



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 37 163 T2** 2008.04.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 765 134 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61B 5/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 37 163.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/02644**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 908 539.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/028084**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.03.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.09.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.04.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.07.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.04.2008**

(30) Unionspriorität:
403446 **14.03.1995** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, FR, GB, IT, LI, NL

(73) Patentinhaber:
**The Board of Regents of the University of Texas
System, Austin, Tex., US**

(72) Erfinder:
**RICHARDS-KORTUM, Rebecca, Austin, TX 78739,
US; RAMANUJAM, Nirmala, Austin, TX 78705, US;
MAHADEVAN, Anita, Nashville, Tennessee 37203,
US; MITCHELL, Michelle Follen, Houston, TX
77019, US**

(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **DIAGNOSE VON ZERVIX-PRAEKANZERSEN MITTELS RAMAN- UND FLUORESZENZ-SPEK-TROSKOPIE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf optische Verfahren und Vorrichtungen, die bei der Diagnose von Vorkrebs-Erkrankungen des Gebärmutterhalses angewendet werden.

[0002] Gebärmutterhalskrebs ist der am zweithäufigsten auftretende bösartige Tumor bei Frauen weltweit, nur übertroffen vom Brustkrebs, und in den Vereinigten Staaten stellt er die am dritthäufigsten auftretende Geschwulst im weiblichen Genitaltrakt dar. 15.000 neue Fälle von invasivem Gebärmutterhalskrebs und 55.000 Fälle von lokalen Karzinomen (CIS) werden für 1994 in den U.S. gemeldet. Im Jahr 1994 waren geschätzt 4.600 Todesfälle in den Vereinigten Staaten allein an Gebärmutterhalskrebs zu beklagen. In den letzten Jahren jedoch ist das Auftreten von präinvasiven Plattenkarzinomen des Gebärmutterhalses dramatisch angestiegen, dies besonders bei jungen Frauen. Frauen unter 35 Jahren machen 24,5% der Patientinnen mit invasivem Gebärmutterhalskrebs aus, und die Häufigkeit steigt bei Frauen dieser Altersgruppe weiter an. Es wird geschätzt, dass die Sterblichkeit bei Gebärmutterhalskrebs in den nächsten zehn Jahren um 20% ansteigen wird, wenn nicht weitere Verbesserungen in der Erkennungstechnik vorgenommen werden.

[0003] Die Sterblichkeit, die auf Gebärmutterhalskrebs zurückzuführen ist, kann reduziert werden, wenn diese Krankheit in frühen Stadien der Entwicklung oder im Vorkrebsstadium (zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN)) entdeckt wird. In der breiten weiblichen Bevölkerung wird zum Untersuchen auf CIN und Gebärmutterhalskrebs ein Pap-Abstrich angewendet. Diese Technik weist eine falsch-negative Fehlerrate von 15–40% auf. Auf einen abnormalen Pap-Abstrich folgen eine kolposkopische Prüfung, eine Biopsie und eine histologische Bestätigung der klinischen Diagnose. Die Kolposkopie erfordert ein umfangreiches Training und ist in ihrer Genauigkeit bei der Diagnose selbst in den Händen von Fachleuten unterschiedlich und eingeschränkt. Ein Diagnoseverfahren, das die Durchführung der Kolposkopie in den Händen von weniger erfahrenen praktischen Ärzten verbessern, die Notwendigkeit der mehrfachen Biopsien ausschließen und eine effektivere Diagnose in breitem Umfang erlauben könnte, könnte potenziell die Sterblichkeit, die auf Gebärmutterhalskrebs zurückzuführen ist, verringern.

[0004] Vor kurzem sind für die Diagnose von Krebs und Vorkrebs-Erkrankungen die Fluoreszenz-, die Infrarot-Absorptions- und die Raman-Spektroskopien vorgeschlagen worden. Viele Gruppen haben ihre Anwendung in verschiedenen Organsystemen demonstriert. Die autoinduzierte und die farbstoffinduzierte Fluoreszenz sind viel versprechend in Bezug auf das Erkennen von Arteriosklerose und verschiedenen Arten von Krebs und Vorkrebs-Erkrankungen. Viele Gruppen haben gezeigt, dass die Autofluoreszenz für die Differenzierung von normalem und abnormalem Gewebe in der menschlichen Brust und Lunge, in den Bronchien und im Magen-Darm-Trakt angewendet werden kann. Fluoreszenzspektroskopische Verfahren sind ebenfalls für eine verbesserte Erkennung von Gebärmutterhals-Dysplasie untersucht worden.

[0005] WO 9215008 A legt Systeme und Verfahren zur spektroskopischen Diagnose und Behandlung offen, die molekulare Spektroskopie zum Diagnostizieren von Gewebezuständen einsetzen. Die Infrarot-Raman-Spektroskopie und die Infrarot-gedämpften Vollreflektions-Messungen werden unter Einsatz einer Laserstrahlungsquelle und eines Fourier-Transformations-Spektrometers durchgeführt. Daher sind Kenntnisse des biochemischen Aufbaus und des pathologischen Zustands erforderlich.

[0006] Ein automatisiertes Diagnoseverfahren mit einer verbesserten diagnostischen Leistungsfähigkeit könnte eine schnellere, effektivere Patientenführung ermöglichen und die Sterblichkeit potenziell weiter verringern.

Übersicht über die Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung legt dar, dass die Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie viel versprechende Methoden zur klinischen Diagnose von Vorkrebs-Erkrankungen des Gebärmutterhalses sind.

[0008] Es wurden In-vitro-Studien durchgeführt, um eine Strategie für den klinischen Einsatz der Diagnose in vivo festzulegen, und es wurde gezeigt, dass die Wellenlängen von 337 nm, 380 nm und 460 nm (+/- 10 nm) die Wellenlängen zur optimalen Anregung für die Identifizierung von Vorkrebs-Erkrankungen bilden.

[0009] Fluoreszenzspektren, die bei 337 nm von 92 Patientinnen in vivo gesammelt wurden, sind dazu verwendet worden, spektroskopische Verfahren zum Differenzieren von normalem und abnormalem Gewebe zu

entwickeln. Indem empirische Parameter wie etwa Spitzenintensitäten und der Flankenanstieg der Spektren angewendet wurden, sind normale und abnormale Gewebe mit einer Empfindlichkeit und einer Genauigkeit von 85% und 75% unterschieden worden. Unter Einsatz von multivariaten statistischen Methoden sind bei 337 nm Stimulus normale und Platten Intraepithelial-Läsionen (SILs – Läsionen mit Dysplasie und menschlichem Papilloma-Virus (HPV)) mit einer Empfindlichkeit von 91% und einer Genauigkeit von 82% unterschieden worden. Bei 380 nm Stimulus kann ein normales Zylinderepithel von einem Gewebe mit Entzündungen mit einer Empfindlichkeit von 77% und einer Genauigkeit von 72% unterschieden werden. Bei 460 nm Stimulus sind schwere SILs (gemäßigte bis schwerwiegende Dysplasie-Karzinome) und leichte SILs (schwache Dysplasie, HPV) mit einer Empfindlichkeit und einer Genauigkeit von 73% und 85% unterschieden worden. Die hier verwendeten Berechnungen der Sensitivität und der Genauigkeit sind detailliert in Anhang I. dargestellt.

[0010] Nach einer anschaulichen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst eine Vorrichtung zum Erfassen und Qualifizieren von Gewebe-Abnormalität in einer Gewebeprobe die Eigenschaften, die in Anspruch 1 definiert sind.

[0011] Nach einer anderen anschaulichen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst eine Vorrichtung zum Erfassen und Qualifizieren von Gewebe-Abnormalität in einer Gewebeprobe die Eigenschaften, die in Anspruch 6 definiert sind.

[0012] Nach einer weiteren anschaulichen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst ein Verfahren zum Identifizieren einer Gruppe orthogonaler Hauptkomponenten, um ein Scoring auf Basis einer Messung von Gewebe-Fluoreszenzintensitäten durchzuführen, die Eigenschaften, die in Anspruch 13 definiert sind.

[0013] Diese und andere Merkmale und Vorzüge der vorliegenden Erfindung werden für jene Kenner der Technik mit üblichem Wissen aus den beigefügten Zeichnungen und der folgenden detaillierten Beschreibung ersichtlich.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] [Fig. 1](#) zeigt ein Blockdiagramm einer beispielhaften Fluoreszenz-Spektroskopie-Diagnose-Vorrichtung nach der vorliegenden Erfindung.

[0015] [Fig. 2](#) zeigt ein Blockdiagramm einer beispielhaften Raman-Spektroskopie-Diagnose-Vorrichtung nach der vorliegenden Erfindung.

[0016] [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) zeigen Flussdiagramme von beispielhaften Fluoreszenz-Spektroskopie-Diagnose-Verfahren nach der vorliegenden Erfindung.

[0017] [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#), [Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#) zeigen Flussdiagramme von beispielhaften Raman-Spektroskopie-Diagnose-Verfahren nach der vorliegenden Erfindung.

[0018] [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) zeigen Graphen, die die Ausführung des Fluoreszenz-Spektroskopie-Diagnose-Verfahrens nach der vorliegenden Erfindung bei 337 nm Stimulus darstellen.

[0019] [Fig. 7A](#), [Fig. 7B](#) und [Fig. 8](#) zeigen Graphen, die die Ausführung des Fluoreszenz-Diagnose-Verfahrens nach der vorliegenden Erfindung bei 380 nm Stimulus darstellen.

[0020] [Fig. 9A](#), [Fig. 9B](#) und [Fig. 10](#) zeigen Graphen, die die Ausführung des Diagnose-Verfahrens mit Fluoreszenz-Spektren nach der vorliegenden Erfindung bei 460 nm Stimulus darstellen, um normales Plattenepithel-Gewebe von SIL abzugrenzen.

[0021] [Fig. 11A](#), [Fig. 11B](#) und [Fig. 12](#) zeigen Graphen, die die Ausführung des Diagnose-Verfahrens mit Fluoreszenz-Spektren nach der vorliegenden Erfindung bei 460 nm Stimulus darstellen, um leichte SILs von schweren SILs abzugrenzen.

[0022] [Fig. 13](#) zeigt einen Graph, der gemessene Rhodamin-Raman-Spektren mit hohen und niedrigen Rauschabständen darstellt.

[0023] [Fig. 14](#) zeigt einen Graph, der die Eliminierung der Fluoreszenz aus einem Raman-Spektrum unter Einsatz einer polynomischen Passung abbildet.

[0024] [Fig. 15](#) zeigt einen Graph, der Rhodamin-Raman-Spektren mit hohen und niedrigen Rauschabständen miteinander vergleicht.

[0025] [Fig. 16](#) zeigt einen Graph, der ein typisches Paar von Rhodamin-Raman-Spektren abbildet, die von einer Patientin mit Dysplasie stammt.

[0026] [Fig. 17](#) zeigt ein Histogramm des Raman-Bandes bei 1325 cm^{-1} , das die Veränderung von Patient zu Patient abbildet.

[0027] [Fig. 18A](#) und [Fig. 18B](#) zeigen Graphen, die die diagnostischen Fähigkeiten des Diagnoseverfahrens mittels Raman-Spektroskopie der vorliegenden Erfindung schildern.

[0028] [Fig. 19](#) zeigt einen weiteren Graphen, der die diagnostischen Fähigkeiten des Diagnoseverfahrens mittels Raman-Spektroskopie der vorliegenden Erfindung schildert.

[0029] [Fig. 20](#) und [Fig. 21](#) zeigen Graphen, die die diagnostischen Fähigkeiten des Diagnoseverfahrens mittels Raman-Spektroskopie der vorliegenden Erfindung schildern.

[0030] [Fig. 22](#) zeigt einen Graphen der hypothetischen Verteilung der Testwerte.

Detaillierte Beschreibung

I. Einführung

[0031] Um die Vorzüge der vorliegenden Erfindung anschaulich darzustellen, sind in vivo bei der Kolposkopie Fluoreszenz-Spektren von 20 Patientinnen gesammelt worden. Fluoreszenz-Spektren sind von drei bis vier kolposkopisch normalen und von drei bis vier kolposkopisch abnormalen Lokalisationen erfasst worden, wie sie vom Praktiker, der die fachbekannten Techniken einsetzt, identifiziert werden. Besonders im Gebärmutterhalsgewebe wird nicht-essigweißes Epithel als normal betrachtet, während essigweißes Epithel und das Vorkommen von Gefäßatypien (wie etwa Punktierung, Mosaikbildung und atypische Gefäße) als abnormal betrachtet werden. Eine normale und eine abnormale Lokalisation jener untersuchten Gewebe sind von jeder Patientin per Biopsie entnommen worden. Die Biopsieproben sind schockgefrostet und in flüssigem Stickstoff und in einer Ultra-Tiefkühltruhe bei -85°C gelagert worden, bis die Raman-Erfassungen vorgenommen wurden.

II. Diagnose-Vorrichtung

1. Fluoreszenz-Spektroskopie-Diagnose-Vorrichtung

[0032] Die Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem Spektroskopiesystem aufgezeichnet, das einen gepulsten, mit Stickstoff gepumpten Farbstofflaser, eine optische Glasfasersonde und einen optischen Mehrkanal-Analysator zur Kolposkopie umfasst. Die Charakteristiken des Lasers für die Studien waren: Wellenlängen von 337, 380 und 460 nm, übertragene Pulsenergie von $50\text{ }\mu\text{J}$, eine Pulsdauer von 5 ns und eine Wiederholrate von 30 Hz.

[0033] Die Sonde umfasst 2 Glasfasern zur Anregung, eine für jede Wellenlänge, und 5 Glasfasern zum Einsammeln. Rhodamin 6G (8 mg/ml) wurde im Standard verwendet, um die täglichen Veränderungen im Erfassungsdurchsatz zu kalibrieren. Die Spektren wurden mittels Background Subtraction bereinigt und auf die Spitzenintensität des Rhodamins normalisiert. Die Spektren wurden für die Wellenlängenzuverlässigkeit des Systems ebenso kalibriert.

[0034] [Fig. 1](#) zeigt ein beispielhaftes spektroskopisches System zum Sammeln und Analysieren der Fluoreszenzspektren aus Gebärmutterhalsgewebe nach der vorliegenden Erfindung, das einen gepulsten, mit Stickstoff gepumpten Farbstofflaser **100**, eine optische Glasfasersonde **101** und einen optischen Mehrkanal-Analysator **103**, der zum Aufzeichnen der Fluoreszenzspektren aus dem unversehrten Gebärmutterhals bei Kolposkopie eingesetzt wird. Die Sonde **101** umfasst eine zentrale Glasfaser **104** umgeben von einer ringförmigen Anordnung von sechs Glasfasern. Alle sieben Glasfasern besitzen die gleichen Merkmale (0,22 NA, 200 Mikron Kerndurchmesser). Zwei der äußeren Glasfasern **106** und **107** liefern Licht zur Anregung auf die Gewebeoberfläche; die Glasfaser **106** liefert Licht zur Anregung aus dem Stickstoff-Laser und die Glasfaser **107** liefert Licht aus dem Farbstoffmodul (die Überlappung der Beleuchtungsfläche, die von beiden optischen Glasfasern **106** und **107** bestrichen wird, beträgt mehr als 85%). Die Aufgabe der verbleibenden fünf Glasfasern

(**104** und **108–111**) ist es, die von der Gewebeoberfläche emittierte Fluoreszenz, die direkt von jeder der Glasfasern **106** und **107** belichtet wird, zu erfassen. Ein Quarzschild **112** ist an der Spitze der Sonde **101** angebracht, um für einen im Wesentlichen feststehenden Abstand zwischen den Glasfasern und der Gewebeoberfläche zu sorgen, so dass die Fluoreszenzstärke in kalibrierten Einheiten gemeldet werden kann.

[0035] Das Licht zur Anregung wurde bei 337 nm Stimulus auf das rumpfwärts gelegene Ende der Anregungsglasfaser **106** eingestellt, um einen Punkt mit 1 mm Durchmesser an der Außenseite des Schilds **112** zu erzeugen. Das Licht zur Anregung aus dem Farbstoffmodul **113**, das in die Anregungsglasfaser **107** eingekoppelt ist, wurde unter Einsatz geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe erzeugt; in diesem Beispiel wurde BBQ (1E-03M in 7 Teilen Toluol und 3 Teilen Äthanol) eingesetzt, um Licht bei 380 nm Stimulus zu erzeugen, und Kumarin **460** (1E-02 M in Äthanol) wurde eingesetzt, um Licht bei 460 nm Stimulus zu erzeugen. Die mittlere übertragene Pulsenergie bei 337, 380 und 460 nm Stimulus war jeweils 20, 12 und 25 mJ. Die Charakteristika des Lasers in dieser bevorzugten Ausführungsform sind: eine Pulsdauer von 5 ns und eine Wiederholrate von 30 Hz, jedoch sind auch andere Charakteristika annehmbar. Anregungsfluenzen sollten niedrig genug bleiben, so dass das Gebärmutterhalsgewebe nicht bedampft wird und eine signifikante Fotobleich-Reaktion nicht eintritt. In arteriellem Gewebe setzt eine signifikante Fotobleich-Reaktion zum Beispiel bei Anregungsfluenzen von über 80 mJ/mm ein.

[0036] Die rumpfwärts gelegenen Enden der Glasfasern zur Erfassung **104**, **108–111** sind in einer ringförmigen Anordnung ausgerichtet und auf den Eingangsspalt eines Polychromators **114** (Jarrell Ash, Monospec 18) abgebildet, der mit einem intensivierten 1024-Diodenarray **166** verbunden ist, das von einem Mehrkanal-Analysator **117** (Princeton instruments, OMA) gesteuert wird. Es wurden 370, 400 und 470 nm lange Passfilter eingesetzt, um jeweils das gestreute Licht zur Anregung bei 337, 380 und 460 nm Stimulus zu blockieren. Ein **205** ns großes Erfassungs-Gate, das mit der Vorderflanke des Laserpulses unter Einsatz eines Impulsgebers **118** (Princeton Instruments, PG200) synchronisiert ist, beseitigt wirksam die Effekte der Lichtintensität des weißen Lichts aus dem Kolposkop während der Fluoreszenz. Die Datenübernahme und die Datenanalyse wurden durch den Computer **119** entsprechend dem Fluoreszenz-Diagnoseverfahren gesteuert, das weiter unten mit mehr Details mit Bezug auf die Flussdiagramme aus den [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) beschrieben wird.

2. Raman-Spektroskopie-Diagnose-Vorrichtung

[0037] [Fig. 2](#) zeigt eine beispielhafte Vorrichtung zum Sammeln von IR-nahen Raman-Spektren nach der vorliegenden Erfindung. IR-nahe Erfassungen wurden in vitro unter Einsatz des Systems, das in [Fig. 2](#) abgebildet ist, durchgeführt, das System aus [Fig. 2](#) könnte jedoch leicht für den Einsatz in vivo angepasst werden, indem zum Beispiel die Leistung des Lasers gesteigert wird und eine Sondenstruktur zum Einsatz kommt, die ähnlich jener Struktur der Sonde **101** ist, die in [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) gezeigt ist. Ein 40 mW GaAlAs-Diodenlaser **200** (Diolite **800**, LiCONix, CA) regt die Proben nahe 789 nm durch eine 200 Mikron starke Glasfaser **201** an. Die Biopsien, deren Maße ungefähr $2 \times 1 \times 1$ mm sind, werden feucht in eine Quarzküvette **202** gelegt, wobei das Epithel in Richtung der Vorderseite der Küvette **202** und des Strahls zeigt. Der Anregungsstrahl fällt in einem Winkel von annähernd 75 Grad ein, um eine spiegelnde Reflektierung zu vermeiden, und ist auf eine Punktgröße von 200 μm auf der Gewebeoberfläche ausgerichtet. Ein Bandpassfilter (BP-Filter) **203** mit einer Durchlässigkeit von 85% bei 789 nm wird zur Reinigung der Ausgabe des Lasers **200** eingesetzt. Die Leistung des Lasers auf der Probe wird bei annähernd 25 mW beibehalten. Das gestreute Raman-Signal wird in einem Winkel von 90° zum Anregungsstrahl erfasst und auf den Eingangsspalt des Erkennungssystems **204** abgebildet, andere Winkel wären jedoch ebenso akzeptabel. Ein Filter mit holografischer Einkerbung (HN) **206** (HSNF 789, Kaiger Optical Systems, MI) mit einer optischen Dichte > 6 bei 789 nm wird zum Abschwächen der elastischen Streuung eingesetzt. Das Erfassungssystem **204** umfasst einen Aufnahmespektrographen **207** (500IS, Chromex Inc. NM) und eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte CCD-Kamera **208** mit einem angeschlossenen Kamera-Controller **209** (IN-1152E, Princeton Instruments, NJ). Der Spektrograph **207** wurde mit einem Gitternetz von 300 Gitter/mm, das bei 500 nm aufflammt, eingesetzt, er erbringt eine spektrale Auflösung von 10 cm^{-1} bei einem Eingangsgalt von 100 μm .

[0038] Das Erkennungssystem **204** wird durch den Computer **211** gesteuert, der entsprechend dem Raman-Spektroskopie-Diagnose-Verfahren programmiert ist, das weiter unten im Detail mit Bezug auf die Flussdiagramme aus den [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#), [Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#) beschrieben wird.

[0039] Die Raman-Spektren sind in einem Bereich von 500–2000 cm^{-1} bezüglich der Anregungsfrequenz erfasst worden, und jedes Probenspektrum war über 15 Minuten eingegliedert, jedoch würden auch kürzere Eingliederungszeiten in Verbindung mit einer höheren Laserstärke tragbar sein. Jedes natürliche subtrahierte Spektrum wurde um eine Wellenlängen-abhängige Reaktion des Spektrographen **207**, der Kamera **208**, des

Gitters und der Filter **203** und **206** korrigiert. Das System wurde für die täglichen Veränderungen im Erfassungsdurchsatz unter Verwendung von Naphthalin, Rhodamin 6G und Tetrachlorkohlenstoff kalibriert. Die Raman-Verschiebung wurde bei $\pm 7 \text{ cm}^{-1}$ als geeignet und die Stärke innerhalb von 12% des Durchschnitts als konstant befunden.

[0040] Die Systeme in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) sind beispielhafte bevorzugte Ausführungsformen und sollten nicht als die Erfindung – wie in den Ansprüchen formuliert – einschränkend betrachtet werden. Es versteht sich, dass andere Vorrichtungen als die in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) abgebildeten eingesetzt werden können, ohne den Anwendungsbereich der Erfindung zu verlassen.

III. Diagnose-Verfahren

1. Entwicklung der Diagnose-Verfahren

A. Entwicklung des Zwei-Stufen-Verfahrens bei 337 nm Stimulus

[0041] Die Parameter für die Stufe 1 des Zwei-Stufen-Verfahrens sind: die relative Spitzenintensität (Spitzenintensität einer jeden Probe dividiert durch die durchschnittliche Spitzenintensität der entsprechenden normalen Proben (von Plattenepithel) der gleichen Patientin) und der lineare Näherungswert der Steigung des Spektrums von 420–440 nm sind aus dem Fluoreszenzspektrum einer jeden Probe im Kalibrier-Satz berechnet worden. Die relative Spitzenintensität weist die Abweichungen der normalen Gewebe-Fluoreszenzintensität zwischen Patientinnen aus. Ein Streudiagramm dieser beiden diagnostischen Parameter wurde für alle Proben des Kalibrier-Satzes gezeichnet. Eine lineare Entscheidungsgerade wurde zum Minimieren der fehlerhaften Klassifizierung entworfen (nicht krank versus erkrankt). In ähnlicher Weise sind auch die Parameter der zweiten Stufe ausgebildet: die Steigung des Spektrums von 440–460 nm einer jeden befallenen Probe und die durchschnittliche Steigung von 420–440 nm der Spektren der entsprechenden normalen Proben (von Plattenepithel) sind aus dem Kalibrier-Satz berechnet worden. Ein zweidimensionales Streudiagramm der beiden diagnostischen Parameter wurde für alle befallenen Proben gezeichnet. Wiederum wurde eine lineare Entscheidungsgerade zum Minimieren der fehlerhaften Klassifizierung entworfen (leichte SIL versus schwere SIL). Das optimierte Verfahren wurde auf den Spektren einer jeden Probe im Prognose-Satz zur Anwendung gebracht. Die optimalen Entscheidungsgeraden, die aus den Daten im Kalibrier-Satz entwickelt wurden, sind mit den in der anfänglichen klinischen Studie für beide Stufen des Verfahrens entwickelten verglichen worden. Das Verfahren der Diagnose in zwei Stufen ist im Detail in US-A-5 421 339 offen gelegt worden (veröffentlicht nach dem Prioritätsdatum der vorliegenden Patentanmeldung).

B. Entwicklung des multivariaten statistischen Verfahrens

[0042] Die fünf grundlegenden Schritte, die mit dem multivariaten statistischen Verfahren einhergehen, sind

- 1) die Vorverarbeitung der spektralen Daten einer jeden Patientin, um eine Abweichung von Patientin zu Patientin zu erklären,
- 2) das Aufteilen der vorverarbeiteten spektralen Daten von allen Patientinnen in die Kalibrier- und in die Prognose-Sätze,
- 3) die Größenreduktion der vorverarbeiteten Spektren im Kalibrier-Satz unter Anwendung der Hauptkomponenten-Analyse,
- 4) die Auswahl der diagnostisch nützlichsten Hauptkomponenten unter Anwendung eines zweiseitigen unpaarigen t-Tests und
- 5) die Entwicklung eines optimalen Klassifizierungsmodells, das auf dem Bayes-Theorem basiert, unter Anwendung der Menge der diagnostisch nützlichen Hauptkomponenten im Kalibrier-Satz als Eingangsgröße.

[0043] Diese fünf einzelnen Schritte des multivariaten statistischen Verfahrens werden weiter unten detaillierter dargestellt.

1) Vorverarbeitung: Das Ziel der Vorverarbeitung ist es, die Gewebespektren wegen der Abweichung von Patient zu Patient kalibrieren, die die Unterschiede in den Spektren verschiedener Gewebearten unklarer werden lassen könnten. Vier Verfahren der Vorverarbeitung wurden auf die spektralen Daten angewandt: 1) die Normalisierung, 2) die Durchschnittskalierung, 3) eine Kombination aus Normalisierung und Durchschnittskalierung und 4) die Halbwertskaalierung.

[0044] Die Spektren wurden normalisiert, indem die Fluoreszenzstärke bei jeder Ausgabe-Wellenlänge durch die maximale Fluoreszenzintensität dieser Probe dividiert wurde. Das Normalisieren eines Fluoreszenzspektrums entfernt die Daten der absoluten Intensität; Verfahren, die aus normalisierten Fluoreszenzspektren abge-

leitet werden, setzen für die Diagnose auf die Unterschiede in den Daten der Form der Spektrallinien. Wenn die Verteilung der Daten über die absolute Intensität nicht signifikant ist, werden mit dem Einsatz von normalisierten Spektren zwei Vorzüge realisiert: 1) Es ist nicht mehr notwendig, wegen der Abweichung von Patient zu Patient in der Fluoreszenzintensität des normalen Gewebes wie im Zwei-Stufen-Verfahren zu kalibrieren, und 2) eine Identifizierung der kolposkopisch normalen Referenzlokalisierung in jeder Patientin vor einer spektroskopischen Analyse ist nicht mehr notwendig.

[0045] Die Durchschnittskalierung wurde durchgeführt, indem das durchschnittliche Spektrum für eine Patientin (unter Einsatz aller Spektren, die von Gebärmutterhalslokalisationen bei dieser Patientin abgenommen wurden) berechnet und dieses von jedem Spektrum bei dieser Patientin zu subtrahiert wurde. Eine Durchschnittskalierung kann sowohl mit nicht-normalisierten (originalen) als auch mit normalisierten Spektren durchgeführt werden. Vor einer spektroskopischen Analyse benötigt die Durchschnittskalierung keine Kolposkopie zum Identifizieren einer normalen Referenzlokalisierung bei jeder Patientin. Jedoch zeigt die Durchschnittskalierung die Unterschiede im Fluoreszenzspektrum einer bestimmten Lokalisation anders als die Normalisierung entsprechend dem durchschnittlichen Spektrum von dieser Patientin an. Daher kann dieses Verfahren die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren zwischen den Gewebeklassen höchst effektiv verbessern, wenn Spektren in einer annähernd gleichen Anzahl von nicht befallenen und befallenen Lokalisationen von jeder Patientin erhalten werden.

[0046] Die Halbwertsskalierung wurde durchgeführt, indem das mittlere Spektrum für eine Patientin (unter Einsatz aller Spektren, die von Gebärmutterhalslokalisationen bei dieser Patientin abgenommen wurden) berechnet und dieses von jedem Spektrum bei dieser Patientin zu subtrahiert wurde. Eine Halbwertsskalierung kann wie die Durchschnittskalierung sowohl mit nicht-normalisierten (originalen) als auch mit normalisierten Spektren durchgeführt werden, und die Halbwertsskalierung benötigt vor einer spektroskopischen Analyse keine Kolposkopie zum Identifizieren einer normalen Referenzlokalisierung bei jeder Patientin. Jedoch benötigt die Halbwertsskalierung anders als die Durchschnittskalierung nicht die Erfassung von Spektren in der gleichen Anzahl von nicht befallenen und befallenen Lokalisationen von jeder Patientin.

2) Kalibrier- und Prognose-Datensätze: Die vorverarbeiteten spektralen Daten werden zufällig entweder einem Kalibrier- oder einem Prognose-Satz zugeordnet. Das multivariate statistische Verfahren wurde unter Anwendung des Kalibrier-Satzes entwickelt und optimiert. Danach wurde es vorausschauend auf den Prognose-Satz getestet.

3) Hauptkomponenten-Analyse: Die Hauptkomponenten-Analyse (Primary Components Analysis, PCA) ist ein lineares Modell, das die originalen Variablen eines Fluoreszenz-Emissionsspektrums in einen kleineren Satz von linearen Kombinationen der originalen Variablen, die Hauptkomponenten, die den größten Anteil an der Varianz des originalen Datenbestandes ausweisen, genannt werden, umformt. Die Hauptkomponenten-Analyse ist in Dillon W.R., Goldstein M., Multivariate Analysis: Methods and Applications, John Wiley and Sons, 1984, Seiten 23–52 beschrieben worden. Während die PCA keinen direkten Einblick in die morphologische und biochemische Basis der Gewebespektren geben kann, liefert sie einen neuen Ansatz zur Verdichtung aller spektralen Daten zu einigen wenigen handhabbaren Komponenten mit einem minimalen Informationsverlust.

[0047] Darüber hinaus kann jede Hauptkomponente leicht mit dem originalen Emissionsspektrum in Beziehung gebracht werden, wodurch ein Einblick in diagnostisch nützliche Emissionsvariable gegeben wird.

[0048] Vor der PCA wird eine Datenmatrix erzeugt, in der jede Zeile der Matrix das vorverarbeitete Fluoreszenzspektrum einer Probe enthält und jede Spalte die vorverarbeitete Fluoreszenzintensität für jede Emissionswellenlänge enthält. Die Datenmatrix D ($r \times c$), die aus r Zeilen (entsprechend r Gesamtproben von allen Patientinnen im Training-Set) und c Spalten (entsprechend der Intensität bei c Emissionswellenlängen) besteht, kann wie folgt beschrieben werden:

$$D = \begin{pmatrix} D_{11} & D_{12} & \dots & D_{1c} \\ D_{21} & D_{22} & \dots & D_{2c} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ D_{r1} & D_{r2} & \dots & D_{rc} \end{pmatrix} \quad (1)$$

[0049] Der erste Schritt in der PCA ist das Berechnen der Kovarianzmatrix Z . Zuerst wird eine Durchschnittskalierung bei jeder Spalte der vorverarbeiteten Datenmatrix D durchgeführt. Die Matrix D_m der durchschnittskalierten vorverarbeiteten Daten wird dann mit ihrer Transponierten multipliziert und jedes Element der resul-

tierenden quadratischen Matrix wird durch $(r - 1)$ dividiert, wobei r die Gesamtzahl der Proben darstellt. Die Gleichung zum Berechnen von Z lautet dann wie folgt:

$$Z = \frac{1}{r-1} (D_m / D_m) \quad (2)$$

[0050] Die quadratische Kovarianzmatrix Z ($c \times c$) wird in ihre jeweiligen Eigenwerte und Eigenvektoren zerlegt. Wegen des Versuchsfehlers wird die Gesamtzahl der Eigenwerte immer gleich der Gesamtzahl der Spalten (c) in der Datenmatrix D unter der Annahme von $c < r$ sein. Das Ziel ist es, $n < c$ Eigenwerte auszuwählen, die den größten Teil der Varianz der originalen Datenmatrix im Rahmen des Versuchsfehlers beschreiben können. Die Varianz V , die für die ersten n Eigenwerte ausgewiesen wird, kann wie folgt berechnet werden:

$$V = 100 \left(\frac{\sum_{j=1}^n \lambda_j}{\sum_{j=1}^c \lambda_j} \right) \quad (3)$$

[0051] Das Kriterium, das in dieser Analyse angewendet wurde, war, die ersten n Eigenwerte und entsprechenden Eigenvektoren zurückzubehalten, die 99% der Varianz im Originaldatenbestand ausweisen.

[0052] Als nächstes kann die Rangmatrix der Hauptkomponenten nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$R = DC \quad (4)$$

wobei D ($r \times c$) die Matrix der vorverarbeiteten Daten ist und C ($c \times n$) eine Matrix ist, deren Spalten die n Eigenvektoren enthalten, die den ersten n Eigenwerten entsprechen. Jede Reihe der Rangmatrix R ($r \times c$) entspricht den Hauptkomponentenrängen einer Probe, und jede Spalte entspricht einer Hauptkomponente. Die Hauptkomponenten sind gegenseitig orthogonal zueinander.

[0053] Zuletzt wird die Komponentengewichtung für jede Hauptkomponente berechnet. Die Komponentengewichtung stellt die Korrelation zwischen der Hauptkomponente und den Variablen des originalen Fluoreszenz-Emissionsspektrums dar. Die Komponentengewichtung kann wie nachfolgend gezeigt berechnet werden:

$$-CL_{ij} = \frac{C_{ij}}{\sqrt{S_{ii}}} \sqrt{\lambda_j} \quad (5)$$

wobei CL_{ij} die Korrelation zwischen der i -ten Variable (vorverarbeitete Intensität bei der i -ten Emissionswellenlänge) und der j -ten Hauptkomponente darstellt. C_{ij} ist die i -te Komponente des j -ten Eigenvektors, λ_j ist der j -te Eigenwert und S_{ii} ist die Varianz der i -ten Variablen.

[0054] Die Hauptkomponenten-Analyse wurde wie oben beschrieben bei jedem Typ von Matrizen der vorverarbeiteten Daten durchgeführt. Die Eigenwerte, die 99% der Varianz im Originaldatenbestand ausweisen, wurden zurückbehalten. Die zugehörigen Eigenvektoren wurden dann mit der originalen Datenmatrix multipliziert, um die Rangmatrix der Hauptkomponenten R zu erhalten.

4) Student's t-Test: Die Durchschnittswerte der Ränge der Hauptkomponenten wurden für jede histopathologische Gewebeklasse von jeder Hauptkomponente, die aus der Matrix der vorverarbeiteten Daten gewonnen wurde, berechnet. Ein zweiseitiger unpaariger Student's t-Test wurde eingesetzt, um die diagnostische Verteilung einer jeden Hauptkomponente zu ermitteln. Ein derartiger Test ist in Devore J.L., Probability and Statistics for Engineering and Sciences, Brooks/Cole, 1992 und in Walpole R.E., Myers R.H., Probability and Statistics for Engineers and Scientists, Macmillan Publishing Co., 1978, Kapitel 7 aufgezeigt worden. Die Hypothesen, dass die arithmetischen Mittel der Hauptkomponentenränge von zwei Gewebeklassen unterschiedlich sind, wurden 1) für normales Plattenepithel und SILs, 2) für normales Zylinderepithel und SILs und 3) für Entzündungen und SILs getestet. Der t-Test wurde um einen weiteren Schritt erweitert, um zu ermitteln, ob es irgendwelche statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den arithmetischen Mitteln der Hauptkomponentenränge von schweren SILs und leichten SILs gibt. Die Hauptkomponenten, für die die

oben aufgestellte Hypothese unter der Signifikanzebene 0,05 als wahr festgestellt wurde, wurden für eine weitere Analyse zurückbehalten.

5) Logistische Diskriminanz: Die logistische Diskriminanzanalyse stellt eine statistische Technik dar, die dazu verwendet werden kann, diagnostische Verfahren zu basierend auf A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten zu entwickeln, die das Manko des binären Entscheidungsschemas in der Zwei-Stufen-Verfahren überwinden. Dieses statistische Klassifizierungsverfahren basiert auf dem Bayes-Theorem und kann dazu verwendet werden, die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit zu berechnen, dass eine unbekannte Probe zu jeder der möglichen identifizierten Gewebeklassen gehört. Die logistische Abgrenzung wird in Albert A., Harris E.K., Multivariate Interpretation of Clinical Laboratory Data, Marcel Dekker, 1987 behandelt. Das Klassifizieren der unbekannt Probe in die Gewebeklasse, für die ihre A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit am höchsten ist, führt zu einem Klassifizierungsschema, das den Anteil an fehlerhaften Zuordnungen minimiert.

[0055] Für zwei diagnostische Klassen, G_1 und G_2 , ist die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit, zur Klasse G_1 zu gehören, bei einer gegebenen Messung x nach dem Bayes-Theorem wie folgt:

$$P(G_1|X) = \frac{P(x|G_1) P(G_1) C(2|1)}{P(x|G_1) P(G_1) C(2|1) + P(x|G_2) P(G_2) C(1|2)} \quad (6)$$

wobei $P(x|G_i)$ die bedingte gemeinsame Wahrscheinlichkeit, dass eine Gewebeprobe des Typs i der Hauptkomponentenrang x haben wird, und $P(G_i)$ die A-Priori-Wahrscheinlichkeit, den Gewebetyp i in der Grundgesamtheit der Proben zu finden, darstellt. $C(j|i)$ sind die Kosten der Fehlzugehörigkeit einer Probe zu der Gruppe j , wenn die tatsächliche Zugehörigkeit aber in der Gruppe i ist.

[0056] Die A-Priori-Wahrscheinlichkeit $P(G_i)$ ist eine Schätzung der Wahrscheinlichkeit, dass eine Probe des Typs i zu einer bestimmten Gruppe gehört, wenn keine Daten über sie verfügbar sind. Wenn die Probe als repräsentativ für die Grundgesamtheit betrachtet wird, können die beobachteten Fallanteile in jeder Gruppe als Schätzungen für die A-Priori-Wahrscheinlichkeit dienen. In einer klinischen Umgebung können entweder historische Häufigkeitszahlen, die der Grundgesamtheit der Patientinnen entsprechen, zum Erzeugen von A-Priori-Wahrscheinlichkeiten verwendet werden, oder es kann die kolposkopische Einschätzung der Wahrscheinlichkeit von Vorkrebs durch den Fachmann für das Schätzen von A-Priori-Wahrscheinlichkeiten verwendet werden.

[0057] Die bedingten Wahrscheinlichkeiten können aus den Wahrscheinlichkeitsverteilungen der n Hauptkomponentenränge für jeden Gewebetyp i entwickelt werden. Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen können unter Anwendung der Gamma-Funktion modelliert werden, die durch zwei Parameter Alpha und Beta, die sich auf den Mittelwert und die Standardabweichung des Datenbestandes beziehen, charakterisiert wird. Die Gamma-Funktion wird üblicherweise zum Modellieren von verzerrten Verteilungen angewendet und wird unten wie folgt definiert:

$$f(x; \alpha, \beta) = \frac{1}{\beta^\alpha \Gamma(\alpha)} x^{\alpha-1} e^{-\frac{x}{\beta}} \quad (7)$$

[0058] Die Gamma-Funktion kann zur Berechnung der bedingten Wahrscheinlichkeit, dass die Probe des Gewebetyps i den Hauptkomponentenrang x aufweisen wird, verwendet werden. Wenn mehr als eine Hauptkomponente zum Beschreiben einer Probengesamtheit benötigt wird, dann ist die bedingte gemeinsame Wahrscheinlichkeit für diese Probengesamtheit einfach das Produkt der bedingten Wahrscheinlichkeiten einer jeden Hauptkomponente (unter der Annahme, dass jede Hauptkomponente eine unabhängige Variable darstellt).

C. Multivariate Analyse der Gewebe-Fluoreszenzspektren

1) SILs versus normales Plattenepithel bei 337 nm Stimulus

[0059] Hier wird ein Abriss des Fluoreszenz-Diagnoseverfahrens, das entwickelt und an einer früheren Gruppe von 92 Patientinnen (476 Lokalisationen) getestet wurde, vorgestellt. Die spektralen Daten wurden vorverarbeitet, indem jedes Spektrum auf eine Spitzenintensität von Eins normalisiert wurde, auf das dann eine Durchschnittskalierung folgte. Die Durchschnittskalierung wird durchgeführt, indem das Durchschnittsspektrum für eine Patientin berechnet wird (unter Einsatz aller Spektren, die aus Gebärmutterhalslokalisationen in dieser Patientin gewonnen wurden) und dann von jedem Spektrum dieser Patientin subtrahiert wurde. Als nächstes wird die Hauptkomponenten-Analyse (PCA) angewendet, um die originalen Variablen eines jeden

vorverarbeiteten Fluoreszenzemissionsspektrums in einen kleineren Satz von linearen Kombinationen zu transformieren, die Hauptkomponenten genannt werden, und die 99% der Varianz des originalen Datenbestandes begründen. Lediglich die diagnostisch nutzbaren Hauptkomponenten werden für weitere Analysen zurückbehalten. Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten für jeden Gewebetyp werden für alle Proben im Datenbestand unter Anwendung der berechneten A-Priori- und bedingten gemeinsamen Wahrscheinlichkeiten ermittelt. Die A-Priori-Wahrscheinlichkeit wurde als prozentualer Anteil jedes Gewebetyps im Datenumfang berechnet. Die bedingte Wahrscheinlichkeit wurde aus der Gamma-Funktion errechnet, die die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der zurückbehaltenen Hauptkomponentenränge für jede Gewebeklasse modelliert. Der gesamte Datenbestand wurde in zwei Gruppen aufgeteilt: in den Kalibrier- und den Prognose-Satz in der Weise, dass ihre A-Priori-Wahrscheinlichkeiten annähernd gleich waren. Das Verfahren wird durch die Verwendung des Kalibrier-Satzes optimiert und dann auf den Prognose-Satz angewendet, um seine Effizienz in einer erwartungstreuen Weise einzuschätzen. Die Verfahren, die die PCA und das Bayes-Theorem einsetzen, wurden entwickelt, indem der Kalibrier-Satz, der aus früher gesammelten Spektren von 46 Patientinnen (mit 239 Lokalisationen) bestand, verwendet wurde. Diese Verfahren wurden dann auf den Prognose-Satz (früher gesammelte Spektren von weiteren 46 Patientinnen; mit 237 Lokalisationen) und den aktuellen Datenbestand von 36 Proben angewendet.

[0060] Genauer gesagt wurden mit einem Stimulus von 337 nm die Fluoreszenzspektren in einer Gesamtzahl von 476 Lokalisationen bei 92 Patientinnen erfasst. Die Daten wurden zufällig entweder dem Kalibrier- oder dem Prognose-Satz unter der Bedingung zugeordnet, dass beide Sätze im Groben die gleiche Anzahl von Proben aus jeder histopathologischen Klasse enthalten, wie dies in Tabelle 1 gezeigt ist.

Tabelle 1(a) Histopathologische Klassifizierung der bei einem Stimulus von 337 nm untersuchten Proben in den Lern-Satz (Training Set) und den Bewertungs-Satz (Validation Set) und (b) histologische Klassifizierung von Gebärmutterhalsproben, die spektroskopisch in vivo von 40 Patientinnen bei einem Stimulus von 380 nm und von 24 Patientinnen bei einem Stimulus von 460 nm abgenommen wurden.

(mit Squamous normal – normales Plattenepithel, Columnar Normal – normales Zylinderepithel, Inflammation – Entzündung, Low Grade SIL – leichte SIL, High Grade SIL – schwere SIL)

[0061]

(a)

Histologie	Lern-Satz	Bewertungssatz
normales Plattenepithel	127	126
normales Zylinderepithel	25	25
Entzündung	16	16
leichte SIL	40	40
schwere SIL	31	30

(b)

Histologie	Bei 380 nm Anregung (40 Patientinnen)	Bei 460 nm Anregung (24 Patientinnen)
normales Plattenepithel	82	76
normales Zylinderepithel	20	24
Entzündung	10	11
leichte SIL	28	14
schwere SIL	15	22

[0062] Die zufällige Zuordnung stellte sicher, dass nicht alle Spektren einer einzelnen Patientin in dem gleichen Datenbestand aufgenommen wurden. Der Zweck des Kalibrier-Satzes ist es, das Verfahren zu entwickeln und zu optimieren, und der Zweck des Prognose-Satzes ist es, seine Genauigkeit in einer von systematischen Fehlern befreiten Weise vorausschauend zu erproben. Das Zwei-Stufen-Verfahren und das multivari-

ate statistische Verfahren wurden unter Anwendung des Kalibrier-Satzes optimiert. Die Effizienz dieser Verfahren wurde dann vorausschauend auf dem Prognose-Satz erprobt.

[0063] Die Hauptkomponenten-Analyse der durchschnittskalierten normalisierten Spektren bei 337 nm Stimulus aus dem Kalibrier-Satz ergab, dass drei Hauptkomponenten 99% zur Gesamtvarianz beitragen. Lediglich die beiden ersten Hauptkomponenten, die aus der vorverarbeiteten Datenmatrix, die die durchschnittskalierten normalisierten Spektren enthält, bezogen wurden, zeigen die statistisch signifikantesten Abweichungen ($P < 0,05$) zwischen dem normalen Plattenepithel und SILs (PC1: $P < 1E-25$, PC2: $P < 0,006$). Die zweiseitigen P-Werte der Ränge der dritten Hauptkomponente waren statistisch nicht signifikant ($P < 0,2$). Daher wird der Rest der Analyse unter Anwendung dieser zwei Hauptkomponenten durchgeführt. Alle Hauptkomponenten sind in Anhang II aufgeführt.

[0064] Bei einem Stimulus von 337 nm wurde die A-Priori-Wahrscheinlichkeit ermittelt, indem der prozentuale Anteil jeder Gewebeklasse im Kalibrier-Satz berechnet wurde: 65% normale Plattenepithelgewebe und 35% SILs. Allgemeiner ausgedrückt sollten die A-Priori-Wahrscheinlichkeiten so gewählt werden, dass sie die Grundgesamtheit der Patientinnen unter Beobachtung beschreiben; die hier verwendeten Werte sind geeignet, da sie den Prognose-Satz ebenso gut beschreiben.

[0065] Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit zu jeder Gewebeklasse (normales Plattenepithel oder SIL) wurden für alle Proben im Kalibrier-Satz berechnet, indem die bekannten A-Priori-Wahrscheinlichkeiten und bedingten Wahrscheinlichkeiten, die aus der Gamma-Funktion berechnet wurden, verwendet wurden. Die Kosten für die fehlerhafte Zuordnung von SILs wurden mit 0,5 angenommen. [Fig. 5](#) zeigt die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur Klasse der SIL. Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit ist für alle Proben im Kalibrier-Satz aufgezeichnet. Diese grafische Darstellung zeigt, dass 75% der schweren SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,75 und fast 90% der schweren SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,6 aufweisen. Während 85% der leichten SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,5 aufweisen, weisen nur 60% der leichten SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,75 auf. Mehr als 80% des normalen Plattenepithels weisen eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,25 auf. Es ist anzumerken, dass die Bewertung des normalen Plattenepithels und der Proben mit Entzündung mit diesem Verfahren dazu führt, diese als SILs zu klassifizieren.

[0066] [Fig. 6](#) zeigt den prozentualen Anteil des normalen Plattenepithelgewebes und der SILs, die korrekt klassifiziert sind, im Vergleich zu den Kosten der fehlerhaften Zuordnung von SILs für die Daten aus dem Kalibrier-Satz an. Ein Anstieg in den Kosten der fehlerhaften Zuordnung von SILs führt zu einem Anstieg des Anteils von korrekt klassifizierten SILs und einer Abnahme von korrekt klassifizierten normalen Plattenepithelgeweben. Es ist zu beachten, dass ein Variieren der Kosten von 0,4 bis 0,6 die Genauigkeit der Klassifizierung sowohl der SILs als auch der normalen Gewebe um weniger als 15% verändert, was darauf hinweist, dass eine kleine Änderung in den Kosten die Leistungsfähigkeit des Verfahrens nicht signifikant verändert. Die optimalen Kosten der fehlerhaften Zuordnung würden für die verwendeten A-Priori-Wahrscheinlichkeiten bei 0,6–0,7 liegen, da dies fast 95% der SILs und 80% der normalen Plattenepithelgewebe korrekt klassifiziert und gegen geringe Änderungen in der A-Priori-Wahrscheinlichkeit nicht empfindlich ist.

[0067] Das Verfahren wurde auf die durchschnittskalierten Spektren des Prognose-Satzes angewendet, um eine erwartungstreue Schätzung ihrer Genauigkeit zu erhalten. Die zwei Eigenvektoren, die aus dem Kalibrier-Satz gewonnen wurden, wurden mit der Prognose-Matrix multipliziert, um die neue Rangmatrix der Hauptkomponenten zu erhalten. Unter Anwendung der gleichen A-Priori-Wahrscheinlichkeiten, den Kosten der fehlerhaften Zuordnung der SILs von 0,5 und bedingten gemeinsamen Wahrscheinlichkeiten, die aus der Gamma-Funktion resultieren, die alle aus dem Kalibrier-Satz erstellt wurden, wurde die Bayes-Regel angewendet, um die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten für alle Proben im Prognose-Satz zu berechnen.

[0068] Die Verwechslungs-Matrizen in den Tabellen 2(a) und 2(b) zeigen die spektroskopische Klassifikation unter Einsatz dieses Verfahrens entsprechend für den Kalibrier-Satz bzw.

[0069] für den Prognose-Satz. Ein Vergleich der Probenklassifikation zwischen den Prognose- und den Kalibrier-Sätzen zeigt an, dass das Verfahren im Rahmen von 7% bei einem unbekanntem Datenumfang mit annähernd gleicher A-Priori-Wahrscheinlichkeit arbeitet.

Tabelle 2. Ergebnisse des multivariaten statistischen Verfahrens, angewendet auf die gesamten Fluoreszenz-emissionsspektren von normalen Plattenepithelgeweben (Squamous normal) und SILs (Low Grade – leicht, High Grade – schwer) bei einem Stimulus von 337 nm in (a) dem Kalibrier-Satz und (b) dem Prognose-Satz.

(a)

Klassifikation	normales Plattenepithel	Leichte SIL	Schwere SIL
normales Plattenepithel	83%	15%	10%
SIL	17%	85%	90%

(b)

Klassifikation	normales Plattenepithel	Leichte SIL	Schwere SIL
normales Plattenepithel	81%	22%	6%
SIL	19%	78%	94%

[0070] Der Nutzen eines weiteren Parameters, der Komponentengewichtung genannt wird, wurde untersucht, um die Anzahl der Emissionsvariablen zu reduzieren, die dafür erforderlich sind, eine Klassifizierung mit einer minimalen Abnahme des Prognosevermögens zu erreichen. Die Teile des Emissionsspektrums, die am stärksten mit den Komponentengewichtungen korreliert sind (Korrelation $> 0,9$ oder $< 0,9$) wurden ausgewählt und die reduzierte Datenmatrix wurde dazu verwendet, um das Verfahren neu zu bilden und zu beurteilen. Unter Verwendung der Intensität bei 2 Emissionswellenlängen wurde das Verfahren in einer identischen Weise entwickelt, wie es mit dem gesamten Emissionsspektrum erfolgte. Es wurde unter Anwendung des Kalibrier-Satzes optimiert und auf den Prognose-Satz angewendet. Ein Vergleich der Probenklassifikation basierend auf dem Verfahren, das das gesamte Emissionsspektrum verwendet, mit dem Verfahren, das die Intensität bei 2 Emissionswellenlängen verwendet, zeigt, dass die Effizienz des zuletzt genannten Verfahrens genau so gut ist beim Klassifizieren von normalen Plattenepithel und gerinfügigen SILs ist. Die Effizienz des zuletzt genannten Verfahrens liegt beim Klassifizieren von schweren SILs um 6% niedriger.

2) SILs versus normales Zylinderepithel und Entzündungen bei 380 nm Stimulus

[0071] Die Hauptkomponenten, die aus der vorverarbeiteten Datenmatrix, die durchschnittskalierte normalisierte Spektren bei einem Stimulus von 380 nm enthält, gewonnen werden, könnten dazu verwendet werden, die SILs von nicht befallenen Gewebe (normalem Zylinderepithel und Entzündungen) abzugrenzen. Die Hauptkomponenten sind im Anhang II aufgeführt. Darüber hinaus zeigte ein zweiseitiger unpaariger t-Test, dass lediglich die Hauptkomponente 2 (PC2) und die Hauptkomponente 5 (PC5) die statistisch signifikantesten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den SILs und den nicht befallenen Geweben (normales Zylinderepithel und Entzündungen) aufwiesen. Die p-Werte der übrigen Hauptkomponentenränge waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,13$). Deshalb wurde der Rest der Analyse unter Verwendung dieser drei Hauptkomponenten, die zusammen 32% der Abweichung im Original-Datenbestand auswiesen, durchgeführt.

[0072] [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) stellen die gemessene Wahrscheinlichkeitsverteilung und die am besten geeignete normale Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktion der nicht befallenen Gewebe und SILs jeweils für PC2 und PC5 dar. Es gibt für jeden Fall eine begründete Übereinstimmung zwischen der gemessenen und der berechneten Wahrscheinlichkeitsverteilung. Die A-Priori-Wahrscheinlichkeit wurde durch Berechnen des prozentualen Anteils jedes Gewebetyps im Datenbestand bestimmt: 41% nicht befallenes Gewebe und 59% SILs. Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit zu jedem Gewebetyp wurden für alle Proben im Datenbestand unter Nutzung der bekannten A-Priori-Wahrscheinlichkeiten und der bedingten Wahrscheinlichkeiten, die aus der normalen Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktion berechnet wurden, berechnet. [Fig. 8](#) zeigt die rückwirkende Ausführung des diagnostischen Verfahrens zu seiner Optimierung auf dem gleichen Datenbestand. Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit einer Zuordnung zur Klasse der SIL wird für alle bewerteten Proben aufgezeichnet. Die gezeigten Ergebnisse gelten bei Kosten der fehlerhaften Klassifizierung von 50%. [Fig. 8](#) zeigt, dass 78% der SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,5, 78% der normalen Zylinderepithelgewebe eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,5 und 60% der Proben mit Entzündungen eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,5 aufweisen. Es ist anzumerken, dass nur 10 Proben mit Entzündungen in dieser Studie enthalten waren.

[0073] Die Tabellen 3(a) und (b) vergleichen (a) die rückwirkende Ausführung des diagnostischen Verfahrens auf dem Datenbestand, der zu seiner Optimierung verwendet wird, mit (b) einer vorausschauenden Schätzung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens unter Einsatz einer Vergleichsprüfung. Die Tabelle 3(a) zeigt, dass 74% der schweren SILs, 78% der leichten SILs, 78% der normalen Zylinderepithelproben und 60% der Proben mit Entzündungen bei Kosten der fehlerhaften Klassifizierung von 50% korrekt klassifiziert wurden. Die von systematischen Fehlern befreite Schätzung der Effizienz des Verfahrens (Tabelle 3(b)) zeigt, dass es keine Änderung im prozentualen Anteil der korrekt klassifizierten SILs und nur eine Abnahme von annähernd 10% in den Anteilen der korrekt klassifizierten normalen Zylinderepithelproben gibt.

Tabelle 3.(a) Eine rückwirkende und (b) eine vorausschauenden Schätzung der Leistungsfähigkeit des multivariaten statistischen Verfahrens unter Anwendung von durchschnittskalierten normalisierten Spektren bei einem Stimulus von 380 nm zur Differenzierung der SILs (Low Grade – leicht, High Grade – schwer) von nicht befallenen (Non Diseased) Geweben (normales Zylinderepithel (Normal Columnar) und Entzündungen (Inflammation)).

(a)

Klassifikation	normales Plattenepithel	Entzündung	Leichte SIL	Schwere SIL
Nicht befallen	78%	60%	21%	26%
SIL	22%	40%	79%	74%

(b)

Klassifikation	normales Plattenepithel	Entzündung	Leichte SIL	Schwere SIL
Nicht befallen	65%	30%	22%	26%
SIL	35%	70%	78%	74%

3) Normales Plattenepithel versus SILs bei 460 nm Stimulus

[0074] Die Hauptkomponenten, die aus der vorverarbeiteten Datenmatrix, die durchschnittskalierte normalisierte Spektren bei einem Stimulus von 460 nm enthält, gewonnen werden, könnten dazu verwendet werden, die SILs von normalem Plattenepithelgewebe abzugrenzen. Diese Hauptkomponenten sind im Anhang II aufgeführt. Nur die Hauptkomponenten 1 und 2 wiesen die statistisch signifikantesten Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den SILs und dem normalen Plattenepithelgewebe auf. Die p-Werte der übrigen Hauptkomponentenränge waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,06$). Deshalb wurde der Rest der Analyse unter Verwendung dieser zwei Hauptkomponenten, die zusammen 75% der Abweichung im Original-Datenbestand auswiesen, durchgeführt.

[0075] [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#) stellen die gemessene Wahrscheinlichkeitsverteilung und die am besten geeignete normale Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktion der normalen Plattenepithelgewebe und SILs jeweils für PC1 und PC2 dar. Es gibt für jeden Fall eine begründete Übereinstimmung zwischen der gemessenen und der berechneten Wahrscheinlichkeitsverteilung. Die A-Priori-Wahrscheinlichkeit wurden wie folgt ermittelt: 67% normales Plattenepithelgewebe und 33% SILs. Als nächstes wurden die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit zu jedem Gewebetyp für alle Proben im Datenbestand berechnet. [Fig. 10](#) zeigt die rückwirkende Ausführung des diagnostischen Verfahrens zu seiner Optimierung auf dem gleichen Datenbestand. Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit einer Zuordnung zur Klasse der SILs wird für alle bewerteten Proben aufgezeichnet. Die gezeigten Ergebnisse gelten bei Kosten der fehlerhaften Klassifizierung der SILs von 55%. [Fig. 10](#) zeigt, dass 92% der SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,5 und 76% der normalen Plattenepithelgewebe eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,5 aufweisen.

[0076] Eine vorausschauende Schätzung der Effizienz des Verfahrens wurde unter Einsatz einer Kreuzvalidierung gewonnen. Die Tabellen 4(a) und (b) vergleichen (a) die rückwirkende Ausführung des Verfahrens auf dem Datenbestand, der zu seiner Optimierung verwendet wird, mit (b) der vorausschauenden Schätzung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens unter Einsatz einer Kreuzvalidierung. Die Tabelle 4(a) zeigt, dass 92% der

schweren SILs, 90% der leichten SILs und 76% der normalen Plattenepithelproben bei Kosten der fehlerhaften Klassifizierung von 55% korrekt klassifiziert wurden. Die von systematischen Fehlern befreite Schätzung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens (Tabelle 4(b)) zeigt, dass es keine Änderung im prozentualen Anteil der korrekt klassifizierten schweren SILs und der normalen Plattenepithelproben gibt; es gibt nur eine Verringerung von annähernd 5% in den Anteilen korrekt klassifizierter leichter SILs.

Tabelle 4.(a) Eine rückwirkende und (b) eine vorausschauenden Schätzung der Leistungsfähigkeit des multivariaten statistischen Verfahrens unter Anwendung von durchschnittskalierten normalisierten Spektren bei einem Stimulus von 460 nm zur Differenzierung der SILs (Low Grade – leicht, High Grade – schwer) von normalen Plattenepithelgeweben (Normal Squamous).

(a)

Klassifikation	normales Plattenepithel	Leichte SIL	Schwere SIL
normales Plattenepithel	76%	7%	9%
SIL	24%	93%	91%

(b)

Klassifikation	normales Plattenepithel	Leichte SIL	Schwere SIL
normales Plattenepithel	75%	14%	9%
SIL	25%	86%	91%

4) Leichte SILs versus schwere SILs bei 460 nm Stimulus

[0077] Die Hauptkomponenten, die aus der vorverarbeiteten Datenmatrix, die normalisierte Spektren bei einem Stimulus von 460 nm enthält, gewonnen werden, könnten dazu verwendet werden, die schwere SILs von leichten SILs abzugrenzen. Diese Hauptkomponenten sind im Anhang II aufgeführt. Die Hauptkomponente 4 (PC4) und die Hauptkomponente 7 (PC7) wiesen die statistisch signifikantesten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den schweren SILs und den leichten SILs auf. Die p-Werte der übrigen Hauptkomponentenränge waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,09$). Deshalb wurde der Rest der Analyse unter Verwendung dieser zwei Hauptkomponenten, die zusammen 8% der Abweichung im Original-Datenbestand auswiesen, durchgeführt.

[0078] [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#) stellen die gemessene Wahrscheinlichkeitsverteilung und die am besten geeignete normale Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktion der normalen Plattenepithelgewebe und SILs jeweils für PC4 und PC7 dar. Es gibt für jeden Fall eine begründete Übereinstimmung zwischen der gemessenen und der berechneten Wahrscheinlichkeitsverteilung. Die A-Priori-Wahrscheinlichkeit wurden wie folgt ermittelt: 39% leichte SILs und 61% schwere SILs. Es wurden die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten der Zugehörigkeit zu jedem Gewebetyp berechnet. [Fig. 12](#) zeigt die rückwirkende Ausführung des diagnostischen Verfahrens zu seiner Optimierung auf dem gleichen Datenbestand. Die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit einer Zuordnung zur Klasse der SILs wird für alle bewerteten Proben aufgezeichnet. Die gezeigten Ergebnisse gelten bei Kosten der fehlerhaften Klassifizierung der SILs von 65%. [Fig. 12](#) zeigt, dass 82% der schweren SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit größer als 0,5 und 78% der leichten SILs eine A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,5 aufweisen.

[0079] Eine vorausschauende Schätzung der Effizienz des Verfahrens wurde unter Einsatz einer Kreuzvalidierung gewonnen. Die Tabellen 5(a) und (b) vergleichen (a) die rückwirkende Ausführung des Verfahrens auf dem Datenbestand, der zu seiner Optimierung verwendet wird, mit (b) der von systematischen Fehlern befreiten Schätzung der Effizienz des Verfahrens unter Einsatz einer Vergleichsprüfung. Die Tabelle 5(a) zeigt, dass 82% der schweren SILs und 78% der leichten SILs bei Kosten der fehlerhaften Klassifizierung von 65% korrekt klassifiziert wurden. Die von systematischen Fehlern befreite Schätzung der Effizienz des Verfahrens (Tabelle 5(b)) zeigt, dass es eine Abnahme von annähernd 5% in den Anteilen korrekt klassifizierter schwerer SILs und leichter SILs gibt.

Tabelle 5.(a) Eine rückwirkende und (b) eine vorausschauenden Schätzung der Effizienz des multivariaten statistischen Verfahrens unter Anwendung von durchschnittskalierten normalisierten Spektren bei einem Stimulus von 460 nm zur Differenzierung der schweren (High Grade) SILs von leichten SILs (Low Grade).

(a)

Klassifikation	Leichte SIL	Schwere SIL
Leichte SIL	79%	18%
Schwere SIL	21%	82%

(b)

Klassifikation	Leichte SIL	Schwere SIL
Leichte SIL	72%	27%
Schwere SIL	21%	77%

[0080] [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) zeigen Flussdiagramme der oben beschriebenen diagnostischen Verfahren der Fluoreszenzspektrographie. In der Praxis werden die Flussdiagramme in den [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#) und [Fig. 3C](#) in einer geeigneten Form kodiert und in den Programmspeicher des Computers **119** ([Fig. 1](#)) geladen, der dann die Vorrichtung aus [Fig. 1](#) steuert, um die Durchführung des diagnostischen Verfahrens nach der vorliegenden Erfindung zu veranlassen.

[0081] Die Steuerung beginnt zunächst mit Bezug auf die [Fig. 3A](#) in Block **300**, in dem von der Patientin Fluoreszenzspektren bei einem Stimulus von 337, 380 und 460 nm gewonnen werden. Die Steuerung geht dann weiter zu Block **301**, in dem die Wahrscheinlichkeit der Gewebeprobe unter der Annahme, sie sei eine SIL, aus den Spektren, die von der Patientin bei einem Stimulus von 337 oder 460 nm gewonnen wurden, berechnet werden. Dieses Verfahren wird mit Bezug auf die [Fig. 3B](#) detaillierter dargestellt.

[0082] Die Steuerung geht dann weiter zum Entscheidungsblock **302**, in dem die in Block **301** berechnete Wahrscheinlichkeit der SIL mit einem Schwellenwert von 0,5 verglichen wird.

[0083] Wenn die Wahrscheinlichkeit nicht größer als 0,5 ist, geht die Steuerung weiter zu Block **303**, in dem die Gewebeprobe als normal diagnostiziert wird, und die Prozedur endet. Wenn andererseits die in Block **301** berechnete Wahrscheinlichkeit größer als 0,5 ist, geht die Steuerung weiter zu Block **304**, in dem die Wahrscheinlichkeit des Gewebes, dass es eine SIL enthält, auf Basis der Emissionsspektren, die bei einem Stimulus von 380 nm gewonnen wurden, berechnet wird. Dieses Verfahren ist mit jenem Verfahren identisch, das zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit von SIL aus den Fluoreszenzspektren bei einem Stimulus von 337 nm oder 460 nm verwendet wurde, und wird ebenfalls weiter unten mit Bezug auf die [Fig. 3B](#) detaillierter vorgestellt.

[0084] Die Steuerung geht dann weiter zum Entscheidungsblock **306**, in dem die in Block **304** berechnete Wahrscheinlichkeit der SIL mit einem Schwellenwert von 0,5 verglichen wird. Wenn die in Block **304** berechnete Wahrscheinlichkeit nicht größer als 0,5 ist, geht die Steuerung weiter zu Block **307**, in dem die Gewebeprobe als normal diagnostiziert wird, und die Prozedur endet. Andernfalls geht die Steuerung, wenn der Entscheidungsblock **306** ermittelt, dass die in Block **304** berechnete Wahrscheinlichkeit größer als 0,5 ist, weiter zu Block **308**, in dem die Wahrscheinlichkeit einer schweren SIL aus den Fluoreszenzemissionsspektren, die bei einem Stimulus von 460 nm gewonnen wurden, berechnet wird. Dieses Verfahren wird weiter unten mit Bezug auf die [Fig. 3C](#) detaillierter erläutert.

[0085] Die Steuerung geht dann weiter zum Entscheidungsblock **309**, in dem die in Block **308** berechnete Wahrscheinlichkeit der schweren SIL mit einem Schwellenwert von 0,5 verglichen wird. Wenn die in Block **308** berechnete Wahrscheinlichkeit nicht größer als 0,5 ist, wird eine leichte SIL (Block **311**), andernfalls eine schwere SIL (Block **312**) diagnostiziert.

[0086] Nun wird mit Bezug auf die [Fig. 3B](#) die Aufbereitung der Fluoreszenzspektren aus den Blöcken **301** und **304** detaillierter erläutert. Es sollte gesehen werden, dass der Block **301**, obwohl die Abläufe der Blöcke

301 und **304** identisch sind, mit Spektren arbeitet, die bei einem Stimulus von 337 oder 460 nm gewonnen wurden, wohingegen der Block **304** mit Spektren arbeitet, die bei einem Stimulus von 380 nm gewonnen wurden. In beiden Fällen beginnt die Steuerung in Block **315**, in dem die Datenmatrix der Fluoreszenzspektren D aufgebaut wird, wobei jede Zeile darin einem Proben-Fluoreszenzspektrum entspricht, das von der Patientin gewonnen wurde. Die Steuerung geht dann weiter zum Block **316**, in dem die mittlere Intensität bei jeder Emissionswellenlänge der erfassten Fluoreszenzspektren berechnet wird. Dann wird in Block **317** jedes Spektrum der Datenmatrix bezogen auf ein Maximum eines jeden Spektrums normalisiert. Dann wird in Block **318** jedes Spektrum der Datenmatrix bezogen auf den in Block **316** berechneten Durchschnitt durchschnittskaliert. Die Ausgabe des Blocks **318** ist eine vorverarbeitete Datenmatrix, die vorverarbeitete Spektren für die Patientin in Bearbeitung umfasst.

[**0087**] Die Steuerung geht dann weiter zum Block **319**, in dem – wie oben erläutert – mit Bezug auf die Gleichungen 2, 3, 4 und 5 die Hauptkomponenten-Analyse durchgeführt wird. Während der Hauptkomponenten-Analyse wird die Kovarianzmatrix Z (Gleichung (2)) berechnet unter Verwendung einer vorverarbeiteten Datenmatrix, deren Zeilen normalisierte, durchschnittskalierte Spektren von allen Patientinnen inklusive der gegenwärtig beobachteten Patientin umfasst. Das Ergebnis aus Block **319** wird an den Block **321** weitergegeben, in dem ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt wird, der die Auswahl von ausschließlich diagnostischen Hauptkomponenten zur Folge hat. Die Steuerung geht dann weiter zum Block **322**, in dem die logistische Abgrenzung durchgeführt wird, die weiter oben mit Bezug auf die Gleichungen 6 und 7 erläutert wurde.

[**0088**] Die Größe, die in Block **322** berechnet wurde, stellt die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit der Probe dar, die zur Klasse der SILs gehört (Block **323**).

[**0089**] Nun werden mit Bezug auf die [Fig. 3C](#) die Details der Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer schweren SIL bei einem Stimulus von 460 nm (Block **308** in [Fig. 3A](#)) vorgestellt. Die Steuerung beginnt in Block **324**, in dem die Datenmatrix der Fluoreszenzspektren D aufgebaut wird, wobei jede Zeile darin einem Proben-Fluoreszenzspektrum entspricht, das von der Patientin gewonnen wurde. Die Steuerung geht dann weiter zum Block **326**, in dem jedes Spektrum der Datenmatrix bezogen auf ein Maximum eines jeden Spektrums normalisiert wird. Die Ausgabe des Blocks **326** ist eine vorverarbeitete Datenmatrix, die vorverarbeitete Spektren für die Patientin in Bearbeitung umfasst. Es sollte beachtet werden, dass im Gegensatz zum Ablauf der Vorverarbeitung in der Routine zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer SIL aus [Fig. 3B](#) keine Durchschnittskalierung durchgeführt wird, wenn die Wahrscheinlichkeit von schweren SIL berechnet wird.

[**0090**] Die Steuerung geht dann weiter zum Block **327**, in dem – wie oben erläutert – mit Bezug auf die Gleichungen 2, 3, 4 und 5 die Hauptkomponenten-Analyse durchgeführt wird. Während der Hauptkomponenten-Analyse wird die Kovarianzmatrix Z (Gleichung (2)) berechnet unter Verwendung einer vorverarbeiteten Datenmatrix, deren Zeilen normalisierte, durchschnittskalierte Spektren von allen Patientinnen inklusive der gegenwärtig beobachteten Patientin umfasst. Das Ergebnis aus Block **327** wird an den Block **328** weitergegeben, in dem ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt wird, der die Auswahl von ausschließlich diagnostischen Hauptkomponenten zur Folge hat. Die Steuerung geht dann weiter zum Block **329**, in dem die logistische Abgrenzung durchgeführt wird, die weiter oben mit Bezug auf die Gleichungen 6 und 7 erläutert wurde.

[**0091**] Die Größe, die in Block **329** berechnet wurde, stellt die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit der Probe dar, die zur Klasse der schweren SILs gehört (Block **331**).

2. Raman-Spektroskopie-Diagnose-Verfahren

[**0092**] Um die Wirksamkeit der vorliegenden Erfindung zu zeigen, wurden zwanzig kolposkopisch normale und zwanzig kolposkopisch abnormale Proben untersucht. Zwei Probenpaare wurden wegen Versuchsfehlern aussortiert. Histologisch gesehen lagen 19 normale Proben, 2 Proben mit Metaplasien, 4 Proben mit Entzündungen, 2 HPV-Proben und 9 Proben mit Dysplasie (2 mit leichter und 7 mit mittlerer bis schwerer Dysplasie) vor. Für die Zwecke dieser Studie wurden die Proben wie folgt klassifiziert: normal, Metaplasien, Entzündung, leichte SIL und schwere SIL. Zwei Arten der Unterscheidung sind von klinischen Interesse: (1) die Unterscheidung zwischen SILs und allen anderen Geweben und (2) die Unterscheidung zwischen schweren und leichten SILs. Die diagnostischen Verfahren, die unter Anwendung der Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie entwickelt wurden, zielen darauf ab, eine optimale Empfindlichkeit in dieser Abgrenzung zu erreichen.

[**0093**] Es wurden Spektren von Gebärmutterhalsgeweben nahe dem Infrarotbereich durch den Einsatz des Systems gewonnen, das in [Fig. 2](#) dargestellt ist. Diese Spektren waren durch Rauschen und Autofluoreszenz verzerrt und werden vorzugsweise bearbeitet, um das Schwingungsspektrum des Gewebes zu erzeugen. Das

Rhodamin 6G-Pulver, das in eine Quarzküvette eingepackt ist, wurde für Kalibrierzwecke eingesetzt, da es gut dokumentierte Raman- und fluoreszente Eigenschaften besitzt. Ein Rhodamin-Spektrum mit einem hohem Rauschabstand wurde bei 20 Sekunden Integrationszeit, ein Rhodamin-Spektrum mit einem niederen Rauschabstand bei 1 Sekunde Integration gewonnen. [Fig. 13](#) zeigt einen Graphen, der die gemessenen Rhodamin-Spektren jeweils mit hohen und niederen Rauschabständen darstellt.

[0094] Für das beobachtete Rauschen in den Spektren wurde nachgewiesen, dass es annähernd Gauss-verteilt ist. Das bedeutet, dass der Einsatz von einfachen Filtertechniken beim Glätten der Kurven sich als wirksam erweisen würde. Das Verwenden eines beweglichen Durchschnittsintervalls in dem Halbwertfilter erzeugt akzeptable Ergebnisse. Optimale Ergebnisse werden jedoch gewonnen, wenn das Spektrum mit einer Gauss-Verteilung gefaltet wird, deren Halbwertbreite gleich der Auflösung des Systems ist. Dieses Verfahren verwirft jedes Signal mit einer Bandbreite unter Auflösung des Systems. Das gefilterte Streusignal ist immer noch durch die Restfluoreszenz verzerrt. Eine einfache aber genaue Methode, um diese Fluoreszenz auszuschalten, ist es, das Spektrum, das sowohl Raman- als auch Fluoreszenzdaten enthält, in ein Polynom einer genügend hohen Ordnung einzubauen, um die Form der Fluoreszenzlinie, nicht jedoch das Raman-Signal mit höherer Frequenz zu erfassen. Es wurde ein Polynom fünften Grades angewendet. Das Polynom wurde dann vom Spektrum subtrahiert, um das Raman-Signal allein zu erzeugen. In [Fig. 14](#) wird die Wirksamkeit des Aussonderns der Fluoreszenz aus einem Raman-Signal unter Anwendung einer polynomen Form dargestellt.

[0095] [Fig. 15](#) stellt einen Graphen dar, der zeigt, dass das bearbeitete Rhodamin-Spektrum mit niederm Rauschabstand dem Rhodamin-Spektrum mit hohem Rauschabstand ähnelt und nicht durch den Filterungsprozess verzerrt wird. Mit Bezug auf die [Fig. 15](#) kann im Vergleich gesehen werden, dass das Spektrum des Rhodamin mit niederm Rauschabstand, das zu Beginn stark rauschte, die gleichen Haupt- und Sekundär-Spitzen wie das Spektrum des Rhodamin mit hohem Rauschabstand zeigte, sobald es bearbeitet war. Das bestätigt die eingesetzten Signalbearbeitungsmethoden und zeigt, dass die Methode das sich daraus ergebende Spektrum nicht verzerrt. Jedes Gewebespektrum wurde auf diese Weise bearbeitet. Spitzenintensitäten und maßgebliche Frequenzbereiche dieser Spektren wurden gemessen und für die Diagnose verwendet.

[0096] Typische verarbeitete Spektren für ein Paar aus normaler und abnormaler Probe von der gleichen Patientin werden in [Fig. 16](#) dargestellt, der einen Graphen eines typischen Paares von verarbeiteten Spektren von einer Patientin mit Fehlbildungen zeigt, der die unterschiedlichen beobachteten Scheitelpunkte abbildet. Verschiedene Scheitelpunkte sind bei 626, 818, 978, 1070, 1175, 1246, 1325, 1454 und 1656 cm^{-1} ($\pm 11 \text{ cm}^{-1}$) beobachtet worden. Verschiedene der beobachteten Scheitelpunkte wurden in Untersuchungen über gynäkologische Gewebe anderer Gruppen wie etwa Lui et al., „Fluorescence and Time-Resolved Light Scattering as Optical Diagnostic Techniques to Separate Diseased and Normal Biomedical Media“, J Photochem Photobiol B: Biol, 16, 187–209, 1992 über Kolongewebe und in IR-Absorptionsuntersuchungen über Gebärmutterhalszellen von Wong et al., „Infrared Spectroscopy of Human Cervical Cells: Evidence of Extensive Structural Changes during Carcinogenesis“, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 10988–10992, 1991 zitiert. [Fig. 17](#) zeigt einen Graphen der Intensität des Wellenkanals bei 1325 cm^{-1} für alle Biopsien, um die Abweichung von Patientin zu Patientin in den Intensitäten der Raman-Wellenkanäle darzustellen. Die Intensitäten der verschiedenen Raman-Wellenkanäle zeigen eine erhebliche Veränderlichkeit von Patientin zu Patientin. In [Fig. 17](#) sind die Proben als Paare von jeder Patientin gezeichnet worden. Um diese Veränderlichkeit von Patientin zu Patientin zu berücksichtigen, wurde jedes Spektrum auf den jeweiligen Scheitelpunkt der kolposkopischen und histologisch normalen Proben der gleichen Patientin normalisiert. Auf diese Weise besitzen alle kolposkopischen normalen Proben, die histologisch normal sind, eine Spitzenintensität von eins. Normalisierte und nicht-normalisierte Spektren wurden auf diagnostische Informationen hin untersucht.

[0097] Jeder der beobachteten Wellenkanäle enthält einige diagnostische Informationen und kann mit veränderter Genauigkeit zwischen Gewebetypen unterscheiden. Klinisch ist die Abtrennung der SILs von allen anderen Geweben und der schweren SILs von den leichten SILs von Interesse. Wegen der Veränderlichkeit von Patientin zu Patientin wurde eine bedeutsamere Unterscheidung bei der Anwendung der paarigen Analyse gewonnen. Jeder der Wellenkanäle bei 626, 1070 und 1656 cm^{-1} kann SILs von allen anderen Geweben differenzieren. Bei allen drei Wellenkanälen ist die Intensität der normalen größer als die Intensität der SIL. Dies ist in den [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#) dargestellt.

[0098] [Fig. 18A](#) und [Fig. 18B](#) bilden Graphen ab, die die diagnostische Leistungsfähigkeit der normalisierten Spitzenintensitäten der Raman-Wellenkanäle jeweils bei 626 cm^{-1} bzw. 1070 cm^{-1} zeigen. Der Wellenkanal bei 626 cm^{-1} , das aufgrund von Ringdeformationen entsteht, unterscheidet die SILs von allen anderen Geweben mit einer Empfindlichkeit und Genauigkeit von 91% und 92% ([Fig. 18A](#)). Eine SIL-Probe (fokale HPV) ist falsch zugeordnet. Die Metaplasie-Proben sind in diesem Wellenkanal nicht korrekt als SILs klassifiziert. Beim Ein-

satz der Intensität im C-O-streckenden und -biegenden Schwing-Wellenkanal von etwa 1070 cm^{-1} für eine ähnliche Zuordnung jedoch werden alle Metaplasie- und Entzündungsproben in korrekter Weise nicht als SILs klassifiziert (Fig. 18B). Bei den zwei nicht korrekt zugeordneten Proben ist festgestellt worden, dass eine Probe eine fokale Dysplasie aufweist und die andere die gleiche Probe mit fokalem HPV ist, die bei 626 cm^{-1} falsch klassifiziert wurde. Es wurde lediglich eine normale Probe falsch als SIL klassifiziert. Es wurde eine Empfindlichkeit und eine Genauigkeit von 82% und 96% erreicht. Dieser Wellenkanal ist durch Wong et al. in „Infrared Spectroscopy of Human Cervical Cells: Evidence of Extensive Structural Changes during Carcinogenesis“, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 10988–10992, 1991 dem Glykogen und den zellulären Lipiden/Phosphaten zugeschrieben worden.

[0099] Fig. 19 bildet einen Graphen ab, der die diagnostische Leistungsfähigkeit des Wellenkanals bei 1656 cm^{-1} zeigt. Die Entscheidungslinie (1) trennt die SILs von allen anderen Geweben. Die Entscheidungslinie (2) trennt die schweren SILs von den leichten SILs. Die normalisierte Spitzenintensität bei 1656 cm^{-1} kann SILs von anderen Geweben durch Anwenden der Linie (1) als Entscheidungslinie mit einer Empfindlichkeit und einer Genauigkeit von 91% und 88% unterscheiden. Die Probe mit der fokalen Dysplasie, die bei 1070 cm^{-1} nicht korrekt zugeordnet wurde, ist erneut falsch klassifiziert worden. Die Metaplasie-Proben sind erneut als SILs klassifiziert worden. Der Vorteil der Anwendung dieses Scheitelpunktes liegt darin, dass sie auch zwischen schweren SILs und leichten SILs unterscheiden kann. Durch Anwenden der Linie (2) als Entscheidungslinie kann dieser Scheitelpunkt die schweren SILs von den leichten SILs mit einer Empfindlichkeit von 86% abgrenzen. Die als SILs falsch klassifizierten Metaplasie-Proben sind von den Proben mit schweren SILs getrennt worden. Es wurde nur eine normale Probe falsch klassifiziert. Im Gebärmutterhals ist dieser Scheitelpunkt mit den zellulären Proteinen aus den Zellkernen der Epithelzellen in Verbindung gebracht worden. Diese Proteine wurden von Lui et al. in „Fluorescence and Time-Resolved Light Scattering as Optical Diagnostic Techniques to Separate Diseased and Normal Biomedical Media“, J Photochem Photobiol B: Biol, 16, 187–209, 1992 so gedeutet, dass sie im Wesentlichen Kollagen und Elastin darstellten.

[0100] Aus den anderen in den Raman-Spektren von Gebärmutterhalsgeweben beobachteten Eigenschaften wird der Wellenkanal bei 818 cm^{-1} mit der „Ring-Atmung“ in Verbindung gebracht und dem Blut zugerechnet. Die Intensität dieses Wellenkanals ist in Dysplasie-Proben größer relativ gesehen zu den entsprechenden normalen Proben. Der Scheitelpunkt bei 978 cm^{-1} wird den phosphorylierten Proteinen und den Nukleinsäuren zugeordnet. Dieser Wellenkanal unterscheidet die SILs von allen anderen Geweben mit einer Empfindlichkeit und Genauigkeit von 82% und 80%. Der Wellenkanal bei 1175 cm^{-1} kann normale Proben von Dysplasie-Proben mit einer Empfindlichkeit von 88% abgrenzen. Die Abnahme in der Intensität dieses Wellenkanals bei Dysplasie ist auch von Wong et al. in „Infrared Spectroscopy of Human Cervical Cells: Evidence of Extensive Structural Changes during Carcinogenesis“, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 10988–10992, 1991 vorgetragen worden. Dieser Wellenkanal von ungefähr 1175 cm^{-1} wurde mit dem C-O-Strecken in Verbindung gebracht, und dieser Wellenkanal besteht aus drei überlappenden Linien bei 1153 , 1161 und 1172 cm^{-1} . Eine ähnliche Entwicklung wird auch bei den Proben aus Gebärmutterhalsgewebe beobachtet. Diese Frequenzbänder sind mit dem C-O-Strecken von Zellproteinen wie etwa Tyrosin und Kohlehydraten in Verbindung gebracht worden. Die Raman-Linie bei 1246 cm^{-1} wird den Dehnungsvibrationen von C-N (Amid III) zugeordnet. Die Linie bei 1325 cm^{-1} ergibt sich aus den Ringvibrationen und wird dem Tryptophan von Lui et al. in „Fluorescence and Time-Resolved Light Scattering as Optical Diagnostic Techniques to Separate Diseased and Normal Biomedical Media“, J Photochem Photobiol B: Biol, 16, 187–209, 1992 und den Nukleinsäuren zugeordnet. Es wird ein Anstieg der Intensität dieses Wellenkanals bei den SILs bezogen auf die anderen Gewebe beobachtet. Dies wird mit dem gestiegenen zellulärem Kernanteilen im Kolon in Verbindung gebracht. Die Linien bei 1401 und 1454 cm^{-1} ergeben sich aus den symmetrischen und asymmetrischen CH_3 -Biegemodi der Proteine (Methylgruppe). Die Linie bei 1454 cm^{-1} grenzt schwere von leichten SILs mit einer Genauigkeit von 91% ab. Diese Linien wurden von Lui et al. in „Fluorescence and Time-Resolved Light Scattering as Optical Diagnostic Techniques to Separate Diseased and Normal Biomedical Media“, J Photochem Photobiol B: Biol, 16, 187–209, 1992 mit dem Elastin und dem Kollagen in Verbindung gebracht.

[0101] Durch das Analysieren der diagnostischen Informationen aus den Raman-Spektren der Gewebe in einer paarigen Weise können SILs von allen anderen Geweben bei verschiedenen Scheitelpunkten mit einer durchschnittlichen Empfindlichkeit von 88% ($\pm 6\%$) und einer Genauigkeit von 92% ($\pm 7\%$) abgegrenzt werden. Die höchste Empfindlichkeit wird mit 91% in den Wellenkanälen bei 626 und 1656 cm^{-1} erreicht. Die höchste Genauigkeit wird mit 100% unter Verwendung einer Kombination der Wellenkanäle bei 1070 und 626 cm^{-1} erreicht. Bei der Angrenzung von SILs von normalem Gewebe sind die Empfindlichkeit und die Genauigkeit des Raman-Verfahrens für die 36 Proben höher als jene der Verfahren, die auf Fluoreszenz basieren, sie sind jedoch ähnlich, wenn sie mit den Fluoreszenz-Resultaten aus der größeren Probenstudie verglichen werden. Entzündungs- und Metaplasia-Proben können von SILs durch den Einsatz des Raman-Wellenkanals bei 1070

cm^{-1} und bei 1656 cm^{-1} getrennt werden. Die Raman-Spektren haben sich bei der Abgrenzung von schweren SILs und leichten SILs mit einer durchschnittlichen Empfindlichkeit von $86\% (\pm 4\%)$ bewährt. Die Empfindlichkeit ist besser, wenn sie mit den Diagnosen der gleichen 36 Proben, die auf Fluoreszenz basieren, sowie mit der breiteren Probengesamtheit verglichen werden. Die Erfindung passt auch die Schwankungen von Patientin zu Patientin in den Intensitäten der Raman-Linien durch den Einsatz der paarigen Analyse wie oben vorgestellt an. Weiterhin kann eine nicht-paarige Abgrenzung erfolgen, indem die Scheitelpunkte bei 1325 , 1454 und 1656 cm^{-1} mit einer vergleichbaren Empfindlichkeit verwendet werden.

[0102] Für die nicht-paarige Abgrenzung unterscheidet der Quotient der Intensitäten bei 1656 und 1325 cm^{-1} die SILs von allen anderen Geweben mit einer Empfindlichkeit und einer Genauigkeit von 82% bzw. 80% ([Fig. 20](#)). Zusätzlich kann der Quotient der Intensitäten bei 1656 und 1454 cm^{-1} in einer nicht-paarigen Weise verwendet werden, die schweren SILs von den leichten SILs mit einer Empfindlichkeit und einer Genauigkeit von 100% und 100% abzugrenzen ([Fig. 21](#)).

[0103] Ferner enthält jeder der spezifizierten Scheitelpunkte des Raman-Spektrums, wie oben erwähnt, einige diagnostische Informationen zur Gewebeunterscheidung. Multivariate Verfahren, die ähnlich wie das oben beschriebene Aufbereiten der Fluoreszenzspektren die Hauptkomponenten-Analyse und das Bayes-Theorem anwenden, würden Informationen von allen Scheitelpunkten des Raman-Spektrums nutzen und würden daher die diagnostische Leistung der Raman-Signale verbessern. Die hier vorgestellten Verfahren, die Raman-Signale nutzen, sind für den Datenbestand der 36 Proben optimiert worden und bieten daher eine voreingenommene Einschätzung ihrer Effizienz. Eine wirkliche Einschätzung der diagnostischen Leistungsfähigkeit der Raman-Spektroskopie würde eine vorurteilslose Bewertung der Leistung des Verfahrens, die für die kleine Anzahl an Proben unter Anwendung von Methoden der Kreuzvalidierung oder anderen Arten von Bewertungsmethoden gewonnen werden könnte, erfordern.

[0104] Die vorliegende Erfindung verwertet verschiedene mögliche Vorteile der Raman-Spektroskopie gegenüber der Fluoreszenz. Die Raman-Diagnoseverfahren, die in der Erfindung genutzt werden, wiederholen die Einfachheit der Raman-Spektroskopie für die Diagnose und deuten das Potenzial der verbesserten diagnostischen Einsatzmöglichkeiten bei Anwendung dieser Methode an.

[0105] [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#), [Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#) stellen Flussdiagramme des oben beschriebenen diagnostischen Raman-Spektroskopie-Verfahrens dar. In der Praxis liegen die Flussdiagramme aus den [Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#), [Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#) in geeigneter Form kodiert vor und werden in den Programmspeicher des Computers **211** ([Fig. 2](#)) geladen, der dann die Vorrichtung aus [Fig. 2](#) steuert, um die Ausführung des diagnostischen Raman-Spektroskopie-Verfahrens der vorliegenden Erfindung auszulösen.

[0106] Mit dem Bezug zunächst auf [Fig. 4A](#) wird das NIR-Raman-Spektrum, nachdem das Verfahren gestartet ist, in Schritt **400** aus der Gebärmutterhals-Gewebeprobe unbekannter Diagnose erfasst. Dann wird in Schritt **401** das erfasste Spektrum als eine Funktion des Rhodamin-Kalibrierprozesses korrigiert. Dann wird in Block **402** das Spektrum mit einer Gauß-G, die eine Halbwertsbreite von 11 Impulsen aufweist, gefaltet und auf diese Weise wird ein rauschkorrigiertes Spektrum R ausgegeben. In Schritt **403** wird die Breitband-Basislinie des rauschkorrigierten Spektrums in ein Polynom L eingesetzt, und das Polynom wird vom Spektrum subtrahiert, um das Raman-Signal für die betrachtete Probe auszugeben.

[0107] Die Steuerung geht weiter zu Schritt **404**, in dem die maximalen Intensitäten bei 626 , 818 , 978 , 1070 , 1175 , 1246 , 1325 , 1454 und 1656 Impulsen (in Einheiten von cm^{-1}) vermerkt werden. Ebenso werden in Block **404** die maximalen Intensitäten bei fünf ausgewählten Impulsen gespeichert. Diese umfassen:

- $P_1 = \text{Intensität bei } 626 \text{ cm}^{-1}$
- $P_2 = \text{Intensität bei } 1070 \text{ cm}^{-1}$
- $P_3 = \text{Intensität bei } 1325 \text{ cm}^{-1}$
- $P_4 = \text{Intensität bei } 1454 \text{ cm}^{-1}$
- $P_5 = \text{Intensität bei } 1656 \text{ cm}^{-1}$

[0108] Die Steuerung geht dann weiter zu Block **405**, in dem die gespeicherten Intensitäten analysiert werden, um die Gewebeprobe zu diagnostizieren. Die Analyse wird weiter unten detaillierter mit Bezug auf die [Fig. 4B](#), [Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#) vorgestellt.

[0109] Mit Bezug auf die [Fig. 4B](#) ermittelt der Entscheidungsblock **406**, ob eine paarige Analyse gewünscht wird, und wenn dies der Fall ist, geht die Steuerung weiter zu Block **407**, in dem das paarige Diagnoseverfahren durchgeführt wird. Dies wird weiter unten detaillierter mit Bezug auf die [Fig. 4C](#) vorgestellt.

[0110] Die Steuerung geht dann weiter zu Entscheidungsblock **408**, in dem ermittelt wird, ob eine nicht-paarige Analyse gewünscht wird. Wenn dies der Fall ist, geht die Steuerung weiter zu Block **409**, in dem das nicht-paarige Diagnoseverfahren durchgeführt wird.

[0111] Mit Bezug auf das paarige Diagnoseverfahren können unter Bezugnahme auf die [Fig. 4C](#) drei parallele Analysen, eine in Bezug auf die Intensität P_1 , eine in Bezug auf die Intensität P_2 und eine in Bezug auf die Intensität P_5 durchgeführt werden. Für die Intensität P_1 beginnt die Steuerung in Block **411**, in dem die Größe N_1 gleich der Intensität bei dem ausgewählten Impuls für eine normale Gewebeprobe der betrachteten Patientin gesetzt wird. Die Steuerung geht dann weiter zu Block **412**, in dem der Quotient zwischen der gemessenen Intensität P_1 und der normalen Intensität N_1 berechnet wird. In Block **413** wird der Quotient mit einem Schwellenwert von 1 verglichen. Wenn der Quotient größer als oder gleich 1 ist, lautet die Diagnose auf nicht SIL (Schritt **414**), wohingegen die Diagnose auf SIL lautet, wenn der Quotient kleiner als 1 ist (Schritt **416**).

[0112] Eine ähnliche Analyse wird in Bezug auf die Intensitäten P_2 und P_5 durchgeführt. Im Einzelnen beginnt für die Intensität P_2 die Steuerung in Block **417**, in dem die Größe N_2 gleich der Intensität bei dem ausgewählten Impuls für eine normale Gewebeprobe der betrachteten Patientin gesetzt wird. Die Steuerung geht dann weiter zu Block **418**, in dem der Quotient zwischen der gemessenen Intensität P_2 und der normalen Intensität N_2 berechnet wird. In Block **419** wird der Quotient mit einem Schwellenwert von 1 verglichen. Wenn der Quotient größer als oder gleich 1 ist, lautet die Diagnose auf nicht SIL (Schritt **421**), wohingegen die Diagnose auf SIL lautet, wenn der Quotient kleiner als 1 ist (Schritt **422**).

[0113] Für die Intensität P_5 beginnt die Steuerung in Block **423**, in dem die Größe N_5 gleich der Intensität bei dem ausgewählten Impuls für eine normale Gewebeprobe der betrachteten Patientin gesetzt wird. Die Steuerung geht dann weiter zu Block **424**, in dem der Quotient zwischen der gemessenen Intensität P_5 und der normalen Intensität N_5 berechnet wird. In Block **426** wird der Quotient mit einem Schwellenwert von 1 verglichen. Wenn der Quotient größer als oder gleich 1 ist, lautet die Diagnose auf nicht SIL (Schritt **427**), wohingegen die Diagnose auf SIL lautet, wenn der Quotient kleiner als 1 ist (Schritt **428**).

[0114] Wenn in Schritt **428** auf SIL geschlossen wurde, geht die Steuerung weiter zum Entscheidungsblock **429**, in dem der in Block **424** errechnete Quotient mit dem Schwellenwert von 0,75 verglichen wird. Wenn der Quotient größer als oder gleich 0,75 ist, lautet die Diagnose auf leichte SIL (Schritt **431**), wohingegen die Diagnose auf schwere SIL lautet, wenn der Quotient kleiner als 0,75 ist (Schritt **432**).

[0115] Die nicht-paarige Analyse des NIR-Raman-Spektrums wird in [Fig. 4D](#) vorgestellt. Beginnend in Schritt **432** wird der Quotient r_1 aus der Intensität P_5 und der Intensität P_3 berechnet und der Quotient r_2 aus der Intensität P_5 und der Intensität P_4 berechnet. Die Steuerung geht dann weiter zu Entscheidungsblock **434**, in dem der Quotient r_1 mit einem Schwellenwert von 1,8 verglichen wird. Wenn der Quotient r_1 größer als oder gleich 1,8 ist, lautet die Diagnose für die Gewebeprobe auf nicht SIL (Schritt **436**), wohingegen die Diagnose für die Gewebeprobe auf SIL lautet, wenn der Quotient r_1 kleiner als 1,8 ist (Schritt **437**). Die Steuerung geht dann weiter zu Entscheidungsblock **438**, in dem der Quotient r_2 mit einem Schwellenwert von 2,6 verglichen wird. Wenn der Quotient r_2 größer als oder gleich 2,6 ist, lautet die Diagnose für die Gewebeprobe auf leichte SIL (Schritt **439**), wohingegen die Diagnose für die Gewebeprobe auf schwere SIL lautet, wenn der Quotient r_2 kleiner als 2,6 ist (Schritt **441**).

[0116] Es sollte besonders erwähnt werden, dass die verschiedenen Schwellenwerte, die in den Entscheidungsblöcken in [Fig. 4C](#), und [Fig. 4D](#) verwendet werden, angepasst werden können, ohne den Anwendungsbereich der Erfindung zu verlassen. Die dargestellten Schwellenwerte sind als eine Funktion der Lerndaten ausgewählt worden, und andere oder lückenlosere Lerndaten können zu unterschiedlichen Schwellenwerten führen.

3. Kombiniertes Verfahren aus Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie

[0117] Die vorliegende Erfindung betrachtet auch ein System, das nacheinander Fluoreszenz- und NIR-Raman-Spektren in vivo über eine optische Sonde wie etwa eine optische Glasfasersonde oder ein anderes optisches Kopplungssystem erfasst. Die optische Sonde ist mit ultravioletten oder sichtbaren Quellen elektromagnetischer Strahlung, um die Fluoreszenz anzuregen, und dann wahlweise an NIR-Quellen angekoppelt, um die Fluoreszenzfreien Raman-Spektren anzuregen. Die Fluoreszenz-Spektren können dazu verwendet werden, um die analytische Zurückweisung der Fluoreszenz aus den Raman-Spektren zu verbessern.

[0118] Die Vorrichtung, die für diesen Zweck verwendet wird, ist eine Kombination aus den Vorrichtungen, die

in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) offen gelegt wurden. Es wird ein dichroitischer Spiegel oder ein abklappbarer Spiegel eingesetzt, so dass jede elektromagnetische Strahlungsquelle wahlweise nacheinander an die optische Sonde angekoppelt wird. In ähnlicher Weise wird das durch die Sonde eingefangene Licht wahlweise an die geeigneten Detektoren zum Abtasten der Fluoreszenz- und der Raman-Spektren angekoppelt.

[0119] Bei der Analyse der Spektren für diagnostische Zwecke wird derzeit überlegt, dass auf die oben beschriebene Fähigkeit der Fluoreszenz zum Identifizieren von normalem Gewebe, leichten und schweren Läsionen, die oben beschriebene Anwendung von NIR-Raman-Spektren folgen soll, um die Entzündungen und Metaplasie zu identifizieren. Alternativ werden die über den Gewebetyp gesammelten Informationen der oben beschriebenen Fluoreszenz-Diagnose zufolge verwendet, um das Leistungsvermögen der Raman-Diagnose zu verbessern. Dies wird erreicht, indem die Fluoreszenz-Spektren zum Berechnen der A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit, dass das Gewebe normal ist, mit leichten oder schweren Läsionen belegt ist, verwendet werden. Danach wird diese Klassifikation als die A-Priori-Wahrscheinlichkeit in einem Bayes-Verfahren eingesetzt, das auf den Raman-Spektren basiert. In einer weiteren Ausführungsform werden die Informationen, die mittels der NIR-Raman-Spektroskopie gesammelt werden, zum Berechnen der A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit, dass das Gewebe Entzündungen oder Metaplasie aufweist, eingesetzt. Danach werden diese Informationen als die A-Priori-Wahrscheinlichkeit in einem Bayes-Verfahren eingesetzt, das auf den erfassten Fluoreszenz-Spektren basiert.

[0120] Obwohl die vorliegende Erfindung mit Bezug auf verschiedene beispielhafte bevorzugte Ausführungsformen beschrieben worden ist, ist es verständlich, dass Anpassungen, Zusätze und Streichungen an diesen bevorzugten Ausführungsformen gemacht werden können, ohne den Sinn und den Anwendungsbereich der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

APPENDIX I: Genauigkeit und Empfindlichkeit

[0121] Übersicht aus: Albert A., Harris E.K.: Multivariate Interpretation von klinischen Labordaten, Marcel Dekker Inc., New York, Seiten 75–82, (1987), deren Veröffentlichung an dieser Stelle ausdrücklich unter Bezugnahme eingegliedert ist.

[0122] Es wird angenommen, dass es eine Gruppe von T Proben, die als normal (N Proben) oder befallen (D Proben) klassifiziert sein können, gibt. Es wird ein diagnostischer Test für jede Probe durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Probe normal oder befallen ist. Die Ergebnisse der Tests bilden die stetige Variable x , die dann zum Bestimmen des Probenotyps verwendet wird. [Fig. 22](#) zeigt eine hypothetische Verteilung der Testwerte für jeden Probenotyp. Ein diagnostisches Verfahren, das auf diesem Test beruht, kann leicht definiert werden, indem ein Ausschlusspunkt d derart gewählt wird, dass eine Probe mit einem beobachteten Wert $x < d$ als normal diagnostiziert und eine Probe mit einem beobachteten Wert $x \geq d$ als abnormal diagnostiziert wird.

[0123] Verschiedene quantitative Maße sind definiert worden, um die Leistungsfähigkeit dieser Art von Verfahren zu „schätzen“. Die erste Art beurteilt den Test selbst (d.h. misst die Fähigkeit des Tests, die zwei Grundgesamtheiten N und D zu trennen). Die Empfindlichkeit und die Genauigkeit sind zwei solche Maße. Die zweite Art ist vorgesehen, bei der Interpretation eines bestimmten Testergebnisses zu helfen (d.h. bei der Entscheidung, ob die einzelne Testmessung aus einer normalen oder einer befallenen Probe stammt). Positive und negative Prognosewerte sind zwei Maße dieser Art.

[0124] Um diese Maße zu definieren, müssen einige Fachbegriffe und Anmerkungen eingebracht werden. Mit Bezug auf die Tabelle 6 kann eine Probe, die zu prüfen ist, entweder normal oder befallen sein; das Ergebnis des Tests für jede Art der Probe kann entweder negativ oder positiv sein. Echte negative stellen diese normalen mit einem positiven Testergebnis dar. In diesen Fällen ist die Diagnose auf Basis des Testergebnisses korrekt. Falsche positive stellen jene normalen Proben dar, die ein positives Testergebnis aufweisen, und falsche negative stellen jene befallenen Proben dar, die ein negatives Testergebnis aufweisen. In diesen Fällen ist die Diagnose auf Basis des Testergebnisses nicht korrekt.

Tabelle 6

	Normal	Befallen	Gesamte Proben
Test negativ ($x < d$)	Echte Negative (TN)	Falsche Negative (FN)	Negative (Neg)
Test positiv ($x \geq d$)	Falsche Positive (FP)	Echte Positive (TP)	Positive (Pos)
Gesamte Proben	N	D	T

[0125] Mit diesem Fachvokabular enthält die Tabelle 7 eine Definition der Empfindlichkeit und der Genauigkeit, der beiden Maße, die die Leistungsfähigkeit des diagnostischen Verfahrens beurteilen. Die Genauigkeit ist der Anteil der normalen Proben mit einem negativen Testergebnis (der Anteil der normalen Proben, die korrekt diagnostiziert werden). Die Empfindlichkeit ist der Anteil der befallenen Proben mit einem positiven Testergebnis (der Anteil der befallenen Proben, die korrekt diagnostiziert werden). [Fig. 22](#) enthält auch eine grafische Darstellung der Genauigkeit und der Empfindlichkeit. Die Genauigkeit stellt die Fläche unter der Verteilungskurve der normalen Proben links vom Ausschlusspunkt dar, während die Empfindlichkeit die Fläche unter der Verteilungskurve der befallenen Proben rechts vom Ausschlusspunkt darstellt.

Tabelle 7

Testmaß	Bedeutung	Berechnung
Genauigkeit	Anteil der normalen Proben mit negativem Testergebnis	$Sp = TN/N$
Empfindlichkeit	Anteil der befallenen Proben mit positivem Testergebnis	$Se = TP/D$

[0126] Während die Empfindlichkeit und die Genauigkeit die Leistungsfähigkeit eines bestimmten Verfahrens charakterisieren, ist ein anderer Satz von Statistiken erforderlich, um das Ergebnis des Labortests für eine bestimmte Einzelprobe zu interpretieren. Der positive und der negative Prognosewert quantifizieren die Bedeutung eines einzelnen Testergebnisses (Tabelle 8). Der positive Prognosewert ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Testergebnis positiv ist, die Probe also befallen ist. Der negative Prognosewert ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Testergebnis negativ ist, die Probe also normal ist. Der positive und der negative Prognosewert werden nach der Bayes-Regel berechnet, wie es bei Albert und Harris umrissen wurde. Die Tabelle 8 enthält zwei gleichwertige Formeln für die Berechnung des positiven und des negativen Prognosewerts.

Tabelle 8

Maß	Bedeutung	Berechnung 1	Berechnung 2
Positiver Prognosewert	Die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe befallen ist, wenn der Test positiv ist	$PV_+ = TP/Pos$	$PV_+ = DSe/(DSe + N(1 - Sp))$
Negativer Prognosewert	Die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe normal ist, wenn der Test negativ ist	$PV_- = TN/Neg$	$PV_- = NSp/(NSp + D(1 - Se))$

APPENDIX II: Hauptkomponenten

Bei 337 nm Anregung		Bei 460 nm Anregung		Bei 380 nm Anregung		Bei 460 nm Anregung	
337 nm excitation		460 nm excitation		380 nm excitation		460 nm excitation	
E1	E2	E1	E2	E2	E5	E4	E7
0.12	0.11	-0.147	-0.275	-0.615	0.532	0.69	0.10
0.17	0.12	-0.093	-0.319	-0.464	0.151	0.09	-0.07
0.22	0.12	-0.074	-0.360	-0.378	-0.1	-0.14	-0.17
0.25	0.11	-0.056	-0.345	-0.317	-0.308	-0.23	-0.07
0.27	0.1	-0.027	-0.314	-0.236	-0.373	-0.24	0.06
0.28	0.11	-0.004	-0.253	-0.157	-0.348	-0.23	0.04
0.28	0.12	0.010	-0.193	-0.086	-0.236	-0.19	0.01
0.28	0.12	0.024	-0.121	-0.04	-0.161	-0.15	0.00
0.28	0.11	0.029	-0.048	-0.004	-0.071	-0.09	-0.05
0.26	0.11	0.016	0.030	0.025	-0.055	-0.01	-0.07
0.24	0.11	-0.001	0.097	0.044	0.013	0.06	-0.07
0.22	0.11	-0.026	0.153	0.06	0.068	0.12	0.24
0.2	0.09	-0.052	0.201	0.06	0.108	0.14	0.40
0.17	0.08	-0.025	0.203	0.055	0.123	0.16	0.30
0.13	0.05	0.019	0.192	0.046	0.159	0.16	0.04
0.09	0.04	0.062	0.160	0.023	0.133	0.16	-0.12
0.06	0.04	0.090	0.153	0.006	0.15	0.14	-0.18
0.02	0.05	0.091	0.153	-0.014	0.089	0.14	-0.14
-0.01	0.05	0.088	0.164	-0.026	0.075	0.16	-0.24
-0.04	0.05	0.087	0.158	-0.044	0.047	0.17	-0.23
-0.06	0.05	0.106	0.146	-0.055	0.025	0.17	-0.16
-0.08	0.07	0.145	0.092	-0.063	-0.018	0.11	-0.12
-0.09	0.09	0.189	0.020	-0.071	-0.089	0.05	-0.18
-0.1	0.11	0.218	-0.023	-0.072	-0.102	0.01	-0.09

APPENDIX II: Hauptkomponenten (fortgesetzt)

Bei 337 nm Anregung		Bei 460 nm Anregung		Bei 380 nm Anregung		Bei 460 nm Anregung	
337 nm excitation		460 nm excitation		380 nm excitation		460 nm excitation	
E1	E2	E1	E2	E2	E5	E4	E7
-0.11	0.13	0.240	-0.054	-0.078	-0.104	-0.02	-0.11
-0.11	0.15	0.249	-0.060	-0.071	-0.078	-0.04	0.04
-0.12	0.17	0.242	-0.073	-0.071	-0.091	-0.03	-0.06
-0.12	0.18	0.238	-0.075	-0.066	-0.087	-0.02	0.08
-0.12	0.2	0.240	-0.064	-0.062	-0.095	-0.03	0.15
-0.11	0.2	0.230	-0.063	-0.06	-0.08	-0.03	0.18
-0.1	0.21	0.221	-0.061	-0.057	-0.067	-0.03	0.19
-0.09	0.22	0.211	-0.060	-0.048	-0.086	-0.02	0.25
-0.08	0.22	0.204	-0.052	-0.039	-0.068	-0.01	0.26
-0.07	0.21	0.199	-0.045	-0.031	-0.039	0.00	0.17
-0.07	0.21	0.185	-0.044	-0.027	-0.034	0.01	0.10
-0.07	0.2	0.181	-0.045	-0.019	-0.028	0.01	0.03
-0.06	0.2	0.176	-0.042	-0.019	-0.032	0.00	-0.02
-0.06	0.19	0.170	-0.037	-0.015	-0.01	0.00	-0.01
-0.06	0.18	0.167	-0.035	-0.008	-0.039	0.01	-0.12
-0.05	0.17	0.159	-0.030	-0.008	-0.037	0.03	-0.13
-0.05	0.16	0.158	-0.032	-0.01	-0.068	0.01	-0.21
-0.05	0.15	0.151	-0.027	-0.009	-0.085	0.01	0.00
-0.05	0.14	0.146	-0.027	-0.005	-0.095	0.00	-0.03
-0.05	0.13	0.137	-0.019	-0.01	-0.069	0.01	0.03
-0.05	0.12	0.128	-0.015	-0.007	-0.084	0.01	0.03
-0.05	0.11			-0.012	-0.034		
-0.05	0.1			-0.012	-0.036		
-0.04	0.11						

APPENDIX II: Hauptkomponenten (fortgesetzt)

Bei 337 nm Anregung		Bei 460 nm Anregung		Bei 380 nm Anregung		Bei 460 nm Anregung	
337 nm excitation		460 nm excitation		380 nm excitation		460 nm excitation	
E1	E2	E1	E2	E2	E5	E4	E7
-0.04	0.09						
-0.04	0.09						
-0.03	0.09						
-0.03	0.09						
-0.03	0.08						
-0.03	0.08						
-0.03	0.08						
-0.02	0.09						
-0.02	0.12						

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Erfassen und Qualifizieren von Gewebe-Abnormalität in einer Gewebeprobe, die umfasst:

eine steuerbare Beleuchtungsquelle (**100**) zum Emittieren einer Vielzahl von Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung, die so ausgewählt werden, dass sie die Gewebeprobe veranlassen, Fluoreszenz-Intensitätsspektren zu erzeugen, die Gewebe-Abnormalität anzeigen;

ein optisches System (**101, 106, 107**), das mit der Beleuchtungsquelle (**100**) verbunden ist, um die Vielzahl von Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung auf eine Gewebeprobe einwirken zu lassen;

eine Einrichtung (**114, 116, 117**) zum Erfassen eines Fluoreszenz-Intensitätsspektrums, die eine Intensität von Fluoreszenzspektren erfasst, die von der Gewebeprobe als Ergebnis von Beleuchtung mit der Vielzahl von Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung emittiert werden; und

eine Datenverarbeitungsvorrichtung (**119**), die mit der Erfassungseinrichtung verbunden ist,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Datenverarbeitungsvorrichtung (**119**) eine Einrichtung umfasst, die aus den erfassten Fluoreszenz-Intensitätsspektren eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe normal oder abnormal ist, wobei die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe normal oder abnormal ist, eine Einrichtung umfasst, die eine erste Hauptkomponentenanalyse einer ersten Teilgruppe der Fluoreszenz-Intensitätsspektren relativ zu Daten durchführt, die aus einer Vielzahl von Spektraldaten hergeleitet werden, die aus Gewebeproben bekannter Diagnose gewonnen werden; und

eine Einrichtung, die mit der ersten Hauptanalyseeinrichtung gekoppelt ist, um eine logistische Diskriminanzanalyse durchzuführen.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Datenverarbeitungsvorrichtung (**119**) des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die aus den erfassten Fluoreszenzspektren eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe von einem bestimmten Typ Abnormalität ist, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die Gewebeprobe normal oder abnormal ist, Abnormalität der Gewebeprobe anzeigt,

wobei die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe von einem bestimmten Typ Abnormalität ist, umfasst:

eine Einrichtung, die eine zweite Hauptkomponentenanalyse einer zweiten Teilgruppe der Fluoreszenz-Intensitätsspektren relativ zu Daten durchführt, die aus einer Vielzahl von Spektraldaten hergeleitet werden, die aus Gewebeproben bekannter Diagnose gewonnen werden; und

eine Einrichtung, die mit der zweiten Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung verbunden ist, um eine logistische Diskriminanzanalyse durchzuführen.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei:

die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe normal oder abnormal ist, des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die die Elemente der ersten Teilgruppe der Fluoreszenz-Intensitätsspektren relativ zu jeweiligen maximalen Intensitäten derselben normalisiert, bevor die erste Hauptkomponentenanalyse in der ersten Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung durchgeführt wird; und

die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe von einem bestimmten Typ Abnormalität ist, des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die die Elemente der zweiten Teilgruppe der Fluoreszenzspektren relativ zu jeweiligen maximalen Intensitäten derselben normalisiert, bevor die zweite Hauptkomponentenanalyse in der zweiten Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung durchgeführt wird.

4. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei:

die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe normal oder abnormal ist, des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die Mittelwertbereinigung der Elemente der ersten Teilgruppe der Fluoreszenz-Intensitätsspektren als eine Funktion einer mittleren Intensität derselben durchführt, bevor die erste Hauptkomponentenanalyse in der ersten Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung durchgeführt wird; und

die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe von einem bestimmten Typ Abnormalität ist, des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die Mittelwertbereinigung der Elemente der zweiten Teilgruppe der Fluoreszenzspektren als eine Funktion einer mittleren Intensität derselben durchführt, bevor die zweite Hauptkomponentenanalyse in der zweiten Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung durchgeführt wird.

5. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei

die gesteuerte Beleuchtungsquelle (**100**) einen gepulsten, mit Stickstofflaser gepumpten Farbstofflaser umfasst, der so betrieben wird, dass er Impulse einer ersten Wellenlänge mit einem Leistungspegel erzeugt, der die erste Teilgruppe der Fluoreszenz-Intensitätsspektren in normalen und abnormalen Geweben erregt, bzw. Impulse bei einer zweiten Wellenlänge mit einem Leistungspegel erzeugt, der die zweite Teilgruppe der Fluoreszenz-Intensitätsspektren erregt.

reszenz-Intensitätsspektren in Geweben mit anderen Typen von Abnormität erregt; und die Vorrichtung (**114**, **116**, **117**) zum Erfassen von Fluoreszenz-Intensitätsspektren einen Polychromator (**114**) umfasst, der mit einem intensivierten Diodenarray (**116**) gekoppelt ist, das von einem Mehrkanal-Analysator (**117**) jeweils synchronisiert zu der steuerbaren Beleuchtungsquelle (**100**) gesteuert wird.

6. Vorrichtung zum Erfassen und Klassifizieren von Gewebe-Abnormität einer Gewebeprobe, die umfasst: eine steuerbare Beleuchtungsquelle (**100**) zum Emittieren einer Vielzahl von Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung, die so ausgewählt werden, dass sie Gewebe veranlassen, Fluoreszenz-Intensitätsspektren zu produzieren, die Gewebe-Abnormität anzeigen; ein optisches System (**101**, **106**, **107**), das mit der Beleuchtungsquelle gekoppelt ist, um die Vielzahl von Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung auf die Gewebeprobe einwirken zu lassen; eine Einrichtung (**114**, **116**, **117**) zum Erfassen eines Fluoreszenz-Intensitätsspektrums, die eine Intensität von Fluoreszenzspektren ermittelt, die von der Gewebeprobe als Ergebnis von Beleuchtung mit der Vielzahl von Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung emittiert werden; und eine Datenverarbeitungsvorrichtung (**119**), die mit der Erfassungseinrichtung gekoppelt ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Datenverarbeitungsvorrichtung (**119**) eine Einrichtung umfasst, die aus den erfassten Fluoreszenz-Intensitätsspektren eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe einen bestimmten Typ von abnormalem Gewebe enthält, wobei die Einrichtung, die eine Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Gewebeprobe einen bestimmten Typ von abnormalem Gewebe enthält, umfasst: eine Einrichtung, die eine Hauptkomponentenanalyse der Fluoreszenz-Intensitätsspektren relativ zu Daten durchführt, die aus einer Vielzahl von Spektraldaten hergeleitet werden, die aus Gewebeproben bekannter Diagnose gewonnen werden; und eine Einrichtung, die mit der Einrichtung für Hauptkomponentenanalyse gekoppelt ist, um eine logistische Diskriminanzanalyse durchzuführen.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei die Wahrscheinlichkeits-Berechnungseinrichtung des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die die Fluoreszenz-Intensitätsspektren relativ zu jeweiligen maximalen Intensitäten derselben normalisiert, bevor die Hauptkomponentenanalyse in der Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung durchgeführt wird.

8. Vorrichtung nach Anspruch 6, wobei die Wahrscheinlichkeits-Berechnungseinrichtung des Weiteren eine Einrichtung umfasst, die Mittelwertbereinigung der Fluoreszenz-Intensitätsspektren als eine Funktion einer mittleren Intensität derselben durchführt, bevor die Hauptkomponentenanalyse in der Hauptkomponentenanalyse-Einrichtung durchgeführt wird.

9. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 6, wobei die steuerbare Beleuchtungsquelle (**100**) einen gepulsten, mit Stickstofflaser gepumpten Farbstofflaser umfasst, der so betrieben wird, dass er Impulse bei einer Wellenlänge mit einem Leistungspegel erzeugt, der Fluoreszenz-Intensitätsspektren in normalem und abnormalem Gewebe erregt.

10. Vorrichtung nach den Ansprüchen 1, 2 oder 6, die so eingerichtet ist, dass sie eine Gewebeprobe erfasst und qualifiziert, die eine Gebärmutterhals-Gewebeprobe ist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10, die so eingerichtet ist, dass sie die Gewebeprobe in vivo erfasst und qualifiziert.

12. Vorrichtung nach Anspruch 5, die so eingerichtet ist, dass sie eine Gewebeprobe erfasst und qualifiziert, die eine Gebärmutterhals-Gewebeprobe ist, wobei die erste Wellenlänge 337 nm beträgt und die zweite Wellenlänge 460 nm beträgt.

13. Verfahren zum Erfassen und/oder Quantifizieren von Gewebe-Abnormität in einer Gewebeprobe durch Identifizieren einer Gruppe orthogonaler Hauptkomponenten, um Scoring auf Basis einer Messung von Gewebe-Fluoreszenzintensitäten von einer Probe aus unbekanntem Gewebe durchzuführen und Wahrscheinlichkeitsverteilungen von Hauptkomponenten-Scores zu gewinnen, aus denen eine Wahrscheinlichkeit, dass das bekannte Gewebe von einem bestimmten Typ, d.h. entweder normal oder abnormal, oder von einem bestimmten histopathologischen Typ ist, berechnet werden kann, wobei es umfasst: Auswählen eines Training-Set, das eine Vielzahl von Subjekten mit einer Vielzahl von Gewebeproben bekannter Diagnose für Gewebe umfasst, das morphologisch dem unbekanntem Gewebe gleicht; Richten von elektromagnetischer Strahlung auf die Gewebestellen, die unterschiedliche Fluoreszenz-Intensi-

tätsamplituden innerhalb eines Bereiches von Wellenlängen in den Gewebetypen des Training-Set erregt;
 Messen von Fluoreszenz-Intensitäten, die aus dem Schritt des Einwirkens von elektromagnetischer Strahlung auf die Gewebeproben resultieren; und
 Einsetzen einer Datenverarbeitungsvorrichtung, um
 Vorverarbeitung der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten durchzuführen und bekannte sowie diagnostisch irrelevante Variationen daraus zu entfernen;
 Transformieren der vorverarbeiteten Messungen von Fluoreszenz-Intensitäten in eine Gruppe von Hauptkomponenten, die für signifikante Variationen zwischen den vorverarbeiteten Fluoreszenz-Intensitäten von den Gewebetypen verantwortlich sind;
 Begrenzen der Gruppe von Hauptkomponenten in diagnostisch nützlichen Hauptkomponenten gemäß der bekannten Verteilung von Gewebetypen;
 Berechnen von Scores für die begrenzte Gruppe von Hauptkomponenten; und
 Erzeugen von Wahrscheinlichkeitsverteilungen der berechneten Hauptkomponenten-Scores für jeden der Gewebetypen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei:

die einwirkende elektromagnetische Strahlung eine Wellenlänge von 337 nm hat;
 die Gewebemorphologie Gebärmutterhalsgewebe ist und die Gewebetypen normales Plattenepithel, normales Zylinderepithel, geringfügige Platten-Intraepithelial-Läsionen und starke Platten-Intraepithelial-Läsionen sind;
 und
 die Gruppe von Hauptkomponenten auf Hauptkomponenten begrenzt wird, die die statistisch signifikantesten Unterschiede zwischen normalen Plattenepithelen und geringfügigen sowie starken Platten-Intraepithelial-Läsionen zeigen.

15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei:

die einwirkende elektromagnetische Strahlung eine Wellenlänge von 380 nm hat;
 die Gewebemorphologie Gebärmutterhalsgewebe ist und die Gewebetypen normales Plattenepithel, normales Zylinderepithel, geringfügige Platten-Intraepithelial-Läsionen und starke Platten-Intraepithelial-Läsionen sind;
 und
 die Gruppe von Hauptkomponenten auf Hauptkomponenten begrenzt wird, die die statistisch signifikantesten Unterschiede zwischen normalen Zylinderepithelen und geringfügigen sowie starken Platten-Intraepithelial-Läsionen zeigen.

16. Verfahren nach Anspruch 13, wobei:

die einwirkende elektromagnetische Strahlung eine Wellenlänge von 460 nm hat;
 die Gewebemorphologie Gebärmutterhalsgewebe ist und die Gewebetypen normales Plattenepithel, normales Zylinderepithel, geringfügige Platten-Intraepithelial-Läsionen und starke Platten-Intraepithelial-Läsionen sind;
 und
 die Gruppe von Hauptkomponenten auf Hauptkomponenten begrenzt wird, die die statistisch signifikantesten Unterschiede zwischen geringfügigen Platten-Intraepithelial-Läsionen und starken Platten-Intraepithelial-Läsionen zeigen.

17. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Vorverarbeitungsschritt Normalisieren der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten für jede der Gewebestellen innerhalb des Bereiches von Wellenlängen zu einer Spitzenintensität von Eins umfasst.

18. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Vorverarbeitungsschritt umfasst:

Berechnen eines mittleren Spektrum für jedes Subjekt aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten für die Gewebestellen jedes Subjektes innerhalb des Bereiches von Wellenlängen dafür; und
 Subtrahieren des mittleren Spektrums für jedes Subjekt von den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten der Gewebestellen jedes Subjektes innerhalb des Bereiches von Wellenlängen dafür.

19. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Schritt des Transformierens umfasst:

Ausbilden einer Datenmatrix D aus den Fluoreszenz-Intensitäten;
 Berechnen einer mittelwertbereinigten Datenmatrix D_m aus Matrix D ;
 Berechnen einer Kovarianz-Matrix Z aus der Matrix D_m gemäß dem Ausdruck

$$Z = \frac{1}{r-1} (D_m D_m^T)$$

Berechnen einer Varianz V , für die die ersten n Eigenwerte verantwortlich sind, gemäß dem Ausdruck

$$V = 100 \left(\frac{\sum_{j=1}^n \lambda_j}{\sum_{j=1}^c \lambda_j} \right)$$

Beibehalten von Eigenwerten und entsprechenden Eigenvektoren in einer Matrix C, die für 99% der Varianz V verantwortlich sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Schritt des Transformierens des Weiteren umfasst: Berechnen von Bestandteil-Gewichtungen CL für jede der Hauptkomponenten gemäß dem Ausdruck

$$CL_y = \frac{c_y}{\sqrt{\lambda_j}} \sqrt{\lambda_j}$$

Eliminieren von Fluoreszenz-Intensitäten bei Wellenlängen innerhalb des Bereiches von Wellenlängen, die nicht am stärksten mit den Bestandteil-Gewichtungen korrelieren, vor dem Schritt des Begrenzens.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Schritt des Begrenzens umfasst: Berechnen einer Hauptkomponenten-Score-Matrix R gemäß dem Ausdruck

$$R = D \times C;$$

und

Berechnen eines diagnostischen Beitrags jeder Hauptkomponente aus der Matrix R unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten Student's-t-Test.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Schritt des Erzeugens von Wahrscheinlichkeitsverteilungen Modulieren der Wahrscheinlichkeitsverteilungen unter Verwendung einer Gamma-Funktion umfasst, die durch den Ausdruck

$$f(x; \alpha, \beta) = \frac{1}{\beta \cdot \Gamma(\alpha)} x^{\alpha-1} e^{-\frac{x}{\beta}}$$

definiert wird.

Es folgen 25 Blatt Zeichnungen

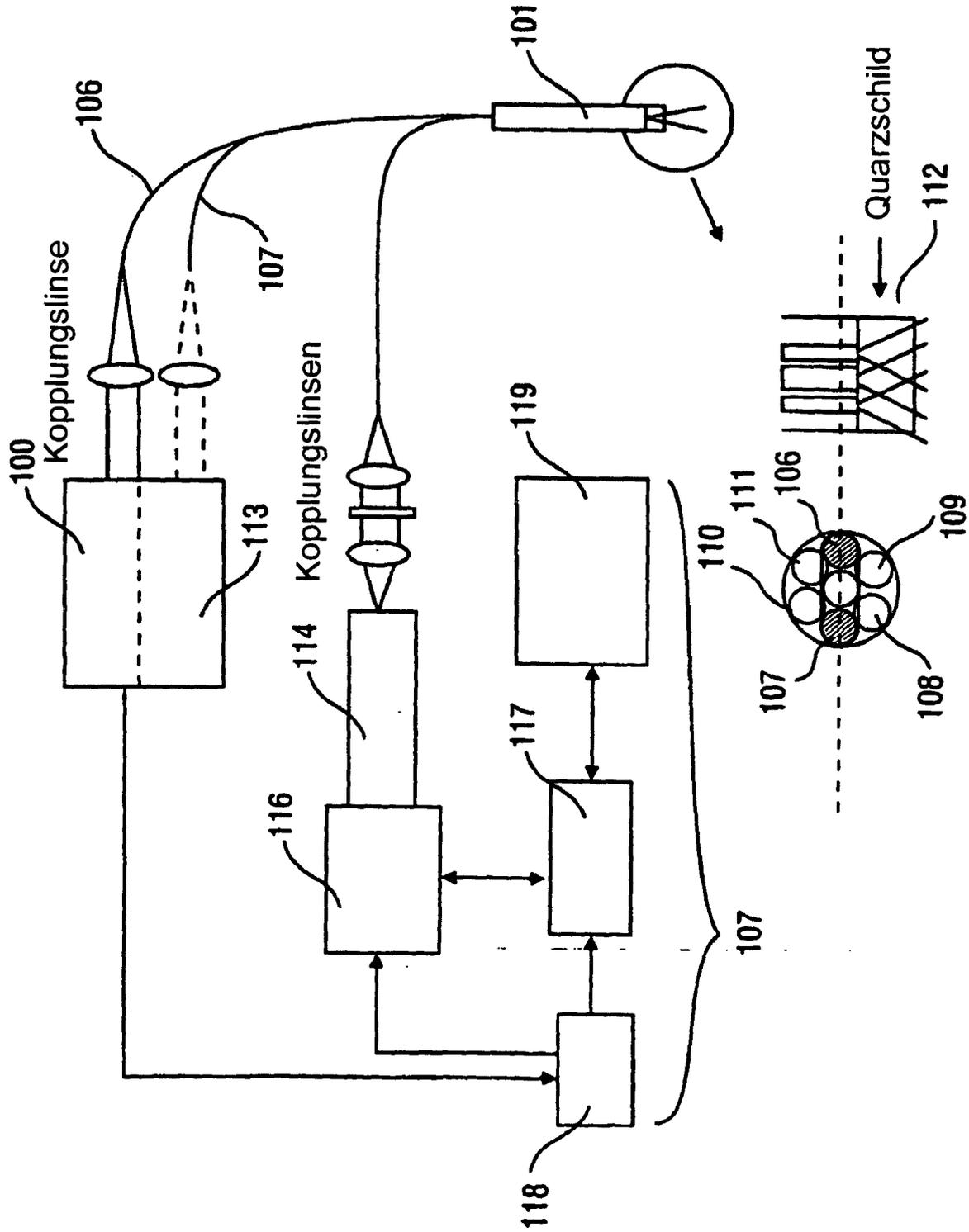


FIG. 1

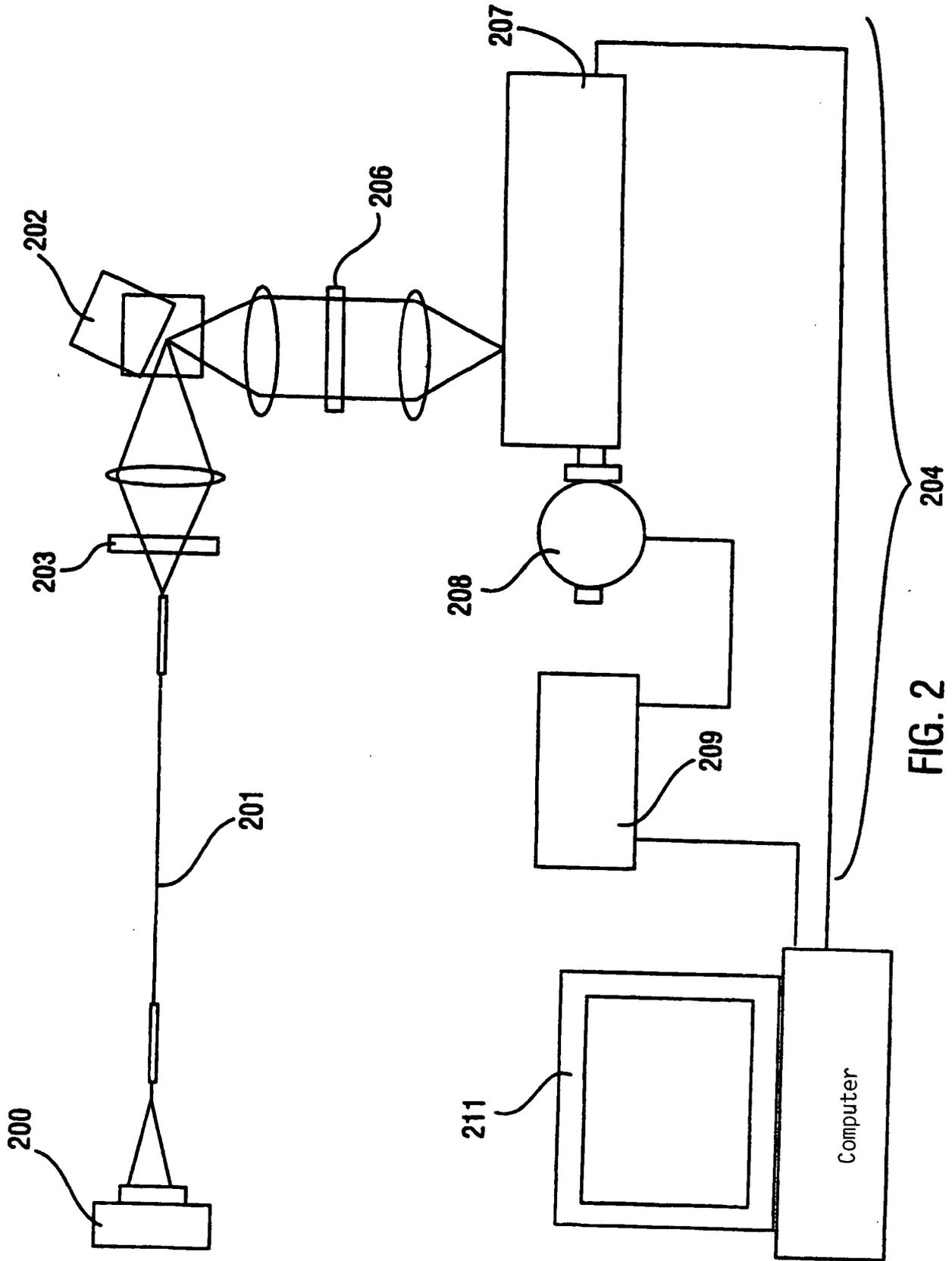


FIG. 2

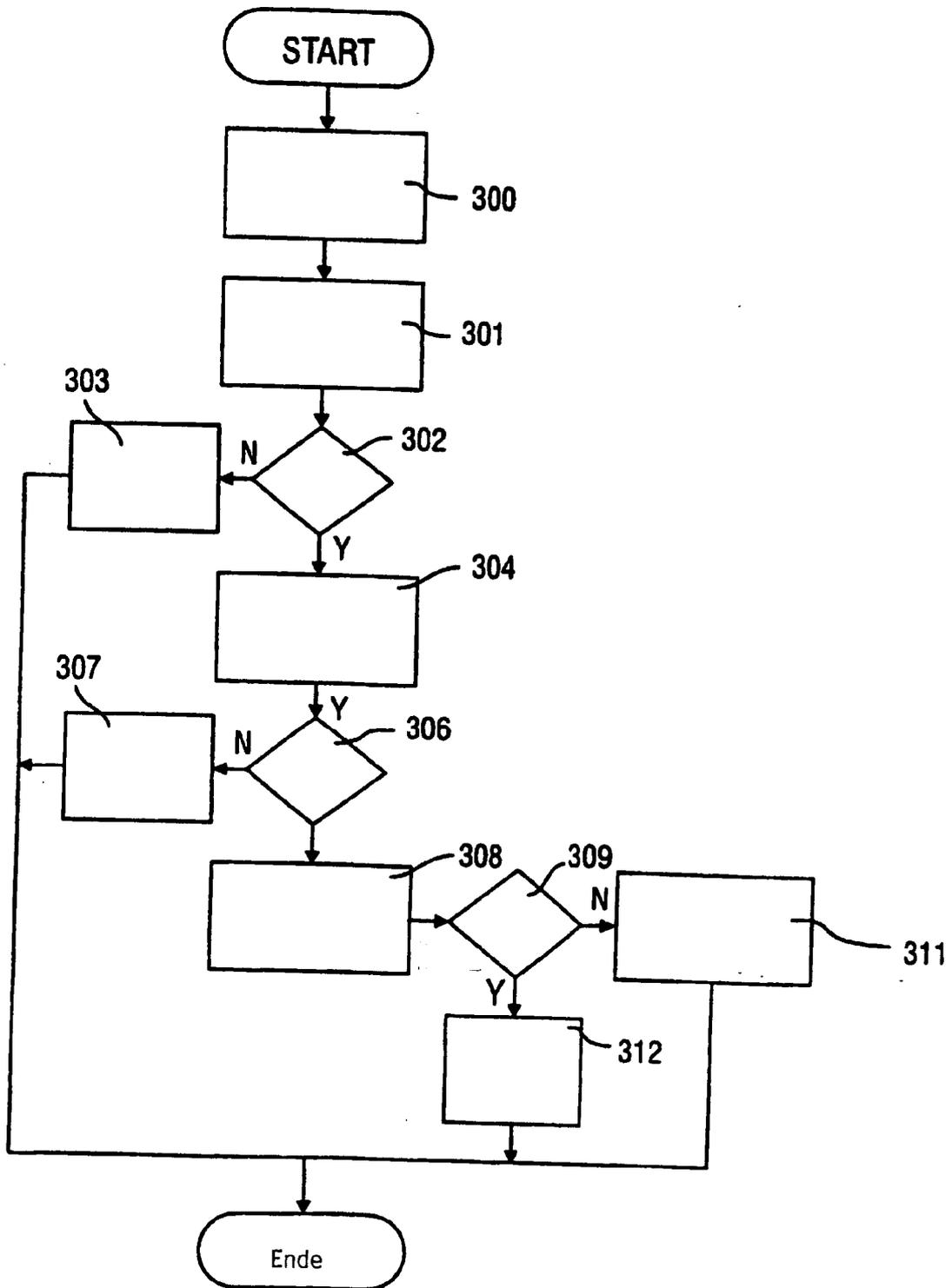


FIG. 3A

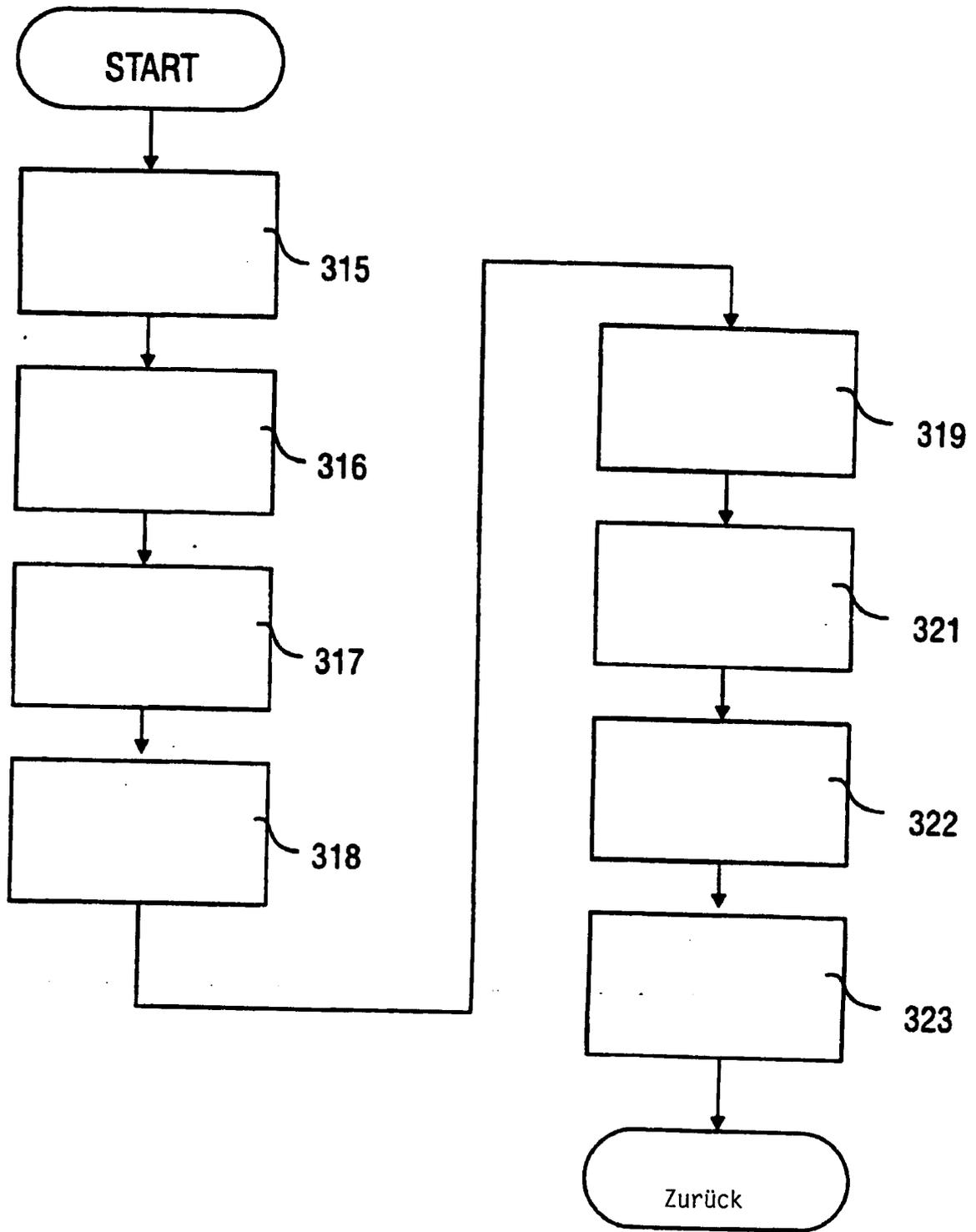


FIG. 3B

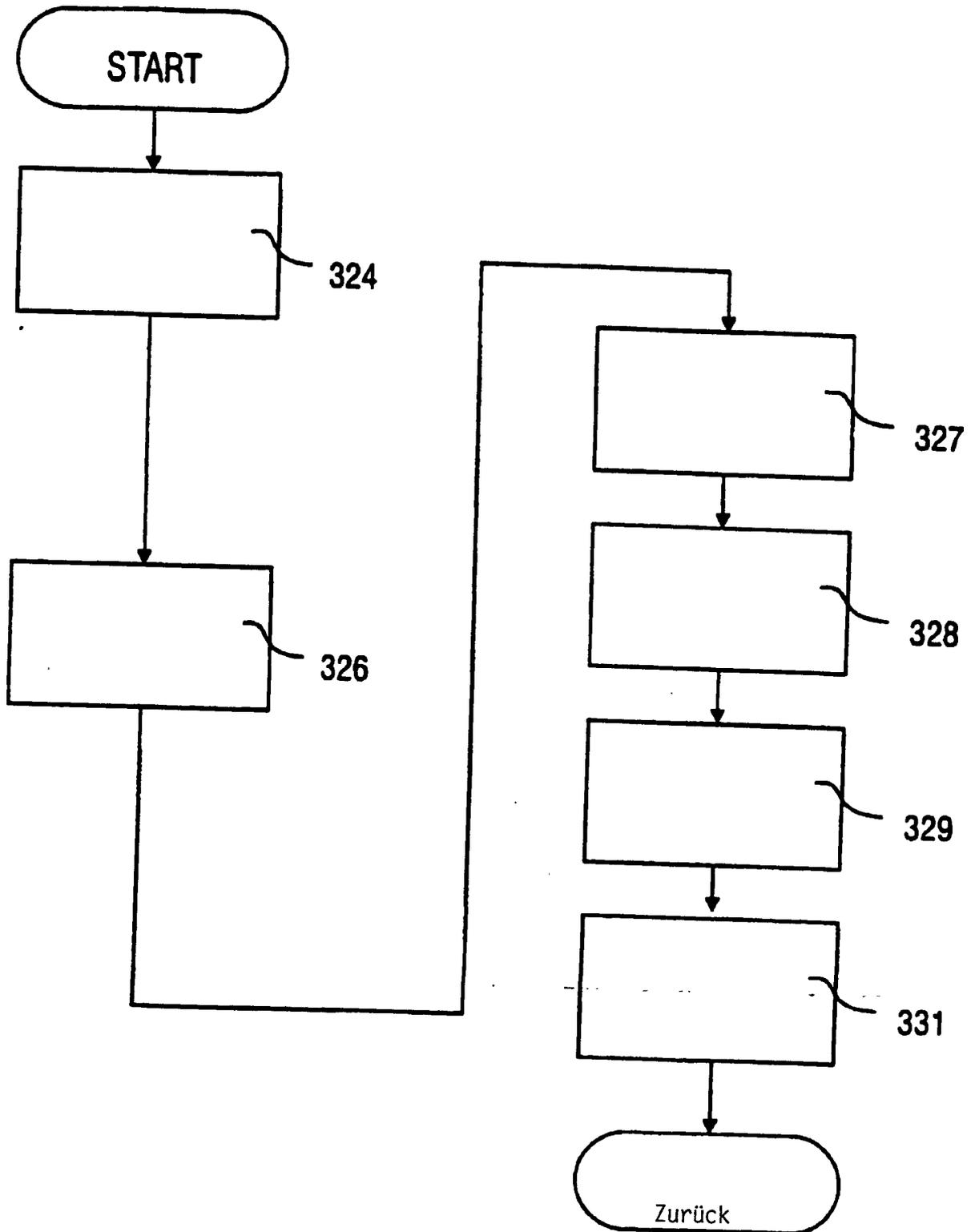


FIG. 3C

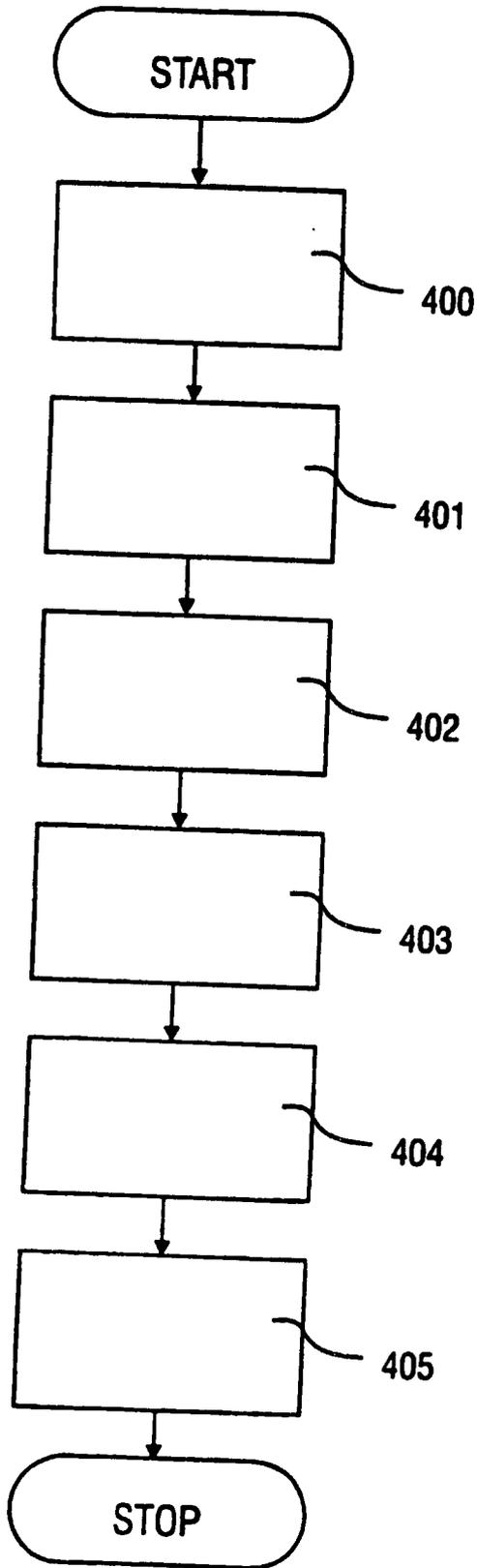


FIG. 4A

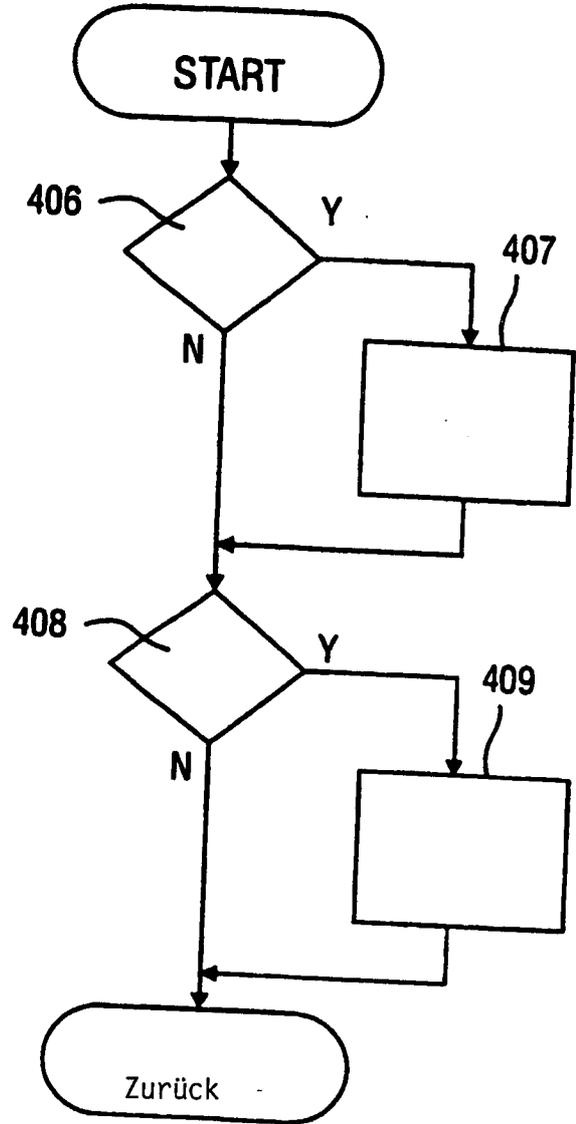


FIG. 4B

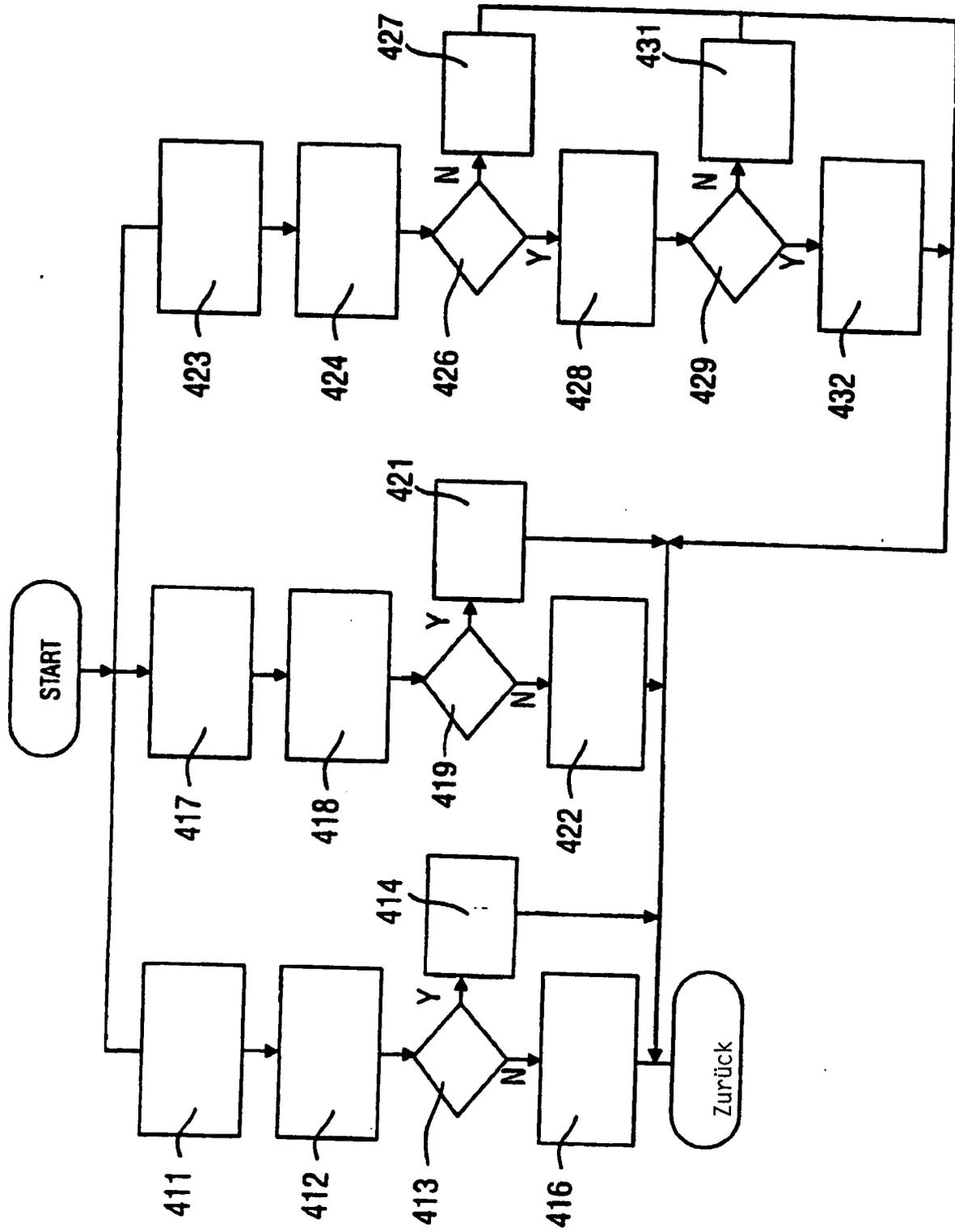


FIG. 4C

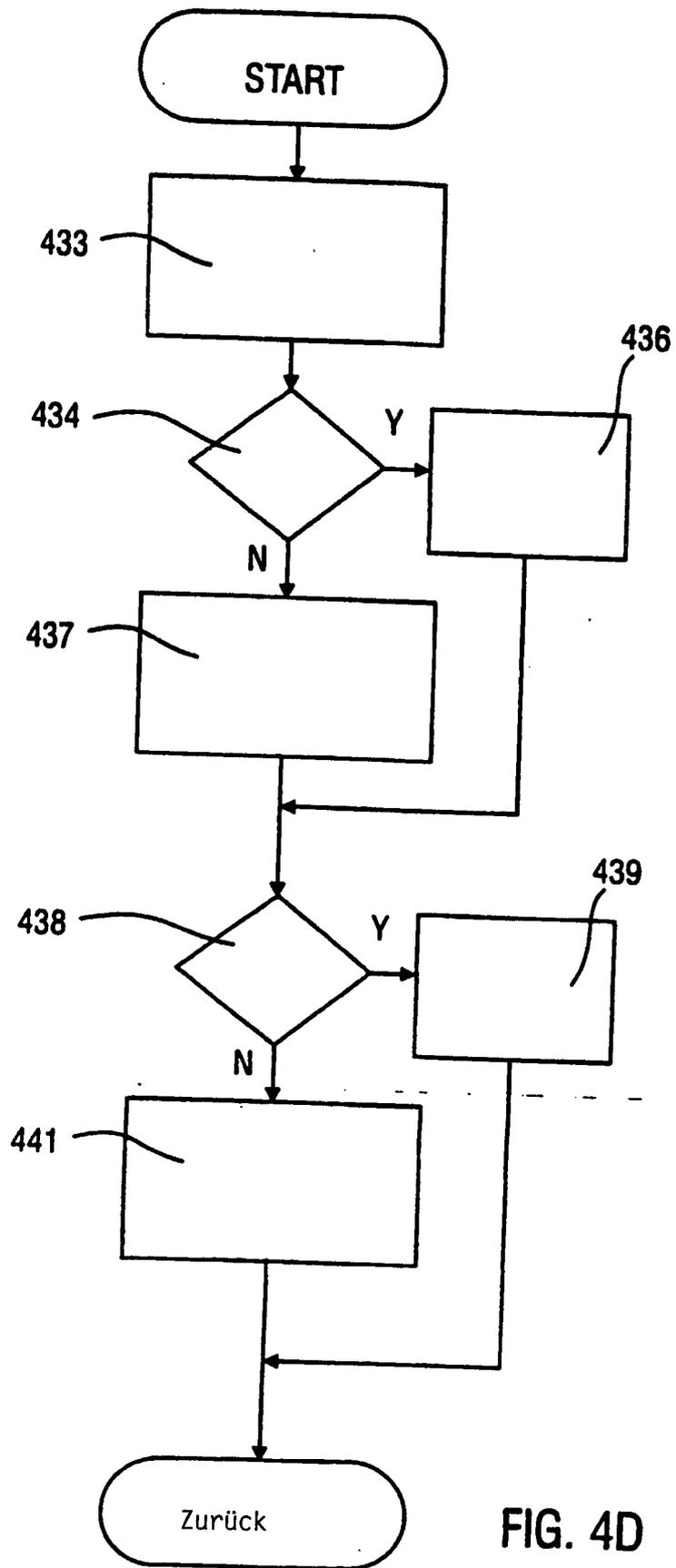


FIG. 4D



FIG. 5

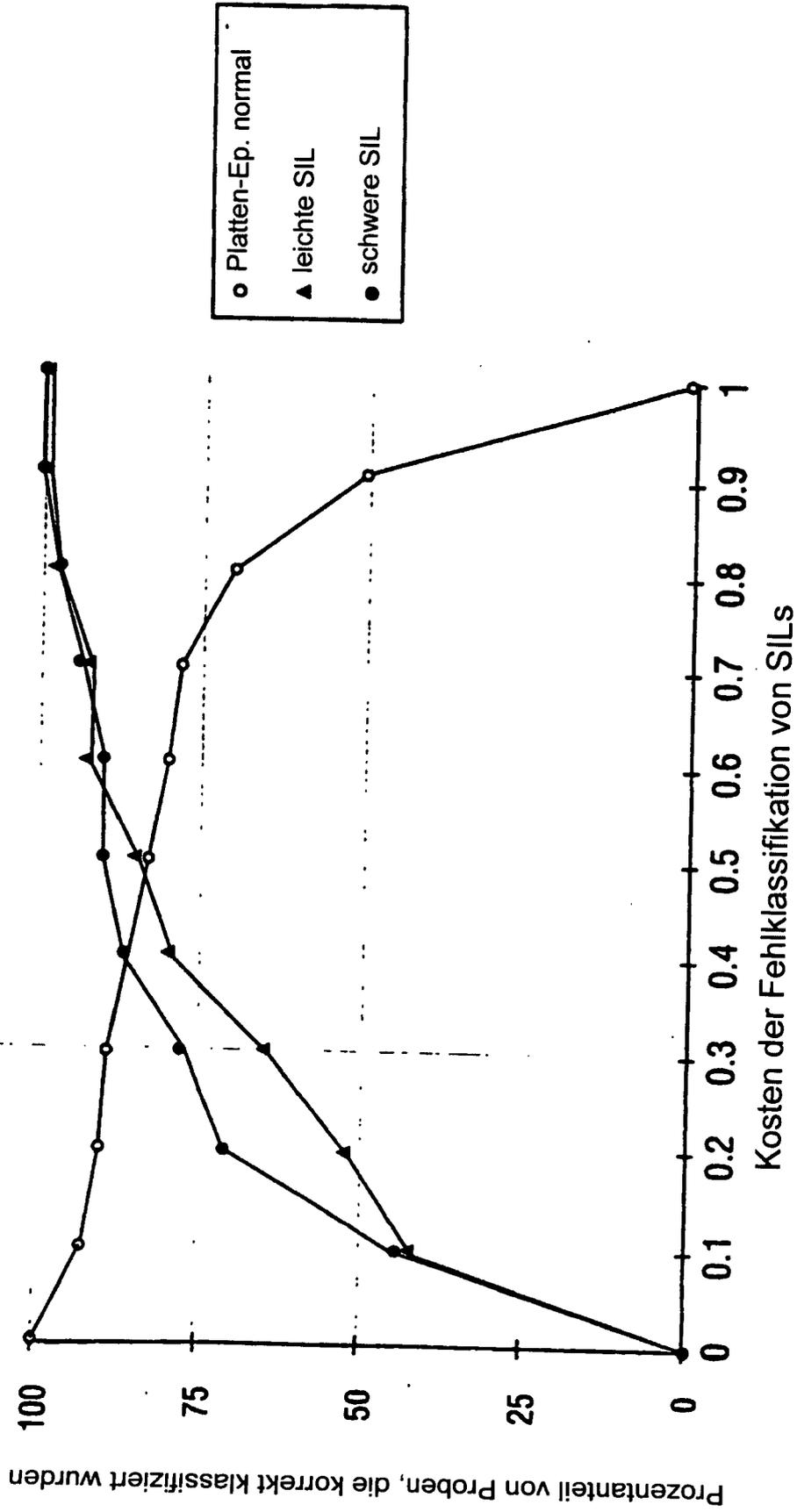


FIG. 6

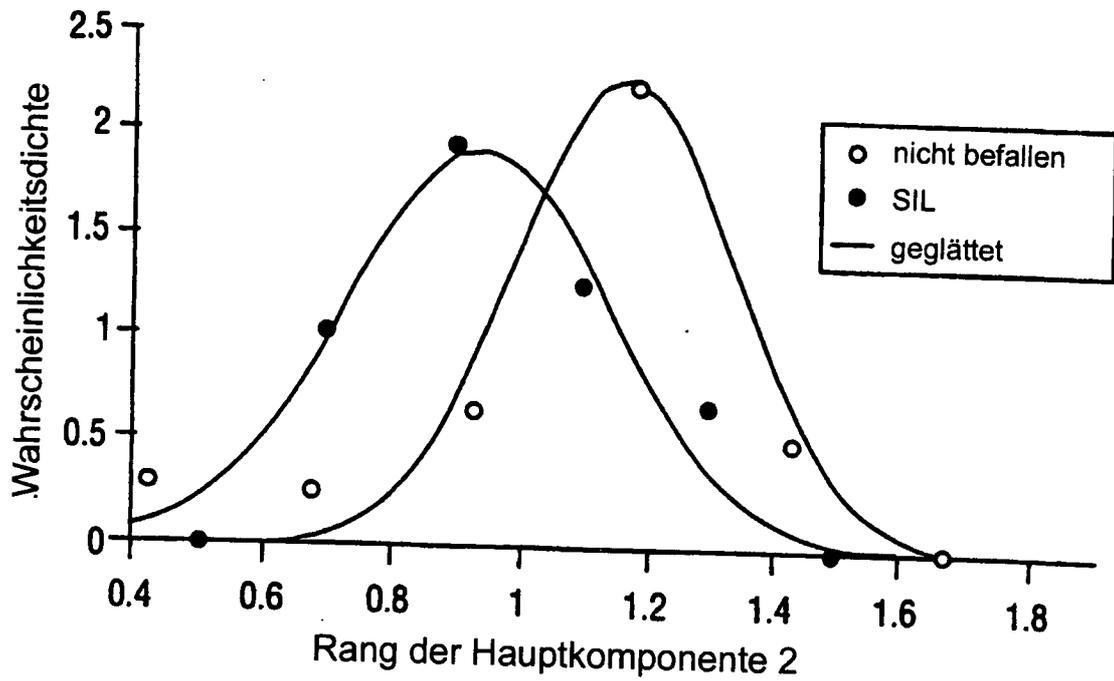


FIG. 7A

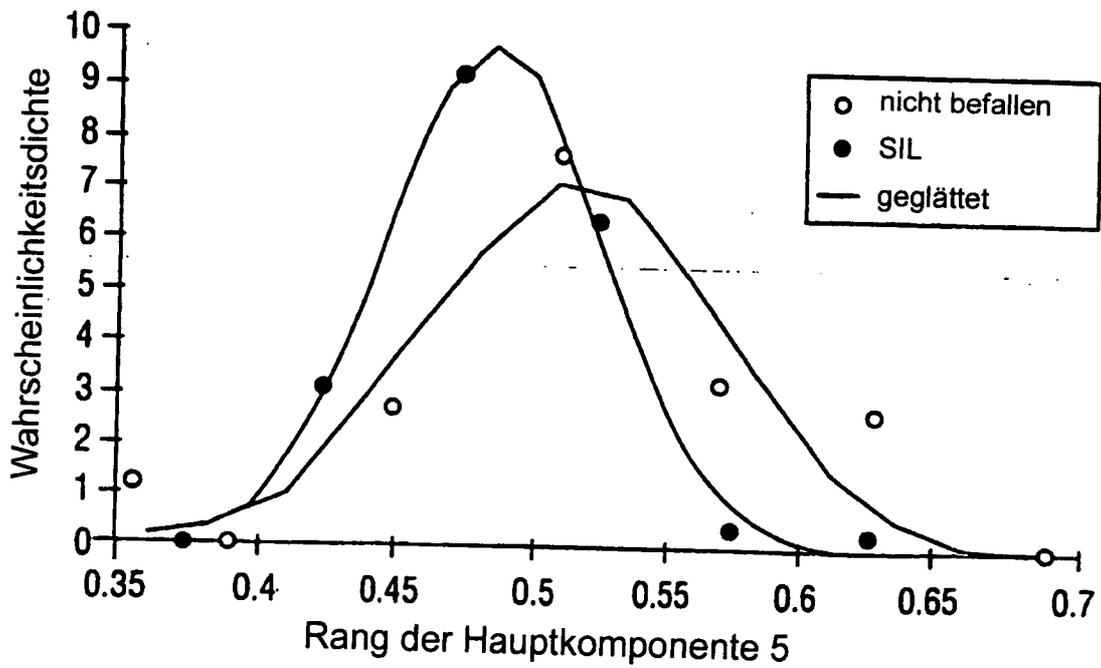


FIG. 7B

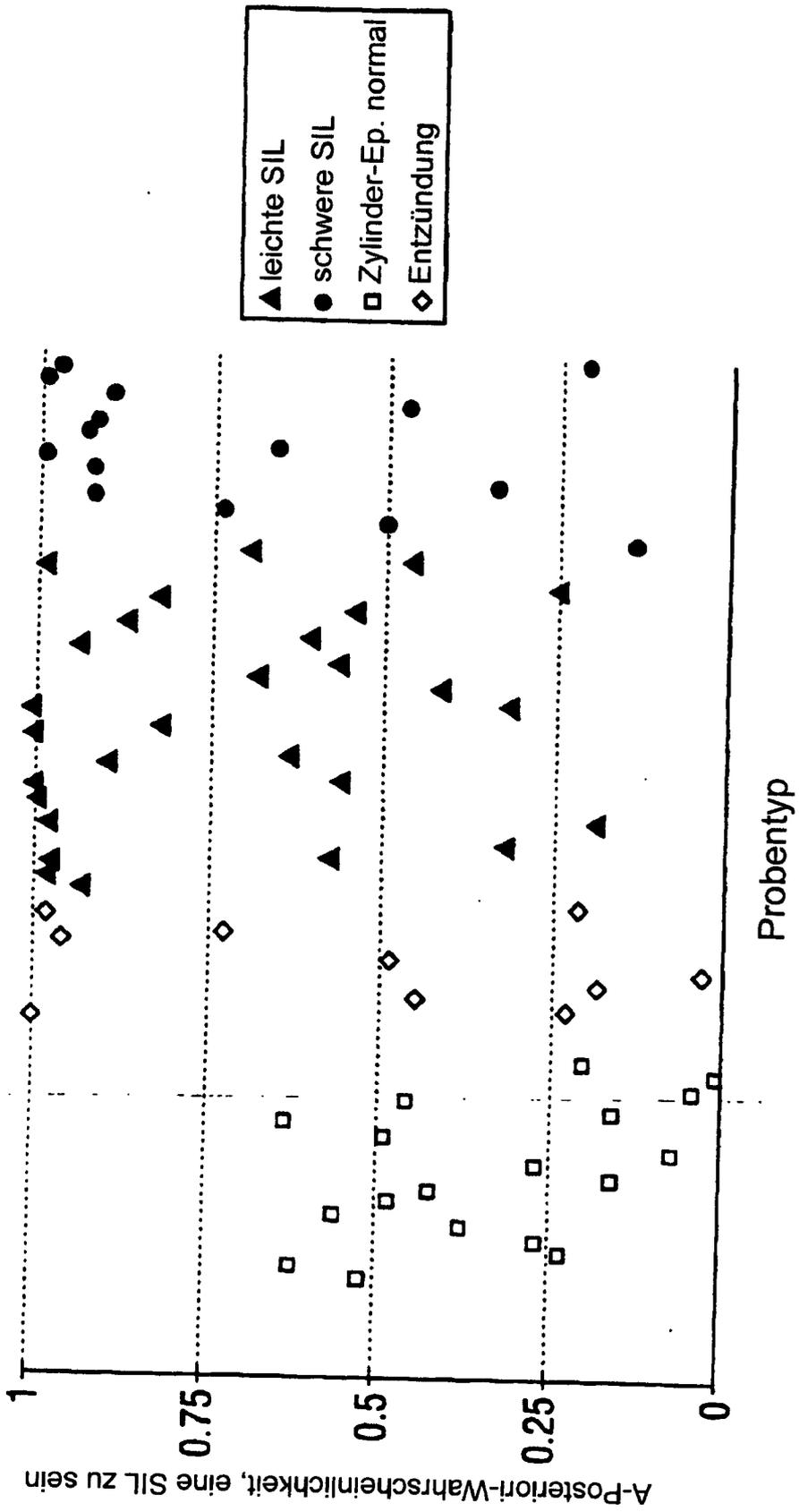


FIG. 8

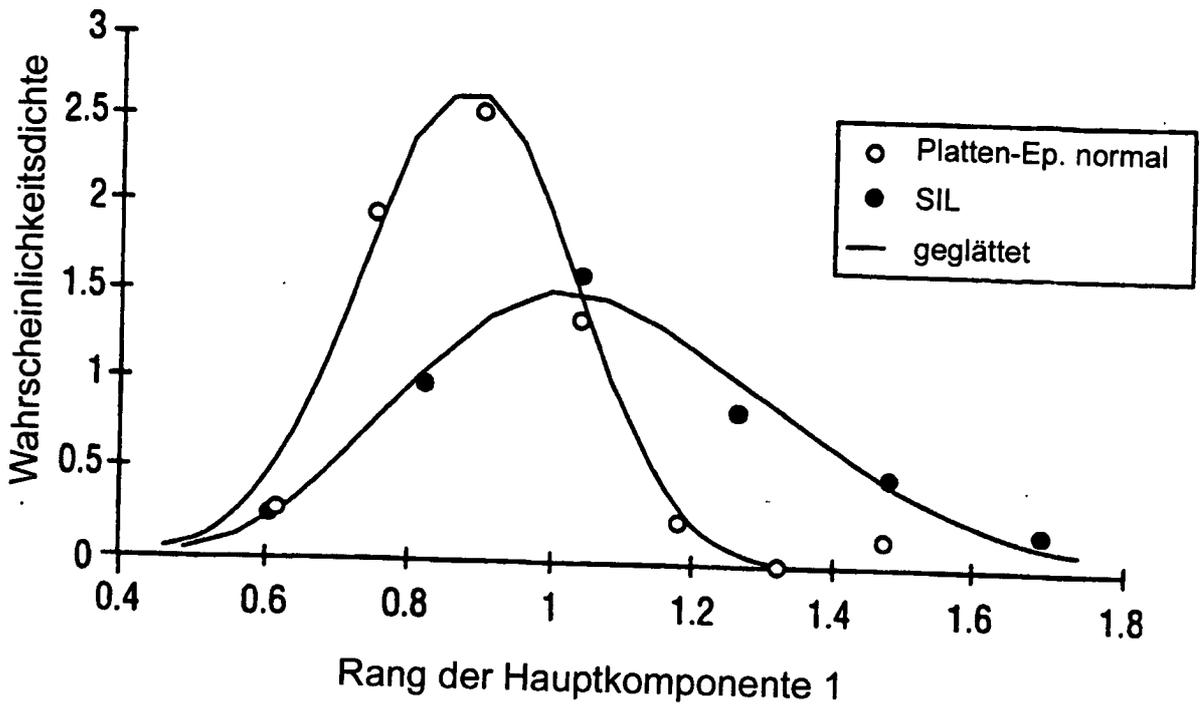


FIG. 9A

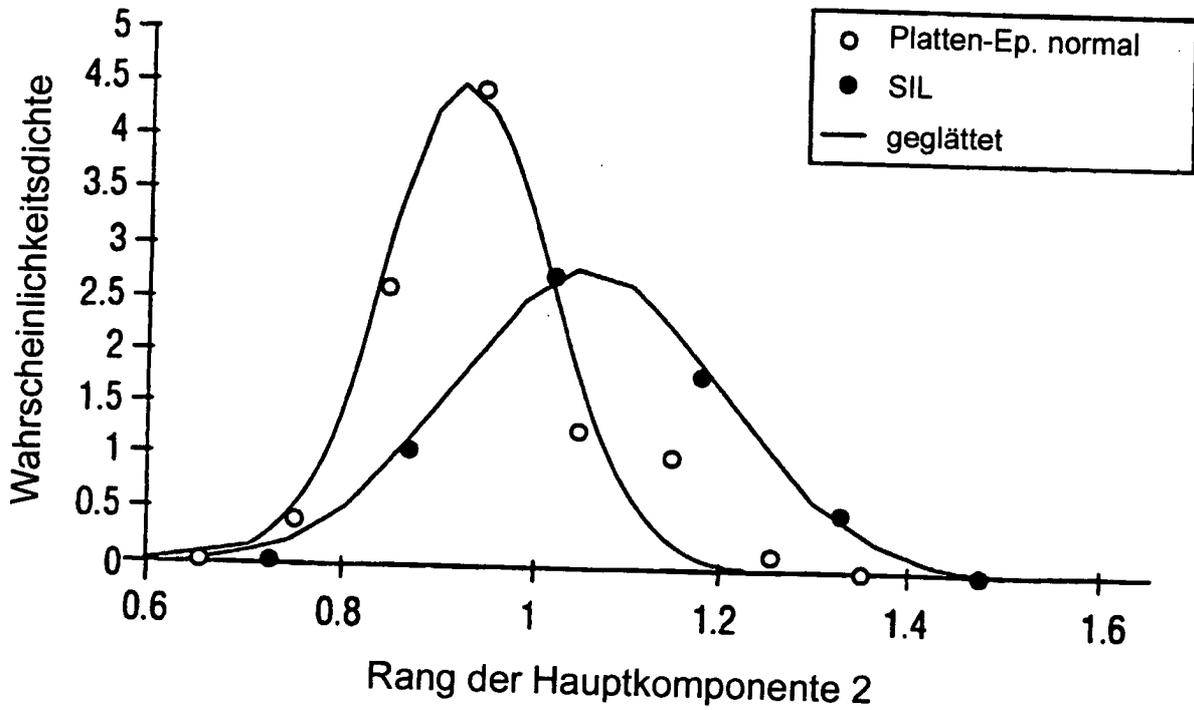


FIG. 9B

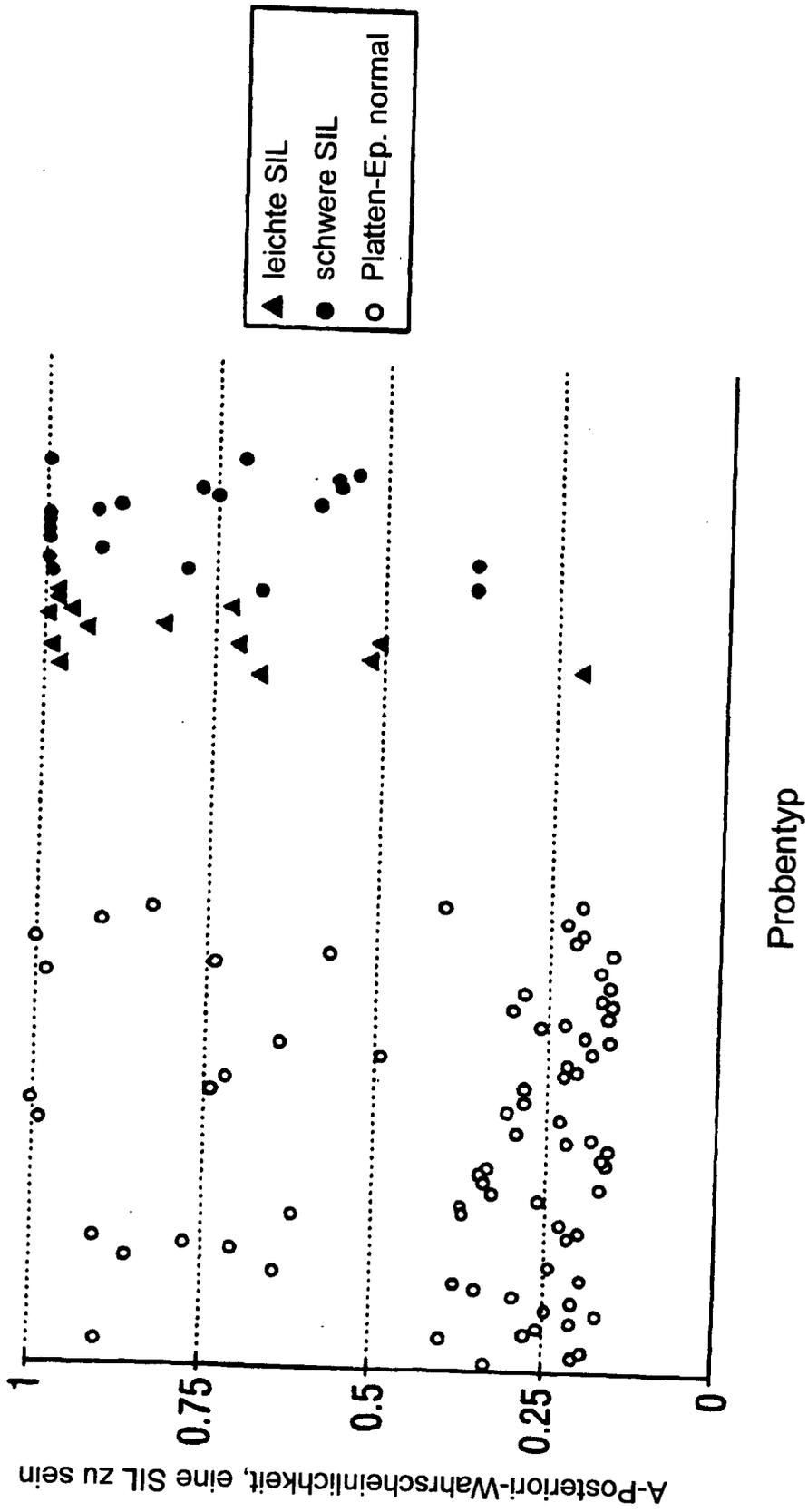


FIG. 10

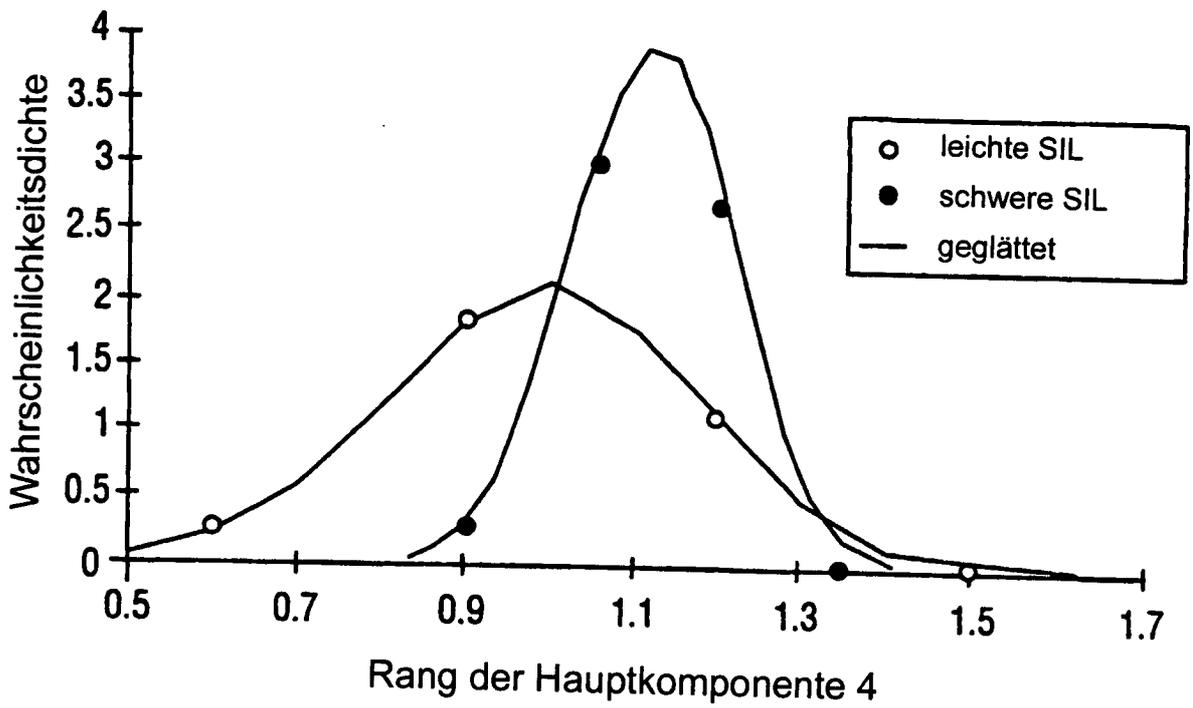


FIG. 11A

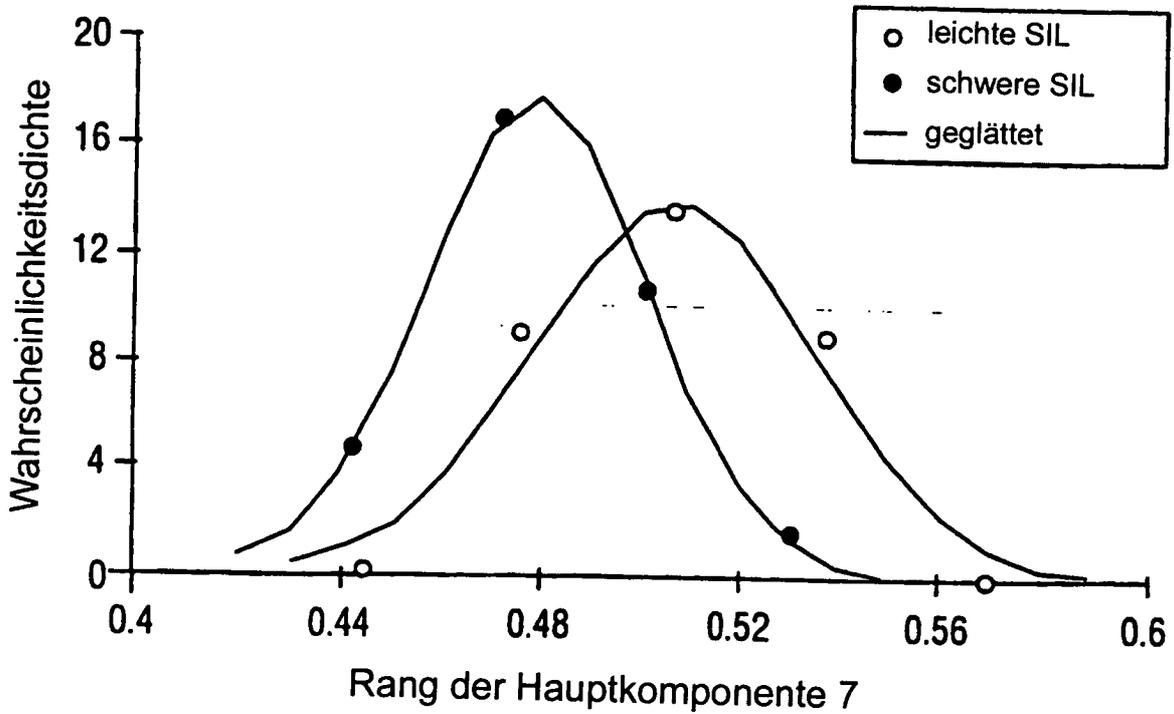


FIG. 11B

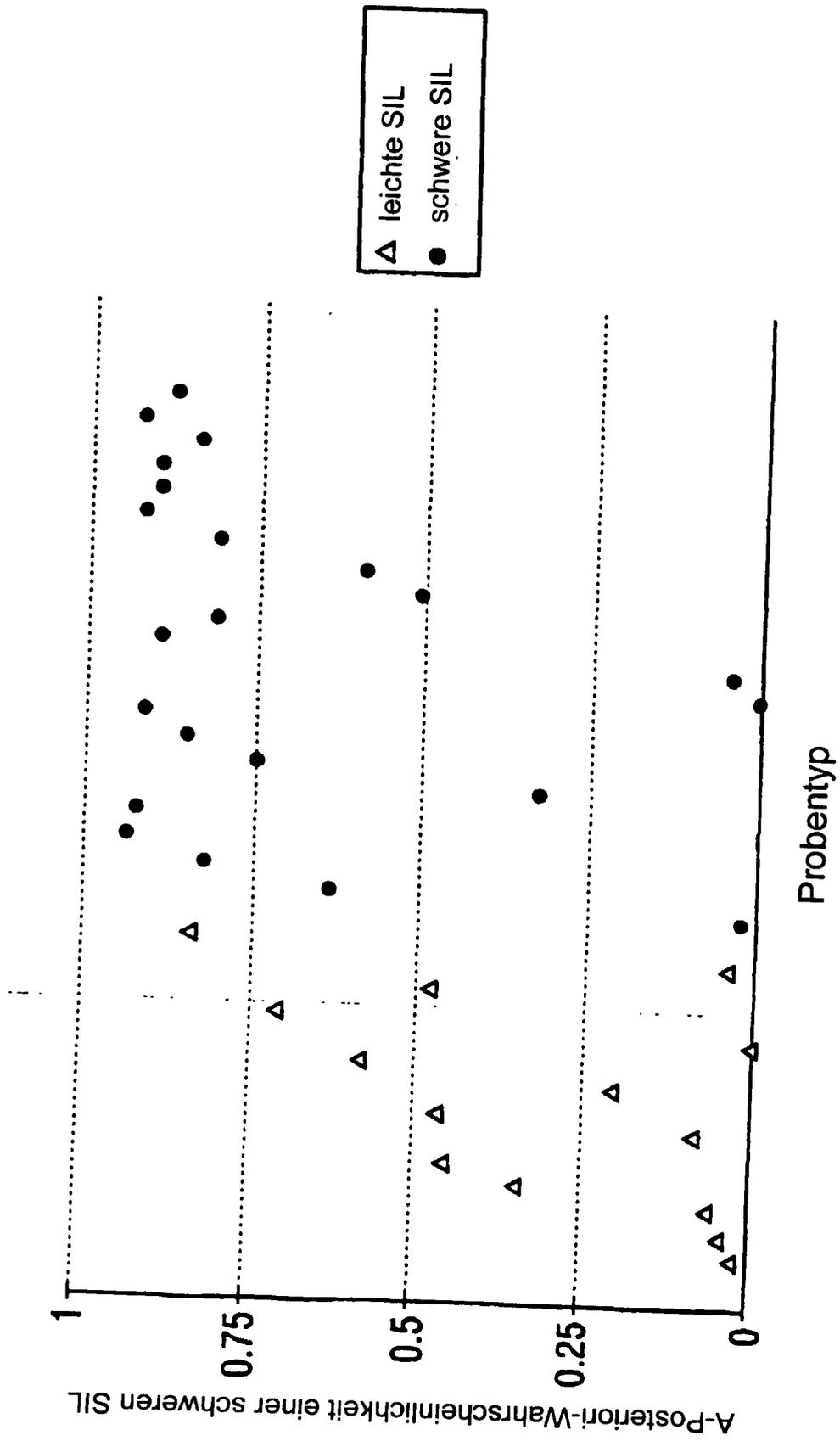


FIG. 12

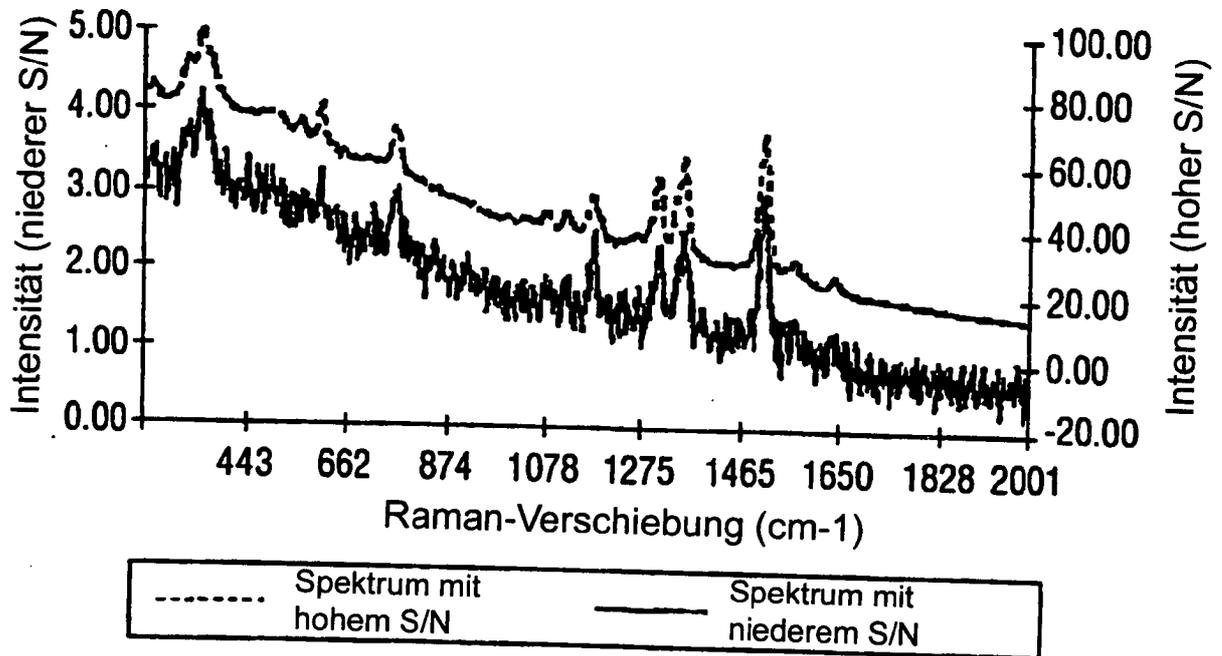


FIG. 13

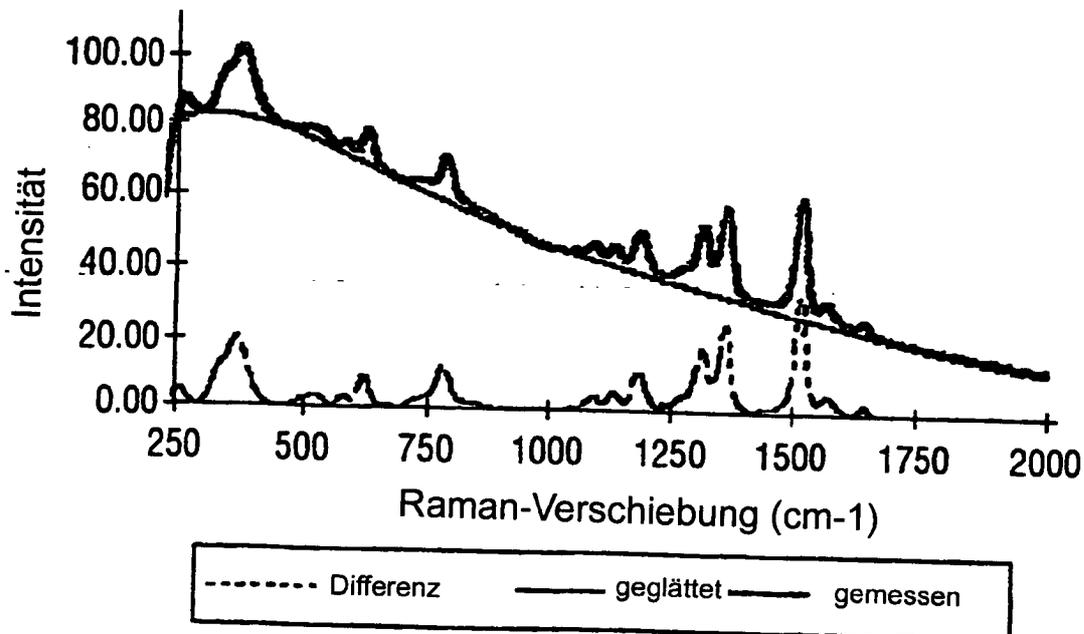


FIG. 14

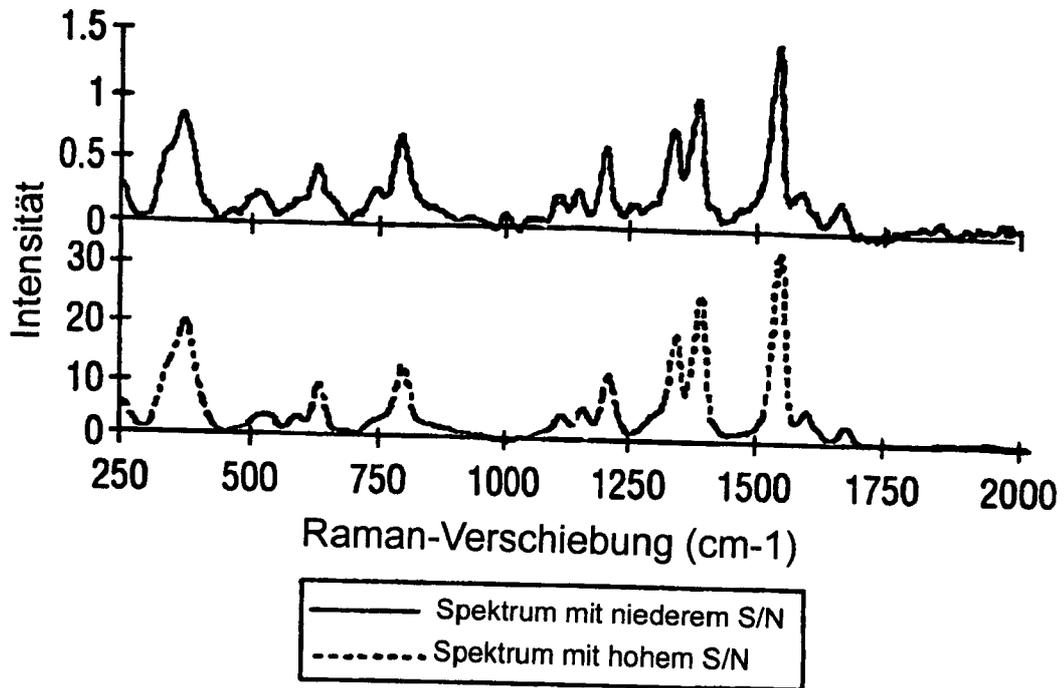


FIG. 15

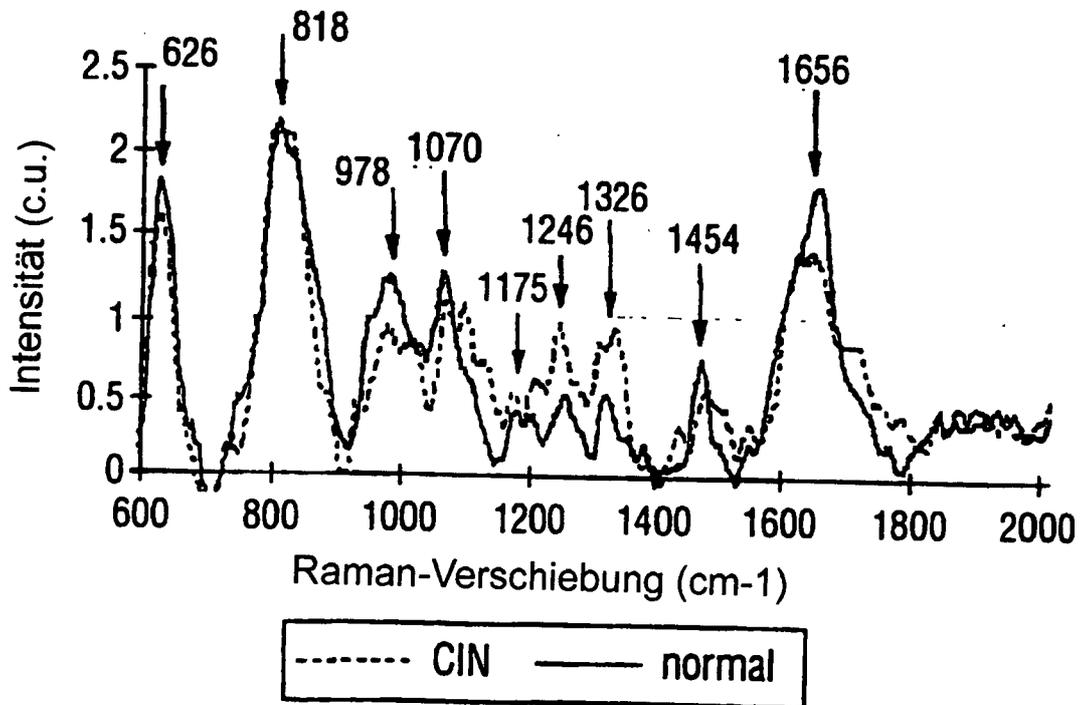


FIG. 16

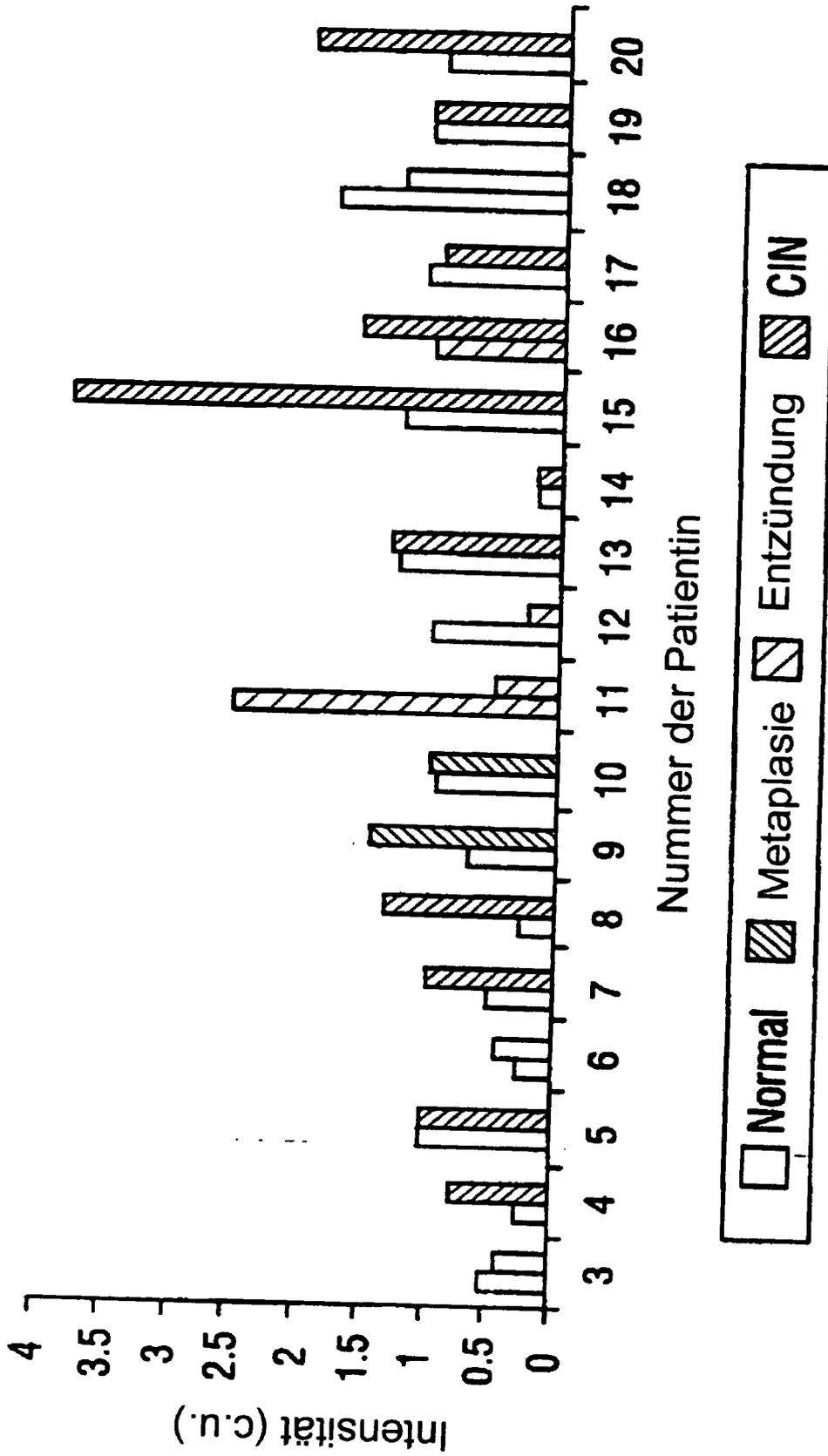
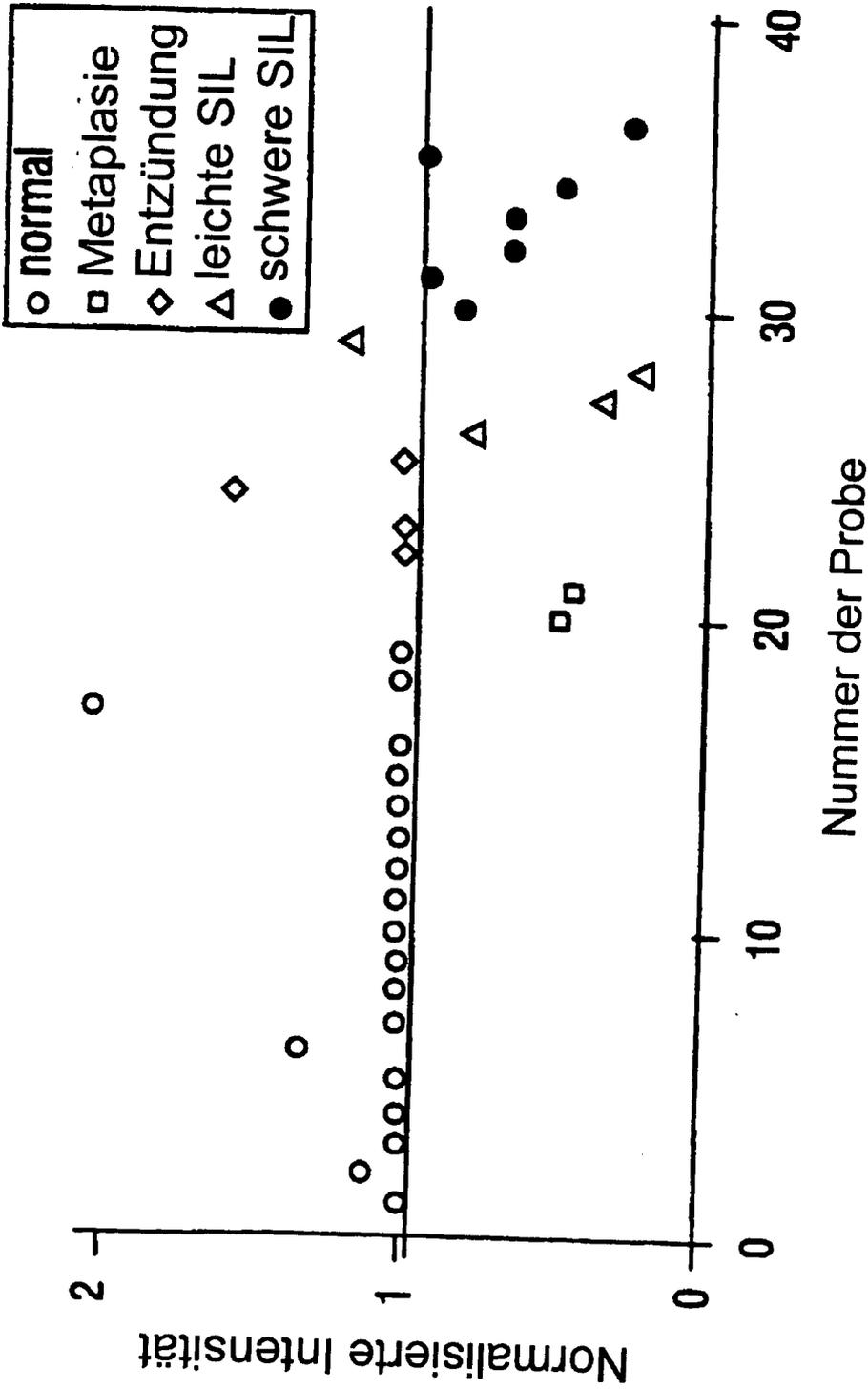


FIG. 17



Empfindlichkeit = 91%

Genauigkeit = 92%

FIG. 18A

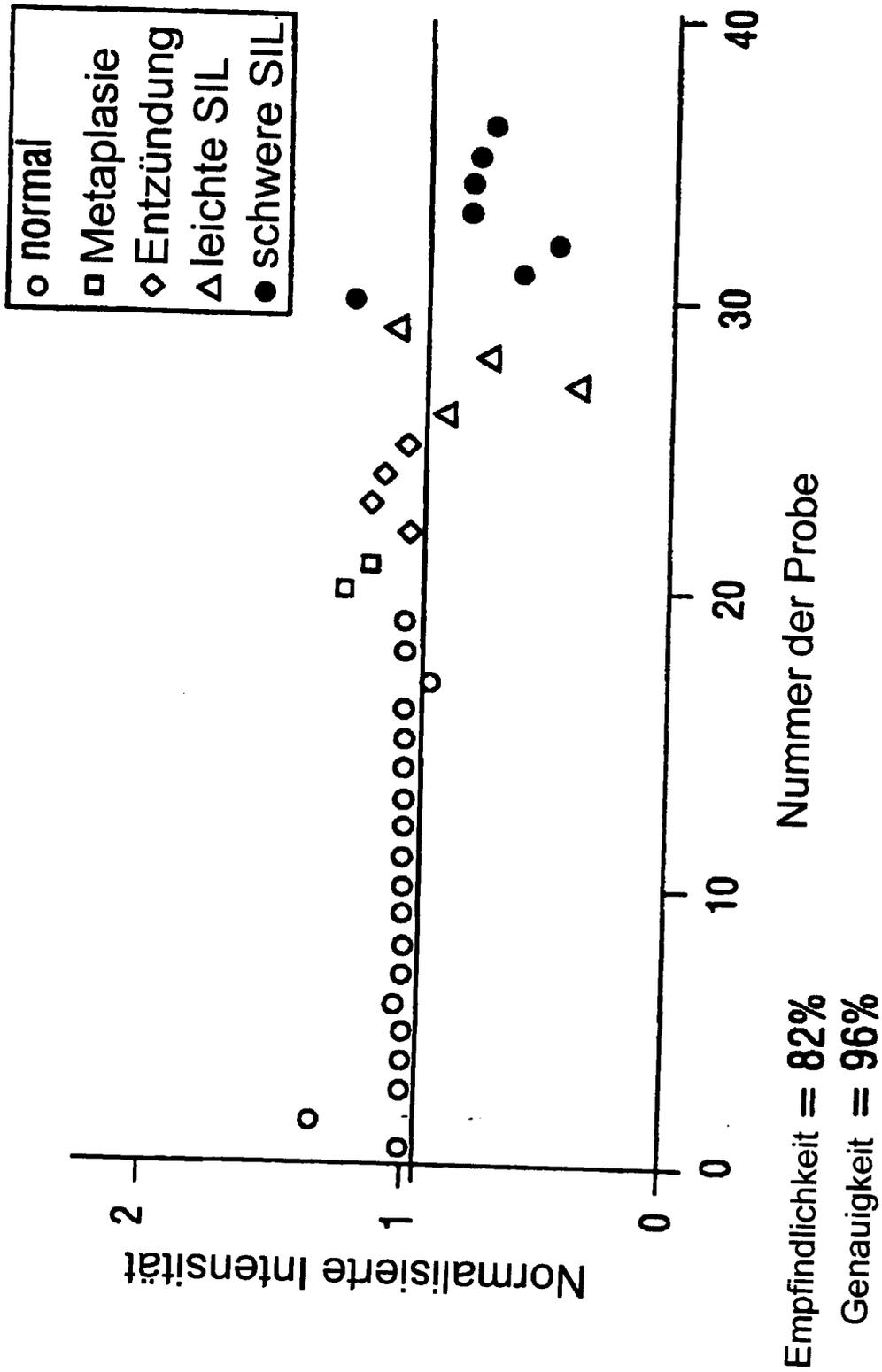


FIG. 18B

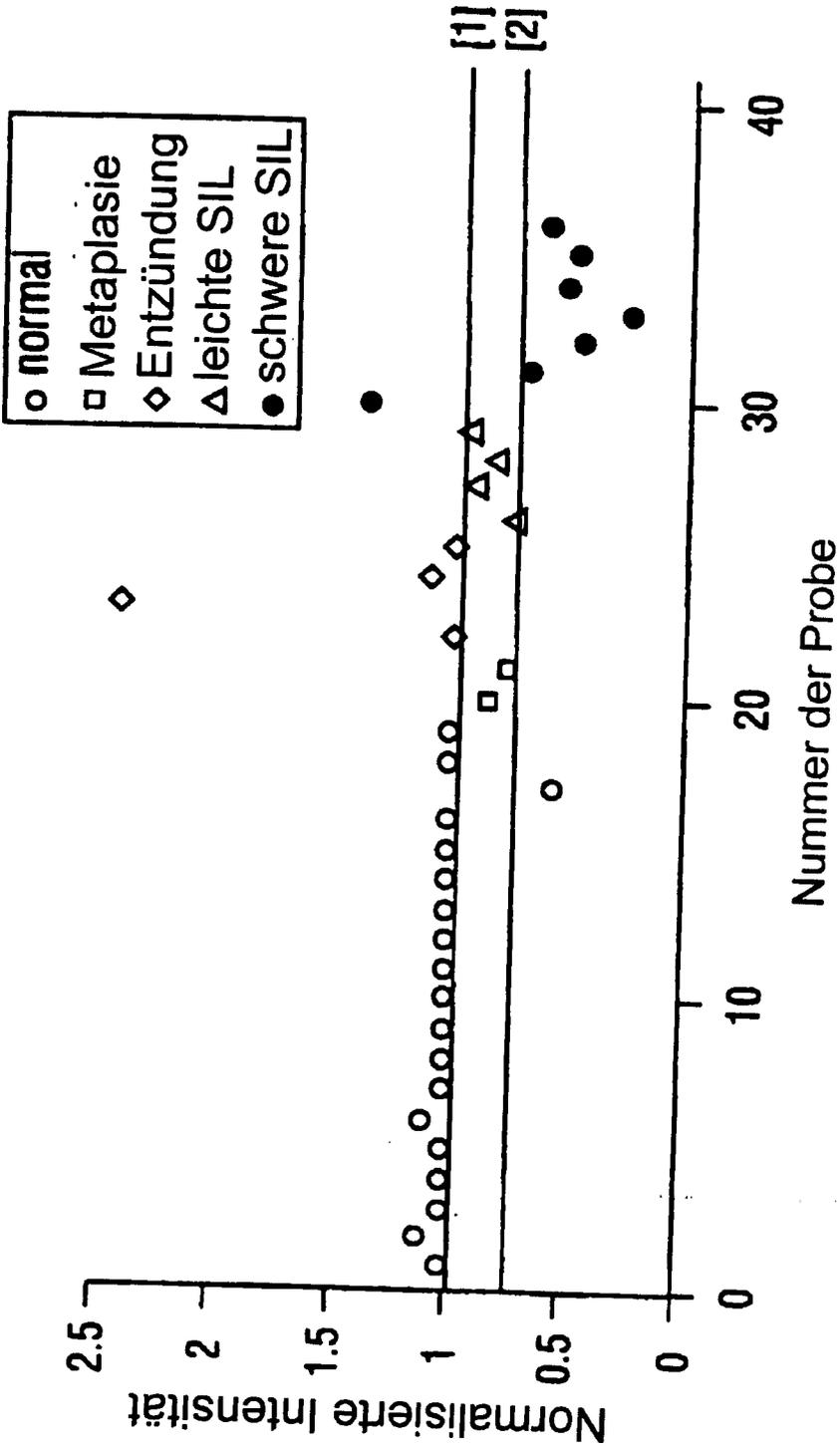
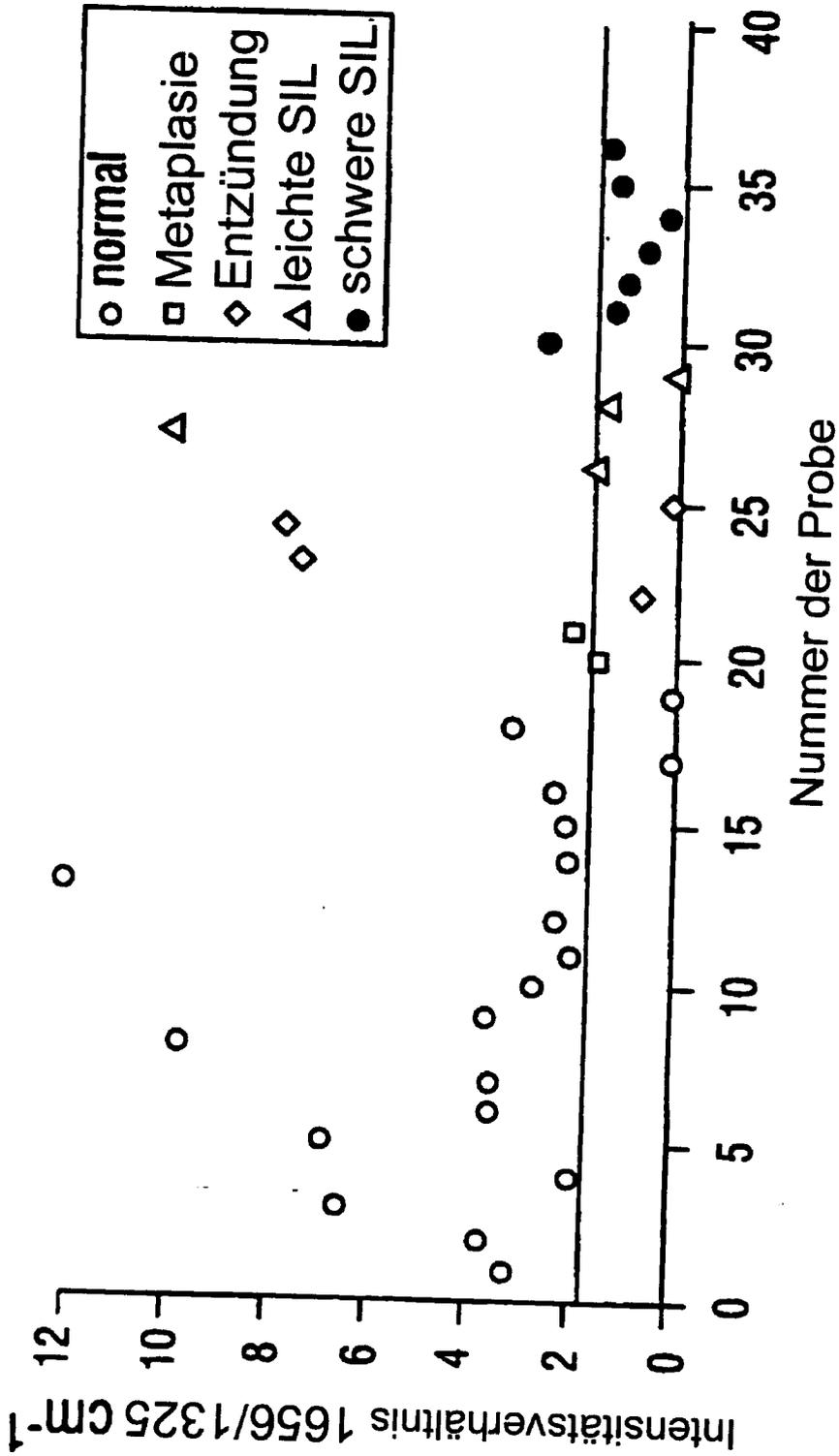


FIG. 19



Empfindlichkeit = 82%
 Genauigkeit = 80%

FIG. 20

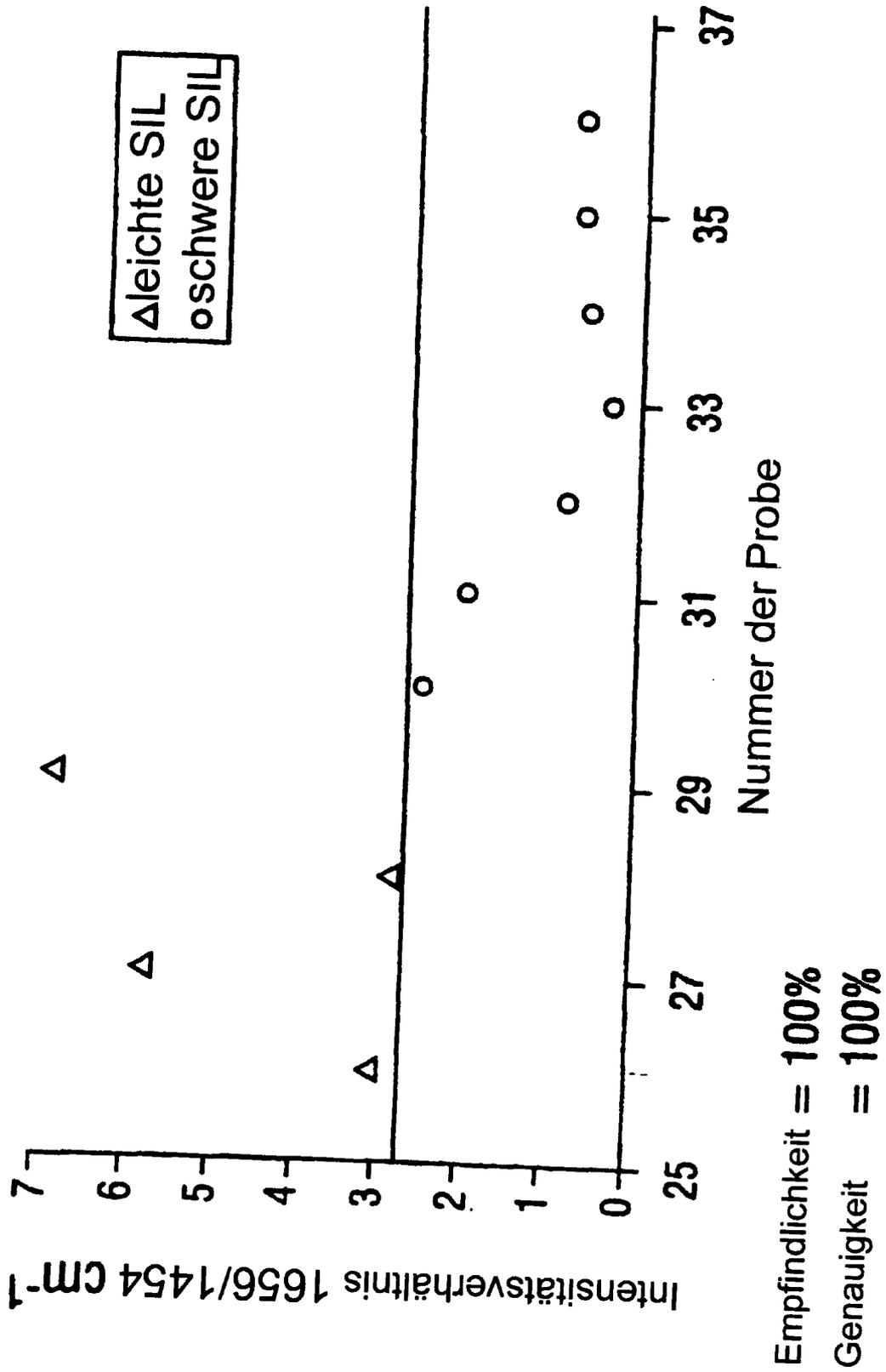


FIG. 21

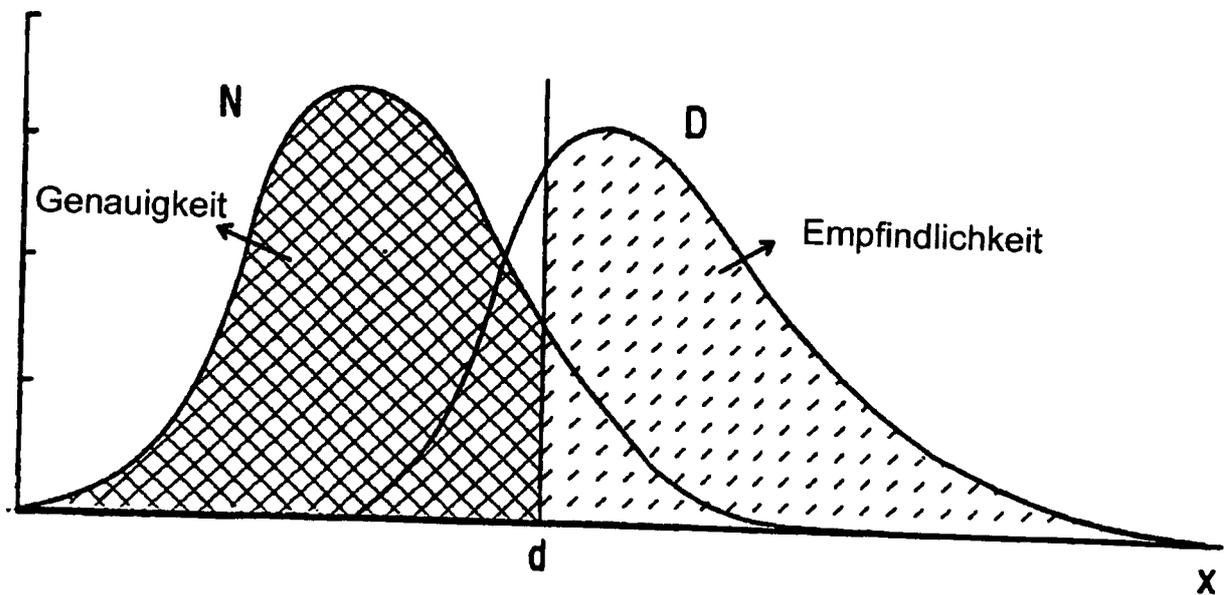


FIG. 22