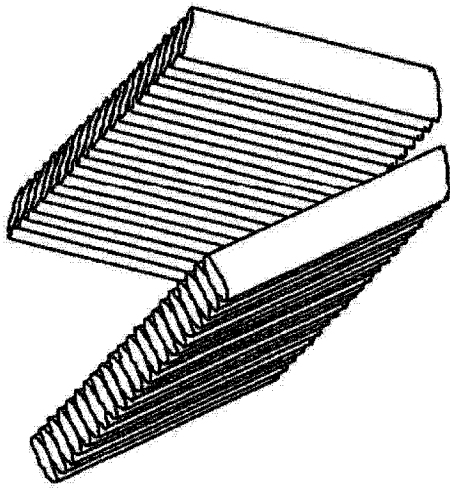


图 22

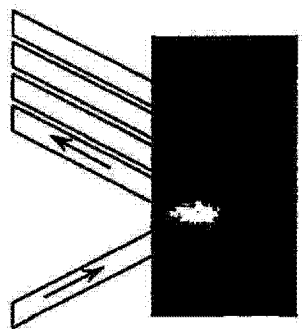
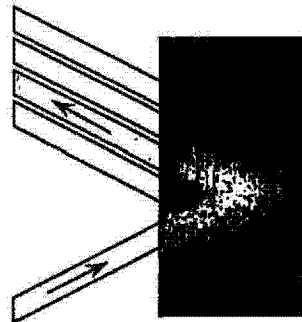
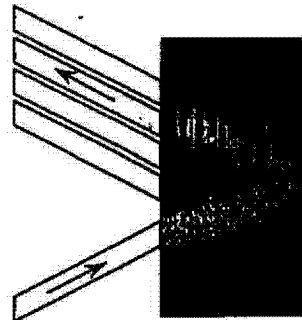
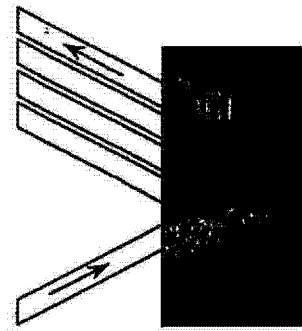


图 23