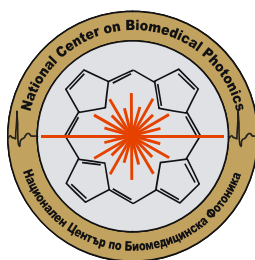


Проект ДО02-112/2008 на Фонд "Научни изследвания"
с Институт по електроника, Българска академия на науките



„Национален център по биомедицинска фотоника”

ОБОБЩЕН ОТЧЕТ

Наукометрична информация

	1 година	2 година	Общо
Публикации*	14 статии	21 статии 3 глави в монографии	35 статии 3 глави в монографии
Патенти**	2 европейски 1 национален	-	3
Конференции и краткосрочни съвместни изследвания***	16	15	31
Защитена дисертация	-	1	1
Защитени дипломни работи	2	5	7
Спечелени научни конкурси	-	3	3
Експериментални прототипи на апарати	2	7	9
Медицински методи, в процес на клинични изпитвания	-	2	2

*Приложение 1, **Приложение 2, ***Приложение 3 и 4

Участници

Име, фамилия	Институция
проф. д.ф.н. Лъчезар Аврамов	Институт по електроника
доц. д-р Екатерина Борисова	Институт по електроника
гл.ас. д-р Албена Даскалова	Институт по електроника
гл.ас. Александър Гизбрехт	Институт по електроника
Ирина Близнакова - докторант	Институт по електроника
инж. Даниел Петков	Институт по електроника
Лилия Ангелова - магистър	Институт по електроника
Даниела Доганджийска – магистър	Институт по електроника
ст.н.с.І ст. д.ф.н. Димитър Стоянов	Институт по електроника
доц. д-р Тая Драйшу	Институт по електроника
доц. д-р Люан Гърдев	Институт по електроника
гл.ас. инж. Орлин Ванков	Институт по електроника
Александра Желязкова – докторант	Институт по електроника
Ивайло Балчев – магистър	Институт по електроника
доц. д-р Петранка Троянова	СБАЛ по Онкология
д-р Елмира Павлова	СБАЛ по Онкология
доц. д-р Борислав Владимиров	УМБАЛ „Царица Йоанна”
гл.ас. д-р Иван Терзиев	УМБАЛ „Царица Йоанна”
д-р Радиана Иванова	УМБАЛ „Александровска”
доц. д-р Красимир Коев	УМБАЛ ”Александровска”
проф. д.т.н. Божидар Чорбанов	Институт по Органична Химия
гл.ас. д-р Ваня Мантарева	Институт по Органична Химия
д-р Иван Ангелов	Институт по Органична Химия
доц. д-р Петя Павлова	ТУ София, филиал Пловдив
доц. д-р Веселин Късовски	Институт по Микробиология

Начална дата на договора: 15.12.2008

Продължителност: **18 месеца**

Координатор на колектива: **проф. д.ф.н. Лъчезар Аврамов**

Организация: **Институт по електроника на Българската академия на науките**

Адрес за контакт: проф. д.ф.н. Лъчезар Аврамов,
 ИЕ-БАН, Цариградско шосе 72, София 1784,
 Тел. (02) 9745742, Факс (02) 9745742,
 Mobil (+ 359) 0888 459315
 E-mail: avramov@ie.bas.bg

А. Управление на проекта

1. Координация и отчетност

Настоящият проект беше разработен за участие в обявения от Фонд „Научни изследвания“ конкурс „Центрове за върхови постижения“. Структурата и дейностите на проекта бяха развити в съответствие с възприетите Европейски практики за “Center of excellence”. Съгласно решение на Изпълнителния съвет на Фонд „Научни изследвания“ проектът беше пренасочен и финансиран в рамките на конкурс „Развитие на научната инфраструктура“. В последствие, бюджетът на проекта за втория етап, беше съкратен с 50 % и срокът удължен, с решение на ИС на ФНИ до 31.06.2012 година.

Настоящият отчет се представя в срок и според всички изисквания на Възложителя.

Оперативното управление на проекта е организирано гъвкаво с периодични вътрешни отчети, междинни финансови, административни и научни отчети. Текущите организационни проблеми се разглеждат периодично във формата на Консорциума. Научните и научно-приложните резултати се докладват на открити семинари на Базовата организация – Института по електроника, а посещенията на чуждестранни гости - на научните семинари на партньорите по проекта.

Съгласно финансовото споразумение между организациите в Консорциума съответните суми за финансиране са преведени в началото на изпълнение на дейностите по сметките на партньорите, но разходите им се координират и контролират текущо и са отчетени в общия финансов отчет във формата на базовата организация (виж финансовия отчет).

Командировките на членове на колектива са извършват със заповеди на Директора на ИЕ, а отчитането им се провежда пред Научния съвет на института.

2. Изграждане на структурата на „Национален център по биомедицинска фотоника“

Независимо от това, че бюджетът на проекта беше чувствително редуциран, което доведе до значителни промени в планираните активности, колективът реорганизира дейностите си с оглед на постигане на обявената крайна цел на проекта – пълноценно функциониране на научния център като една устойчива и самоусъвършенстваща се единица, съответстваща, а в някои елементи превишаваща средното ниво на европейските лаборатории в тази научна област. В резултат на това, може да се направи заключение, че като краен резултат от изпълнението на проекта е изграден пълноценен център за върхови научни изследвания, с тематичен, кадрови и експериментален потенциал, напълно съответстващ на съвременните световни изисквания.

Националният център по биомедицинска фотоника е разположен в отделна, масивна сграда, предназначена за експериментална база за развитие на микроелектрониката, но изоставена в течение на 35 години. След частичен ремонт и модернизация сградата е приведена към необходимите стандарти и по този начин е осигурено пълноценното функциониране на центъра в течение на продължителен период, с възможности за разширение и развитие.

На фиг. 1 е показано състоянието на сградния фонд преди и след изпълнението на проекта.



Фиг. 1 Национален център по биомедицинска фотоника (НЦБМФ)
а и б – през 2008 г., в и г – през 2010 г.

Структура на НЦБМФ

Съгласно предвидената програма са проведени процедурите по ЗОП за закупуване на научна апаратура и са организирани лабораториите на НЦБМФ.

Фемтосекундна лазерна лаборатория

Основното оборудване на лабораторията, показано на фиг. 2 се състои от спектроскопска система на фирмата COHERENT INC. включваща: напompващ едночестотен лазер с мощност 5 W, фемтосекунден осцилатор с пренастройка на дължината на вълната не по-малка от 700 до 1000 nm и изходна мощност за дължина на вълната 800 nm не по-малка от 600 mW и продължителност на импулсите по-къса от 120 fs, стабилност на изходната мощност и продължителността на импулсите по-добра от 3 % и шум по-малък от 0.1 %, генератор на втора хармонична, съгласуван с осцилатора, измерител на лазерната мощност с три канала за осъществяване на pump-robe експерименти. Системата дава възможност за бъдещо добавяне на устройство за пред компенсационна дисперсия с цел използване на оптично влакно за многофотонна флуоресценция и микроскоп. Системата дава възможност за бъдещо добавяне на компресор за скъсяване на продължителността на импулса, както и устройство за отделяне на единичен импулс с цел добавяне на 1 – 5 kHz усилвател.



Фиг.2. Фемтосекундна лазерна система

Лазерната система е инсталирана върху специализирана antivибрационна маса и е оборудвана с мултифункционален измерителен комплекс за анализ, контрол и поддържане на оптимални експериментални параметри.

Лаборатория *LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy)*

Основното оборудване на LIBS лабораторията (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy), фиг.3., се състои от LIBS система и система за регистрация със седем канала за спектрален анализ в диапазона 200-980 nm, оптичен сноп световоди за седемте канали на детекторите, оптични лещи на вход/изход, камера за аблация на образците, модул за изображение на образците. Импулсният лазерен източник Ultra Laser CFRB66101B1 представлява Q-модулиран 1064 nm Nd:YAG лазер с енергия на импулса, с възможност за регулиране до 200 mJ и продължителност на импулса 10 ns. Системата е ефективна за определяне на количествен елементен състав, с възможност за работа с твърди, течни и газообразни образци. Всеки канал се характеризира със спектрален диапазон 200-980 nm, разделителна способност 0,1 nm (FWHM), чувствителност до ppb и до нива от пико-грамовете в образец).



Фиг.3. LIBS система и експериментална инфраструктура

Характеристиките на всички спектрометри позволяват да се използват ефективно при работа с ниско интензивни светлинни сигнали, като тези при Раманова и

флуоресцентна спектроскопия. Комплектовани са със специализиран софтуер с възможност за работа под операционната система Windows, с възможност за вътрешна калибровка по чувствителност и линейност на детекторите и оптичните системи и имат USB2.0, RS-232 сериен порт;

Лаборатория по свръхбърза и свръхчувствителна спектроскопия

На фиг. 4. е показана спекрофлуориметричната система FluoroLog3 - TCSPC на фирмата Horiba Scientific за извършване на стационарни и време-разделителни измервания.



Фиг.4. Спекрофлуориметрична система FluoroLog3

Основната конфигурация на системата за стационарни измервания включва ксенонова лампа с мощност от 450 W, монохроматори с двойни дифракционни решетки в линиите на възбуждане (200-950nm) и емисия (200-950nm) конструирани изцяло на базата на отражателна оптика. Висока разделителна способност от 0,5 nm, Чувствителност в пълния спектър на дължините на вълните, Възможност за превключване в линията на измерване от конвенционалната перпендикулярна геометрия на детекция на сигнала към фронтална детекция на емисионния сигнал, необходимо при изследване на силно абсорбиращи образци, Държатели на твърдотелни проби и филтри, както и комплект филтри за блокиране на спектъра от различни дължини на вълните.

Конфигурация на системата за динамични измервания включва модул за времеразделителни измервания TCSPC (time correlated single photon counting) и позволява измерване на времето на живот в интервал от 100 ps до 10s, Специализиран софтуер доставян към системата позволява деконволюци на няколко, до пет, време-зависими процеси, Диодни лазери източници с дължини на вълните 405 nm и 650 nm, Термична вана за поддържане на температурата на пробите в диапазон от -18°C до 150°C.

Лаборатория по спектрални методи в медицината и индустрията

Лабораторията е изградена на базата на оборудване на фирмата Ocean Optics и представлява спектрометричен комплекс (Фиг. 5.) включващ:

Инфрочервен портативен спектрометър NIRQUEST256-2.1 (Работен диапазон 900-2100 nm; Детектор Hamamatsu G9206-256 InGaAs; Време за интегриране от 1 ms до 1s, Линейност на детектора >99,8%)

Портативен спектрометър MAYA2000PRO (Работен диапазон 200-1100 nm; 2D CCD – детектор (2048x64 пиксела); Разделителна способност от 1,5 nm, Максимална квантова ефективност 75%; Минимално време за интегриране 6 ms; Линейност на детектора >99,7%; Чувствителност - 0,32 единици/на електрон)



Фиг.5. Лаборатория по спектрални методи в медицината и индустрията

Спектрометър с висока разделителна способност QE65000 (високо отражателна дифракционна решетка с работен диапазон 200-950 nm; Оптично влакно 600 μ m, кварц UV/VIS, дължина 2m, със защита против прегъване, вход на спектрометъра SMA-905 с числова апертура 0,22; Hamamatsu S7031-1006 FFT-CCD детектор с 90% квантова ефективност; време за интегриране от 8 ms до 15 min; Квантова ефективност по-висока от 60% при 250 nm в UV диапазон)

Доставената апаратура е уникална за България и ще позволи повишаване на научния капацитет в широка област на научни изследвания, обхващаща фотофизиката, фотохимията, фотобиологията при изучаване на медицински, екологични и други проблеми. Реализирани са три основни позиции апарати, осигурени със значително количество материали и консумативи, гарантиращи продължителна и качествена експлоатация.

Закупен е софтуер и специализирана литература и е се поддържа абонамента за научни списания, както следва: Journal of Biomedical Optics, Journal of Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, SPIE Digital Library issues, Photochemical and Photobiological Sciences, OSA Optics InfoBase, Tissue Optics, light scattering methods and instruments for medical diagnosis, SPIE press,

3. Обучение за работа със създадената инфраструктура

Извън работната програма, но в рамките на проекта, е изграден практикум за обучение на студенти и повишаване на квалификацията на медицински физици, инженери и лекари в областта на биомедицинската фотоника. Осигурени са подходящи помещения и инфраструктура за тази дейност. В тях се осъществява и обучението за работа с новозакупената апаратура.

Предвидени са краткосрочни посещения на развойната и производствена база на "HORIBA Jobin Yvon" за повишаване на квалификацията на членове на колектива и разширяване на сътрудничеството в конкретни области на съвместни интереси.

Националното представителство на COHERENT INC. има ангажимент да организира обучение на по-широк кръг от специалисти за работа с продуктите на фирмата в областта на лазерната спектроскопия.

4. Подготовка на проекти и кандидатстване по национални и международни програми

В рамките на периода на изпълнение на договора са спечелени два научно-изследователски проекта на двама млади специалиста от НЦБФ към ИЕ-БАН, с екипи от

млади учени от базовата организация и партньори, които се явяват естествено продължение на научно-изследователските дейности заложи в настоящия проект и разширение на приложенията на създадената в рамките на проекта инфраструктура, а така също и един билатерален проект за сътрудничество с Институт по приложни проблеми на физиката и биофизиката на Украинската АН.

1-ви проект:

„Разработка и внедряване на оптична биопсия за ранна диагностика на злокачествени тумори”, 2011-2013 година. Ръководител на проекта: доц. д-р Екатерина Борисова, работен колектив от ИЕ-БАН и УМБАЛ „Царица Йоанна” ЕАД-ИСУЛ.

Анотация на проекта:

Основни цели:

Разработка и оптимизация на оптоелектронен инструментариум и методология за оптична биопсия и тяхната апробация и внедряване в клиничната практика за ранна диагностика на злокачествени новообразувания на кожа и лигавица. Оптимизация на флуоресцентните и дифузно-отражателните спектроскопски техники за получаване на максимална диагностична точност при определяне на основните типове злокачествени неоплазии в дерматологията и гастроентерологията.

Използвани методи:

Ще бъдат използвани методите на флуоресцентния анализ – както автофлуоресценция, така и с въвеждане на екзогенни маркери – спектроскопия с честотно и с времево разрешение. Методите на дифузната отражателна спектроскопия ще се използват за разширение на диагностичните възможности и ще се прилагат за пигментирани новообразувания. Измерванията ще бъдат с фиброоптични сонди - едномерно точково сканиране (1-D), както и топографски (2-D) изображения на разпределението на флуоресцентния сигнал от тъканите в норма и патология. Ще бъдат създадени бази данни за флуоресцентните и отражателни свойства и въведени компютърни методи за обработка – разработка на диагностични алгоритми за диференциация на основните типове злокачествени образувания, по тип, степен на развитие и спрямо доброкачествени патологии. Спектралните данни ще бъдат сравнени и верифицирани с получавани по “златен стандарт” хистологични резултати.

Очаквани резултати:

Ще бъдат създадени системи за оптична биопсия на злокачествени новообразувания на кожа и лигавица, за първична диагноза и интраоперативен мониторинг. Ще бъдат внедрени методики за диагностика на основните типове кожни неоплазии и диференциацията им спрямо диспластични и доброкачествени лезии. Ще бъде създадена система и разработена методика за интраоперативен мониторинг по метода на флуоресцентната спектроскопия при резекция на тумори на дебело черво и ректум. Ще бъде усъвършенствана, създадената в предходни изследвания методика за флуоресцентна диагностика на тумори на горен и долен гастроинтестинален тракт. Апаратните и методологичните средства ще бъдат клинично реализирани.

Научните резултати ще бъдат публикувани в специализирани международни издания и докладвани на конференции, необходими за популяризацията им и ще имат принос за цялостното израстване на участниците, членове на екипа на проекта. Разработените методики и апаратура ще бъдат използвани в дисертационните трудове на двама от младите учени.

2-ри проект:

“3D Фемтосекундно лазерно микроструктуриране на биоматериали за приложение в медицината”. Ръководител на проекта: гл.ас.д-р Албена Даскалова, работен колектив от ИЕ-БАН в сътрудничество с IESL-FORTH, Хераклион.

Основни цели:

Създаване на биосъвместими заместители на тъкани и органи обкръжени с високо съотношение на колаген (извънклетъчна матрица). Върху изкуствено създадено скеле от

порест колаген ще бъдат култивирани клетки които ще се разрастнат в необходимата тъкан. Основната цел на тъканното инженерство е контролирането на израстването и разграничаването на клетките. Една от основните цели на проекта ще бъде постигането на по-високо ниво на контрол върху наноструктурата на скелето от колаген чрез използването на фемтосекундно лазерно лъчение. Ще бъдат използвани и други биологични материали като еластин, желатин, хитозан за създаването на база за сравнение. Повърхностните свойства на биоматериалите играят изключително важна роля в биомедицината, т.к. множеството биологични реакции се осъществяват именно на повърхността на имплантирания материал. Колагенът намира най-голямо предимство, поради това че е биоразграждащ се, притежава лесна биосъвместимост и голяма гъвкавост.

Използвани методи:

Облъчването на тънки слоеве от колаген, с единични нано и фемто секундни лазерни импулси правят възможно формирането на слой от нано-пяна чието израстване се дължи на появата на кавитационни мехури. Получената по този начин пяна притежава интересни свойства като имитира естествената извън клетъчна матрица което я прави добър кандидат за направата на изкуствена матрица, състояща се от наноскопични влакна, която да притежава добра възможност за клетъчна адхезия и пропускливост на флуиди поради отворената клетъчна структура.

Чрез методите на оптичното изобразяване ще се проведат изследвания на колагеновият слой преди и след аблация с ултра- къси лазерни импулси. За осъществяването на тази цел ще бъде използвана Мултифотонната микроскопия на тънки слоеве от колаген която ще позволи получаването на образи чрез генерация на втора хармонична и дву-фотонна флуоресценция, което позволява неинвазивно изучаване на микроструктурата на колагена в дълбочина (1 mm) и механичните свойства на лазерно индуцираната пяна от колаген.

Очаквани резултати:

1. Ще бъдат изследвани условията за ефективно формиране на пяна от биоматериали (колаген, еластин, желатин, хитозан) с минимални термични странични ефекти. За целта ще се проведат селективни изследвания на процесите чрез вариране на нивата на мощността, продължителността на импулса, честотата на повторение на лазерния импулс и различни фокусни положения.
2. Ще бъдат определени праговете на аблация и аблационни нива.
3. Ще бъде направена оценка на профилните анализи от SEM и AFM измерванията за определяне на профила на взаимодействие на лазерното лъчение и формираната повърхностна морфология, в зависимост от изследванията за праг на аблация.
4. Разширяване на полето на изследвания чрез използването на метода на импулсно моделиране
5. Получаване на пяна с клетки и мониторинг на тяхното израстване.
6. Представяне на спектроскопско проучване на биоматериалите чрез изучаване на лазерна- и светлинно- индуцирана флуоресценция, отражателна и поглъщаща спектроскопии на посадените тънки филми.
7. Ще се направи корелация между резултатите от изображенията получени чрез методите на Мултифотонната микроскопия (SHG, TPF) и морфологичните изследвания от SEM и AFM за крайносна оценка на оптималните условия за формиране на лазерно индуцирана пяна от биоматериали.
8. Ще бъдат числено симулирани (Монте Карло симулация) процесите на формиране на плазма и кавитационни мехури, еволюцията на температурното разпределение и генериране на термоеластичен стрес при взаимодействие на фемтосекунден лазерен импулс с тънък слой от биоматериал и резултатите ще бъдат сравнени с експериментално получените такива.

3-ти проект:

“Изследване на лазерното въздействие върху периферното кръвообращение за създаване на високоефективна фототерапия”. Ръководител на проекта: проф. дфн Лъчезар Аврамов, работен колектив от ИЕ-БАН в сътрудничество с Институт по приложни проблеми на физиката и биофизиката на Украинската АН.

Основни цели:

Кожата има комплексна структура, чиято архитектура и параметрите на лазерното лъчение определят спецификата на тяхното взаимодействие. Биотъканта се явява силноразсейваща среда, състояща се от много различни компоненти, всяка от които има собствен характерен спектър. Кръвоносните съдове съдържат различни деривати на Hb с високи коефициенти на абсорбция във видимата област на спектъра. Абсорбционните спектри се променят в зависимост от дълбочината на проникването на ЛЛ и в този случай е необходимо да бъдат използвани спектрите на действието. Различни дължини на вълната на ЛЛ могат да взаимодействат с различни елементи на тази структура на тъканта и иницират различни механизми на взаимодействието и определени фотохимични процеси. За подобен пример може да служи лазерна терапия на дерматологични и онкозаболявания. Съществен момент в метода на лазерната терапия е фотодисоциацията на HbO_2 , водеща до образуване на O_2 в тъканите, необходим за протичане на биохимични реакции в организма, включително метаболизма на клетките, който е основен за доставката на енергия в тъканите. Контролът над този процес дава уникална възможност за биостимулация с цел постигане терапевтичен ефект. Ефективността на терапията силно зависи от количеството на O_2 , чиято концентрация може да бъде увеличена чрез допълнителна дисоциацията на HbO_2 в кръвоносни съдове. Този процес съответно води до намаляване на степента на насищането на кръвта с кислород – относителната концентрация на HbO_2 (сатурация). Квантовият добив на този процес е висок и достига до 10 % в широк спектрален диапазон. Параметърът на насищането(сатурация) SaO_2 в артериалната кръв се определя от концентрацията на дериватите на Hb, HbO_2 , карбоксиемоглобин (HbCO), метхемоглобин (MetHb).

Използвани методи:

Мониторинг на концентрацията на тези деривати е определящ фактор. Съществуващата апаратура (пулсоксиметри) не дават пълна картина за концентрацията на всичките деривати в артериалната кръв, т.к. дериватите имат сходни спектрални характеристики в областите, използвани в повечето пулсоксиметри. Проблемът на мониторинга на концентрации на дериватите на Hb остава актуален и се търсят нови методи. За да бъде методът на лазерната терапия наистина ефективен е необходим контролът върху концентрацията на O_2 в кръвта и запазването ѝ на необходимото ниво по време на медицинската процедура. Тази задача може да бъде постигната с помощта на *in vivo* лазерно-индуцирана фотодисоциация на HbO_2 в кръвоносните съдове директно в зоната на въздействие. Концепцията на лазерно-индуцирана оксигенация на тъкани спомага за разбирането на механизма на терапевтичния ефект на лазерното лъчение и дава възможност за създаване на нов метод за селективно увеличаване на концентрацията на O_2 в тъканите, което може да бъде използвано за широк спектър от биомедицински приложения.

Очаквани резултати:

ЛАЗЕРНА ФОТОДИНАМИЧНА ТЕРАПИЯ НА ТУМОРИ

За постигането на поставената цел ще бъдат решени следните задачи:

- 1) Определяне на ефективни начини за повишаване на локална концентрация на кислород в биотъкани чрез лазерно-индуцирана фотодисоциация на оксиемоглобин *in vivo*.
- 2) Изследване на фундаментални закономерности на взаимодействие на лазерно излъчване с биосистеми чрез обработка на оптични спектри – спектри на действие.
- 3) Разработка на принципиална схема на лазерна система, включваща източници на излъчване за активиране на фотосенсибилизатора, ефективна фотодисоциация на оксиемоглобин и регулиране на локална температура на биотъканта.

ФОТОТЕРАПИЯ НА ОТРАВЯНИЯ С ГАЗ (въглероден окис)

В този проект ние предлагаме нов метод за лечение на отравяния с CO, базиран на лазерно-индуцирана дисоциация на HbCO в кръвта. Въпреки сходност на абсорбционните спектри на HbO₂ и HbCO съществува значителна разлика в квантовия добив на фотодисоциацията. Ефективността на дисоциацията на HbCO е почти 10 пъти по висока от HbO₂, което прави възможно получаването на селективна декомпозиция на HbCO в кръвта с минимален ефект върху HbO₂. Най-ефективни области за третиране са кожата и белите дробове. И в двата случая физическия принцип на дисоциацията на HbCO е един и същ, обаче има специфика в оптичните свойства. Изчисленията показват че има сравнително тясна спектрална област, където може ефективно да се въздейства върху HbCO през кожни тъкани, което в комбинация с други методи би могло съществено да ускори процеса на възстановяването.

ФОТОТЕРАПИЯ НА АНАЕРОБНИ ИНФЕКЦИИ, РАНИ И ИЗГАРЯНИЯ

Кислородът е важен фактор в борбата с инфекции. Освободената от Hb молекула на кислород има бактерицидни свойства. Обаче в случаите на екстремна анемия доставеното от червените кръвни тела количество O₂ е недостатъчно. Предлагания метод на лазерно-индуцираната оксигенация на тъканите може да бъде успешно приложен и при подобни инфекции, доставяйки допълнителни количества кислород .

Подобен подход може да бъде използван и за локално въздействие върху поражения на кожата, като рани и изгаряния. При подобни поражения липсата на кислород в тъканите е драстична и допълнителното количество кислород е крайно необходимо.

5. Други дейности

Защитена дисертация

Резултатите от проекта са част от успешно защитена дисертацията на д-р Ирина Близнакова, редовен докторант в ИЕ, под научното ръководство на проф. д-р Лъчезар Аврамов.

Защитили дипломанти

В рамките на проекта бяха защитени седем дипломна работа за магистър по Физика, специалност Медицинска Физика към Физически Факултет на СУ „Св. Климент Охридски”.

Б. Научно-изследователска част

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Оптична спектроскопия на биологични тъкани и обекти

1.1. Флуоресцентна спектроскопия с времево разрешение

1.2. LIBS спектроскопия

1.3. Оптична биопсия на кожа

1.4. Разработване и тестване на спектрални еталони за диагностика на кожен рак

2. Оптична томография в биологично-подобни мътни среди

2.1. Създаване на експериментална установка

2.2. Експериментални изследвания и резултати

2.3. Измерване на малки промени в оптичните свойства на мътни ингредиентни тела спрямо заобикалящата ги среда

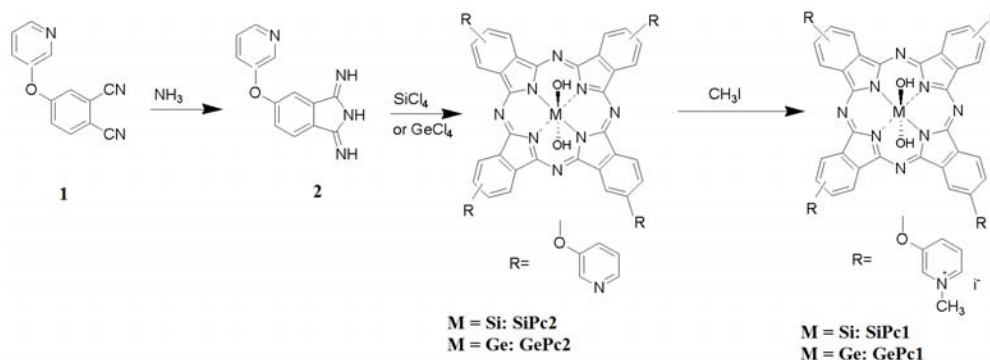
1. Оптична спектроскопия на биологични тъкани и обекти

1.1. Флуоресцентна спектроскопия с времево разрешение

В рамките на тази дейност са изследвани и получени резултати за времената на живот на новосинтезирани фотосенсибилизатори и са изследвани техните особености в различни преносни системи и комплекси.

През отчетния период бяха получени и изследвани нови водно-разтворими фталоцианинови комплекси на силиций и германий, които са нови за целите на фотодинамичната терапия. Получените фталоцианинови комплекси се характеризират с еднороден химически състав, с дефинирана химична структура и възможните ѝ изомерни форми (позиционни изомери). Определени са фотофизичните свойства на абсорбция и флуоресценция в далечната червена спектрална област със характеристиките на мономерното състояние за силициевия комплекс и агрегат за германиевия комплекс. Фталоцианиновата молекула позволява и са използвани различни структурни модификации по периферията на макроцикъла и при координирания метален йон (силиций и германий), които модулират силно хидрофобната природа на хетероцикъла на фталоцианина.

На базата на показалия висок фотодинамичен ефект водно-разтворим *метилпиридилокси*-заместен комплекс на цинка, $ZnPcMe$, бяха синтезирани новите комплекси на Si (IV) и Ge(IV), които имат *метилпиридилокси* функционална група в периферна позиция и две хидроксилни групи в аксилна позиция (Схема 1). Синтезите бяха провеждани съвместно с проф. Д. Вьорле от университета в Бремен, Германия в по съвместен проект по синтез на фталоцианини. Всички комплекси бяха напълно химически охарактеризирани, следвайки известните спектроскопски техники – електронна, ИЧ, мас спектроскопия. Така получените съединения са показани на Фиг.6.

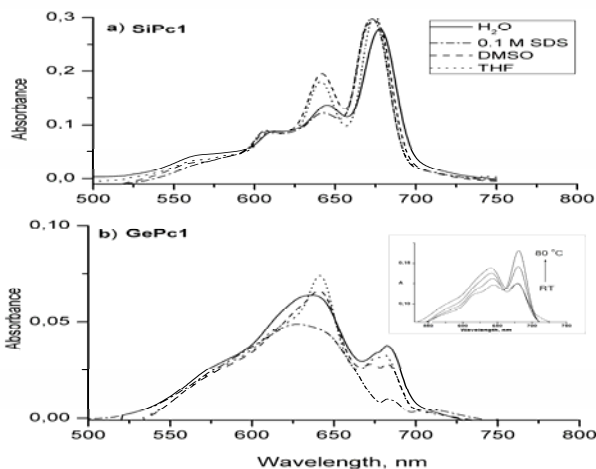


Фиг.6. Получаване на Si(IV)- и Ge(IV)- фталоцианинови комплекси

За получаване на новите съединения проведохме целенасочен синтез по модифицирана реакционната схема, която включва двустепенна процедура на първи етап циклотетрамеризация и на втори етап алкилиране с метил йодид. Реакционните условия са нов подход за фталоцианиновата химия, т.к. включването на силиций и германий в макроцикъла изисква висока енергия. Комплексите бяха получени с високи добиви и химическа чистота. На всеки етап от синтеза получените съединения бяха доказвани с познатите спектроскопски методи на UV-vis, NMR и MALDI-TOF, ESI-MS.

Получените фталоцианинови комплекси бяха охарактеризирани като фотосенсибилизатори по механизъм тип II в моделна реакция за получаване на синглетен кислород с т. нар. „Furane”-тест. Бяха проведени детайлни фотохимични изследвания за квантови добиви на генерирания синглетен кислород и радикали (ROS). Резултатите показват, че комплексите на Si(IV)- и Ge(IV)- имат относително високи стойности на генерирания синглетен кислород в зависимост от разтворителя – диметилсулфоксид, вода, тетраhydroфуран. Формирането на димери, тримери и по-високо организирани агрегатни форми, което е и основен проблем на фталоцианиновата химия, също беше оценено и се наблюдават агрегатни форми при микромолярни концентрации от тези съединения.

За новополучените комплекси бяха установени подобрени фотофизични параметри на абсорбция с относително висока моларна абсорбируемост ($\epsilon > \log 5$), както и параметри на флуоресценция с максимум на емисия при 685-695 nm и флуоресцентни квантови добиви около 0.2. И двата комплекса съдържат хидроксилни групи при металния йон, които вероятно също допринася за дезагрегирането. При различни концентрации на съответния комплекс и за различни органични разтворители само SiPc1 съществува като мономер (Фиг. 7).



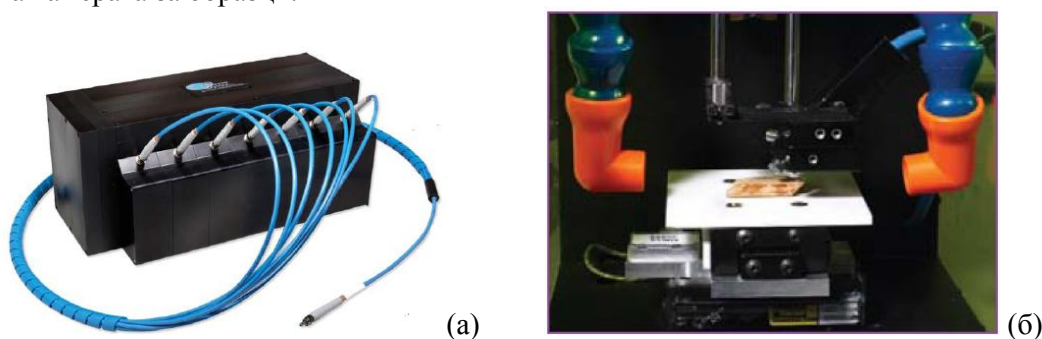
Фигура 7. UV-vis спектри на тетра- заместени Si(IV)/ Ge(IV)- фталоцианинови комплекси в DMSO и вода

В заключение може да се обобщи, че водни разтвори на фталоцианинови комплекси на силиций могат да бъдат успешно прилагани за фотодинамична терапия и други биомедицински цели, поради наблюдаваното мономерно състояние във водна среда.

1.2. LIBS спектроскопия

С помощта на закупената апаратура за лазерно-индуцирана искрова спектроскопия (Laser-induced breakdown spectroscopy - LIBS) в рамките на настоящия проект бяха изследвани спектралните свойства и атомния състав и особености на набор зъбни патологии, включващи кариозни лезии, одонтолитиазис, флуороза и бе извършен сравнителен анализ на получените резултати.

Системата е LIBS 2500Plus (Ocean Optics Inc.), състояща се от 7 канален спектрометър в диапазона 200 – 980 nm и разделителна способност 1,5Å. По оптични влакна се пренася детектирания сигнал от камерата на системата до спектрометъра, а възбуждането и генерирането на плазма се осъществява с Q-модулиран Nd:YAG лазер, 200 mJ в импулс. На Фиг.8. са представени общия вид на седем-каналния спектрометър и на камерата за образци.



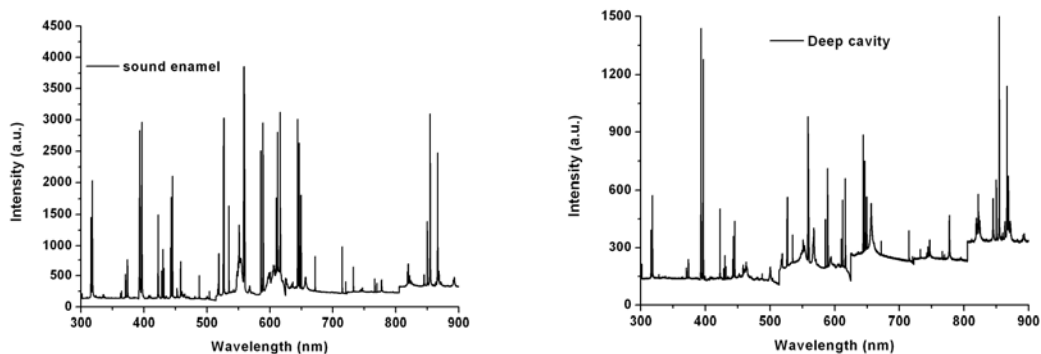
Фиг.8. (а) 7-канален спектрометър за LIBS изследвания; (б) камера за образци за LIBS анализ

Получените атомни спектри се записват като ASCII формат файлове за последваща обработка. Бяха изследвани *in vitro* зъбни образци, както следва:

Образец	брой
White spot lesion	7
Brown spot lesion	31
Superficial cavity	9
Medium depth cavity	6
Deep cavitation	12
Odontolithiasis	18
Fluorosa dentis	21
Pure enamel	16
Pure dentine	18

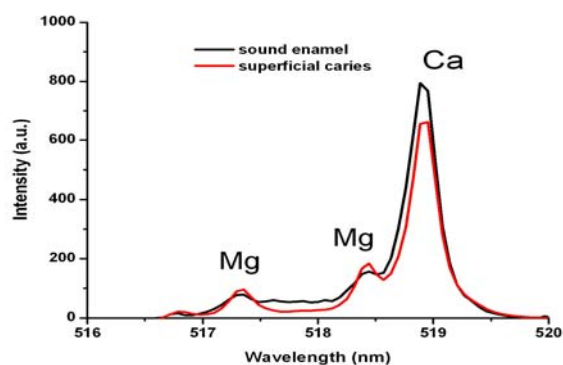
Наблюдавани са основно линии на Ca и P, свързани със състава на зъба, или точно с хидроксиапатитът, който е основен минерален градивен елемент на тези тъкани. При засегнати от кариозни лезии зъби бяха наблюдавани следи на C, Zn и Cu, които корелират с повишаването на количеството порфирины, органична материя, бактериална флора, свързана с кариозната маса. В образците с одонтолитиазис са наблюдавани Mn, Cu, Fe; а следите от елементи като Sn, Ti, Ag по литературни данни, са обвързани с влиянието на използването на паста за зъби с високо съдържание на тези елементи. Микроелементите– Na, Al, K, Mg, Si, H – са свързани с процесите на йонна обмяна,

наблюдавана при деминерализация на кариозните зъби. На Фиг.9. са представени LIBS спектри на здрав зъбен емайл и на дълбок кариес. Наблюдава се и цялостно намаление на LIBS сигнала, дължащ се на общата деминерализация на образците с развитие на кариозните патологични изменения.



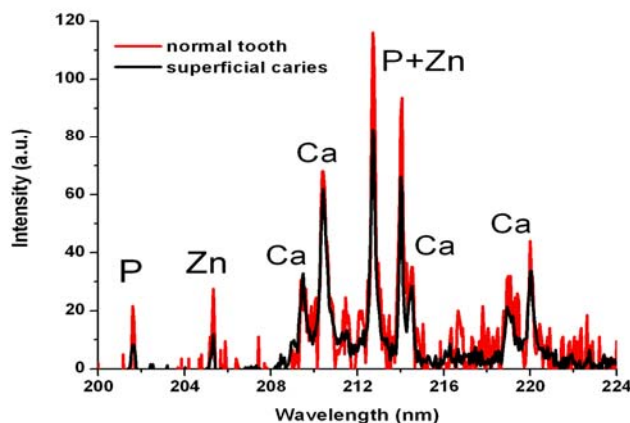
Фиг.9. LIBS спектри на (а) здрав зъбен емайл и (б) дълбок кариес

При детайлно разглеждане на получените атомни емисионни спектри могат да се открият и други основни тенденции, свързани с типа патология, както следва:



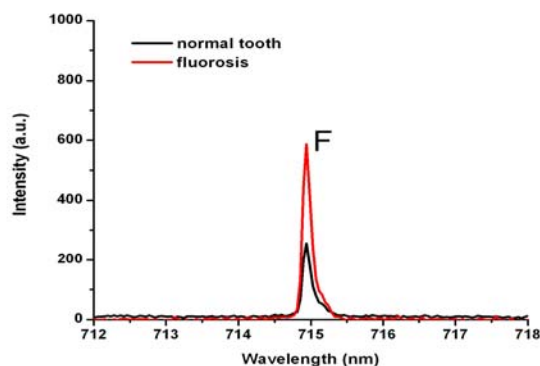
Фиг.10.a

1) Наблюдават се процеси на йонен обмен – като Mg замества Ca в хидроксиапатита на зъбите и интензитета на Ca линии намалява, а на Mg съответно се увеличава с развитието на заболяването. Получените съединения при този йонен обмен са по-силно разтворими от първоначалната фаза, което води до по-бързо разрушаване на зъбната тъкан с течение на времето;



Фиг.10.б

2) Наблюдава се увеличение на интензитета на линиите на Zn и P, свързани с натрупването на органична маса и продукти на бактериалния метаболизъм.



Фиг.10.в

3) Наблюдавано е рязко увеличение на концентрацията на F при флуороза дентис, поради йонен обмен с Ca.

Тези, както и други тенденции и изменения на LIBS спектрите на различните степени на развитие на кариес е планирано да бъдат използвани за разработка на система за спектрален мониторинг в реално време на лазерна терапевтична система за третиране на кариеси. Накратко, в таблица 1 са обобщени основните тенденции, наблюдавани при LIBS спектрите на здрави и кариозни зъби и съдържанието на дадени елементи в тях.

Елемент	Нормален зъб	Кариозен зъб	Източник на измененията/ процес
Ca	високо	намалява	демнерализация
P	високо	расте	йонен обмен
Mg	микро	расте	йонен обмен
C	високо	расте	органична материя
Fe	микро	расте	кръв
Na	микро	намалява	демнерализация
Zn	микро	расте	бактерия
Mn	микро	расте	йонен обмен
Cu	микро	расте	бактерия
Al	микро	расте	йонен обмен

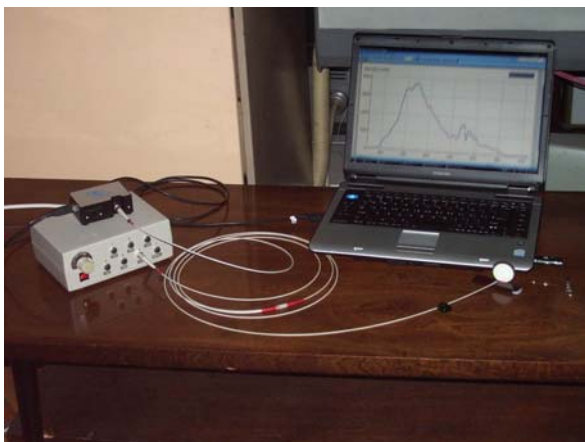
Таблица.1. Основни елементи в зъбите, тенденции на изменение на тяхното съдържание при развитие на кариес, източници и процеси, водещи до тези изменения

Резултатите от тези изследвания са представени на доклади на международни конференции. Предстои оформянето им като научна статия.

1.3. Оптична биопсия на кожа

През първата година на проекта бе започнато и през втория етап на проекта продължава провеждането на поредица измервания на спектралните свойства на различни кожни доброкачествени и злокачествени новообразувания, съвместно между ИЕ-БАН и УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ”. Целта е създаването на база данни за широк кръг доброкачествени и злокачествени новообразувания. Създаването на експерименталната апаратура за флуоресцентна и отражателна спектроскопия бе резултат от предходен проект към ФНИ-МОН – МУ-Ф-03/05, а по текущия договор ДО-02-112/2008 се

организират и провеждат изследвания, свързани с създаването на база данни за спектралните свойства на широк кръг тъканни патологии, създаването и апробирането на диагностични алгоритми, както и стъпки за внедрението на разработените апаратура и методики за анализ в клиничната практика на партньорските организации. На фигура 11 е представена апаратурата за оптична биопсия на кожни тумори.



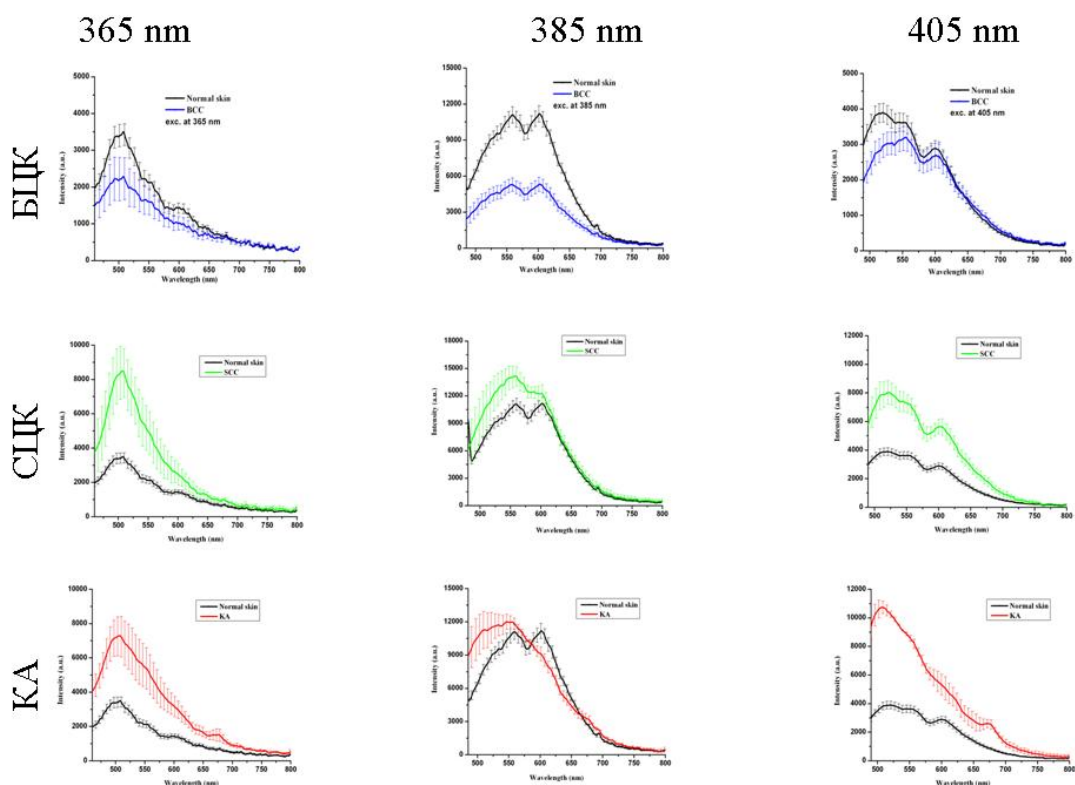
Фиг.11. Източник на възбуждане за флуоресценция, спектрометър, оптичен сноп, състоящ се от 6 влакна, отиващи към източника на възбуждане и 1 влакно към спектрометъра и компютър

За флуоресцентна спектроскопия се използват тесноивични светодиоди, със следните основни параметри:

$\lambda_{exc.}, (nm)$	$\Delta\lambda (nm)$	$\Theta_{1/2} (^\circ)$
365	10	10
385	10	10
405	15	10
440	20	15
630	15	10

За дифузно отражателна спектроскопия на кожа се използва широкоспектърен източник на светлина- халогенова лампа в диапазона 380-900 nm.

В представената по-долу Фиг.12 са дадени средните стойности на спектрите на флуоресценция на три основни типа немеланомни тумора- базоцелуларен карцином, спиноцелуларен карцином и кератоакантом за три различни дължини на вълните на възбуждане, сравнени с флуоресцентни спектри на здрава кожа. Ясно се различават основните тенденции при тези туморни образувания, които се използват за диагностични цели и диференциация на вида на патологията.



Фиг.12. Сравнение на автофлуоресцентни спектри на кожа в норма и патология – базоцелуларен карцином (БЦК), спиноцелуларен карцином (СЦК) и кератоакантом (КА) за различни възбуждащи източници

Основните тъканни флуорофори, идентифицирани при експериментите и при направения обширен литературен анализ са представени в таблицата по-долу:

Таблица.2. Основни тъканни флуорофори и техните максимуми на възбуждане и флуоресценция

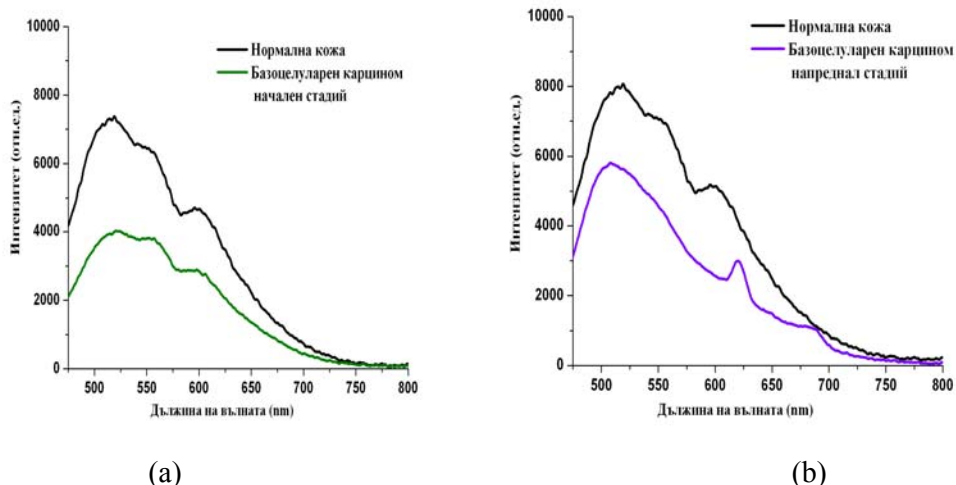
Compound	Excitation max (nm)	Emission max (nm)
<i>Amino acids</i>		
Phenylalanine	260 nm	280 nm
Tyrosine	275 nm	300 nm
Tryptophan	280 nm	350 nm
<i>Structural proteins</i>		
Collagen	320 - 350 nm	400 - 440 nm
Elastin	290 - 325 nm	340, 400 nm
Collagen cross-links	380 - 420 nm	440-500 nm
Elastin cross-links	320-360, 400 nm	480-520 nm

Keratin	450 – 470 nm	500 – 530 nm
<i>Enzymes and co-enzymes</i>		
NADH	290, 350 – 370 nm	440-460 nm
NADPH	340 nm	460 nm
FAD, flavins	450 nm	500-540 nm
<i>Vitamins</i>		
Vitamin A	327 nm	510 nm
Vitamin D	390 nm	480 nm
Vitamin K	335 nm	480 nm
Vitamin B₆	320-340 nm	400 – 425 nm
<i>Lipids</i>		
Phospholipids	435 nm	540, 560 nm
Lipofuscin	340-390 nm	430-460, 540 nm
Ceroid	340 – 395 nm	430-460, 540 nm
<i>Porphyryns</i>		
Porphyryns	400-450, 630 nm	635-690, 704 nm

Благодарение на използването на автофлуоресцентна спектроскопия на немеланомни тумори бе получена възможност за систематизиране на данните за начален и напреднал стадий на развитие на туморните образувания. На базата на тези резултати стана възможно диференцирането на различни конкретни приложения, както следва:

1) определяне на фазата на развитие на тумора - при БЦК се наблюдава натрупване на ендогенни порфирины при развитие на туморното образувание, което позволява да се създаде схема за терапия на множествени БЦК при такъв тип пациенти.

На фигура 13 са представени сравнения между флуоресцентният спектър на здрава кожа със спектъра на базоцелуларен карцином в начален стадий, и между нормална кожа и базоцелуларен карцином в напреднала фаза.

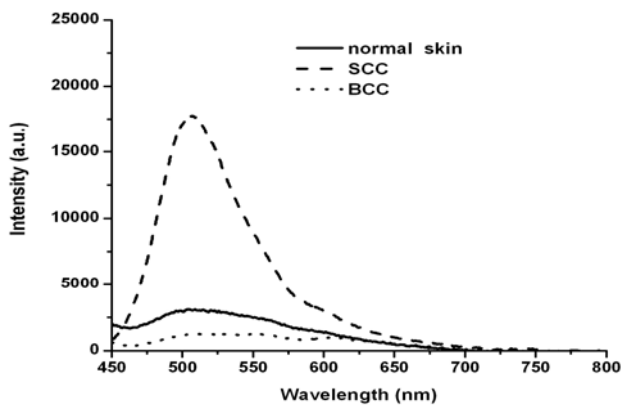


Фиг.13. Светлинно-индуциран спектър на флуоресценция на нормална кожа, сравнен с този на базоицелуларен карцином на 8 месеца (a); и с лезия от 2 години, използвайки възбуждане на 405 nm (b).

Наблюдава се максимум на флуоресценция в червената област 630-700 при базоицелуларен карцином в напреднало състояние. Такъв спектър беше получен при изследване на други 3 случая с базоицелуларен карцином в напреднал стадий на развитие (от година и половина или повече време). Този пик в спектъра се дължи на ендогенните порфирини, които се появяват в напреднала фаза от развитието на тумора.

2) При поточково сканиране на различни лезии се определят тумори от смесен тип – БЦК и СЦК, диспластичен невус и меланом и т.н., което е изключително важна информация за да се определи типа на последващата терапия.

Пример: Пациент от женски пол, 67 годишна възраст с неуспешна радиотерапия на БЦК на чело, с тумор с размери 3,8 cm x 7,6 cm, диагностициран клинично и хистологично като базоицелуларен карцином и третиран безуспешно в рамките на 2 години. След детайлизирано сканиране на лезията с флуоресцентна спектроскопия бе показано, че около 80% от повърхността на лезията е БЦК, а останалата повърхност е СЦК. След дискриминантната спектрална диагностика, беше заменен терапевтичния план на пациента и по последната информация, която имаме е получено значително редуциране на патологичната повърхност - 0,6 cm x 1,5 cm.



Фиг.14. Флуоресцентни спектри на БЦК и СЦК на тумор от смесен тип, сравнени със спектъра на околна здрава кожа на пациента

Използвайки този тип флуоресцентен спектрален анализ беше осъществено сътрудничество с колеги от Институт по Биофизика и биомедицинско инженерство към БАН в рамките на техен проект ДО-02-178/2008, където бяхме поканени за мониторинг на осъществяваната от тях електрохимиотерапия на кожни тумори в СБАЛОнкология – гр. София.

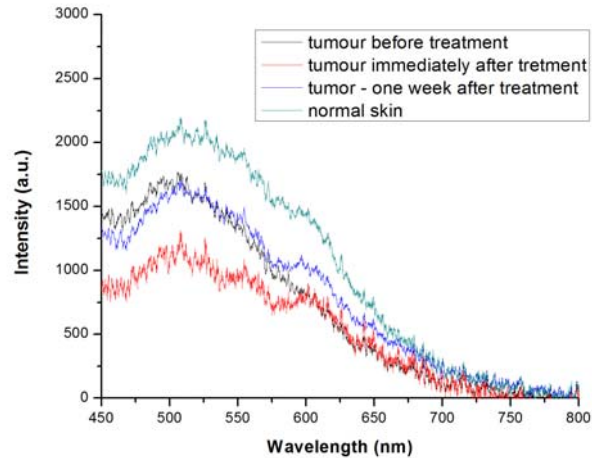
Във връзка с провеждането на терапевтичните процедури бе извършван спектрален флуоресцентен анализ на тумора, непосредствено преди процедурата по електрохимиотерапия, веднага след провеждане на процедурата и по време на проведените контролни прегледи, след една седмица, след един месец и евентуално – след три месеца от момента на провеждане на терапията.

Флуоресцентният спектрален анализ бе използван за начално неинвазивно диагностициране, както и за проследяване на ефекта от прилагането на електрохимиотерапията. При използваната светлинно-индуцираната флуоресцентна спектроскопия се снимат спектрите от лезията и от околна здрава кожа за сравнение, преди провеждането, непосредствено след терапевтичната процедура и при последващите контролни прегледи.

Основният максимум на флуоресцентия, в областта 470-510 nm се дължи на протеинови крос-линкове, дълговълновия максимум (540-590 nm) е свързан с флуоресценцията на кератин и фламини. Минимумът на сигнала на около 570 nm е свързан с пре-поглъщането на хемоглобина в кръвта. При провеждането на терапевтичната процедура се наблюдава увеличение на ефекта на препоглъщане на флуоресценцията на протеините и ко-ензимите от хемоглобина в кръвта (при пациента се наблюдава локално зачервяване). Седмица след процедурата обикновено се развива силна възпалителна реакция, свързана с успешното третиране на лезията – минимумът във флуоресцентния сигнал, дължащ се на хемоглобина е добре изявен. С течение на времето флуоресцентния сигнал се повишава по интензитет, което е индикатор за успешно третиране на лезията и формиране на съединителна тъкан (белег) при големи тумори.

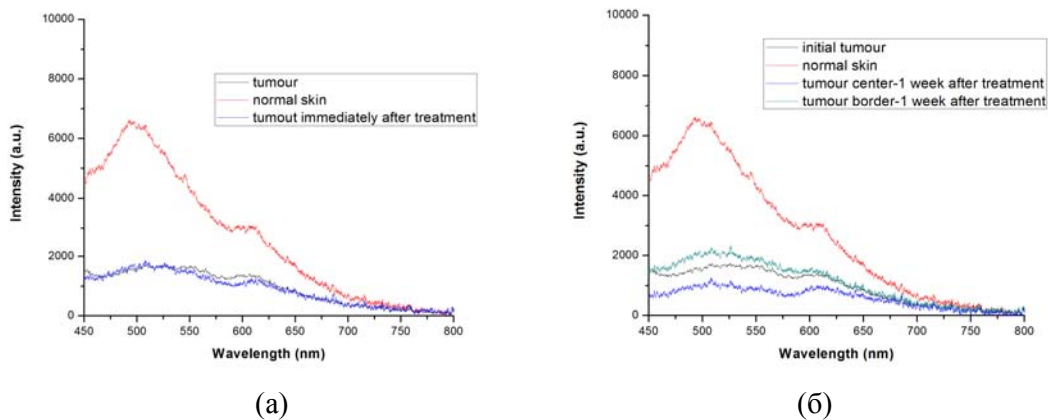
При базо-целуларните карциноми се наблюдава значително по-нисък интензитет на флуоресцентния сигнал спрямо здрава кожа; при спиноцелуларните карциноми – обратно – флуоресцентния сигнал е с по-висок интензитет и максимума на излъчване е отместен към зелената област при напреднали стадии на патологията.

На фигура 15 е показано сравнение на спектрите получени при детектиране на флуоресценцията на пациент преди и след третиране и една седмица след терапевтичната процедура. Първоначално туморът (БЦК) има по-нисък флуоресцентен сигнал от нормалната кожа. Ясно се вижда реакцията на тумора веднага след прилагане на терапевтичната процедура – поява на специфични минимума във флуоресцентния сигнал на 543 и 575 nm, свързани с увеличеното поглъщане на хемоглобина в кръвта. Седмица по-късно флуоресцентния спекър на тумора е с по-висок интензитет и се доближава по форма до този на нормална кожа, което е индикация за успешното третиране на лезията.



Фиг.15. Флуоресцентни спектри на базоцелуларен карцином и на нормална кожа на пациент при възбуждане на 365 nm преди процедурата, непосредствено след нея и след седем дни от провеждането на терапията.

На фигура 16 е даден пример за флуоресцентните спектри, получени от възрастна пациентка с множествени БЦК лезии. При тази пациентка беше наблюдавано подобрене след терапевтичната процедура в областта на границите на туморното образуване. В центъра не се наблюдава подобрене след една седмица, което доведе до втора терапевтична процедура за премахване на тумора.



Фиг.16 Флуоресцентни спектри на базоцелуларен карцином на пациент при възбуждане на 365 nm (а) преди процедурата и непосредствено след нея в момента на приключване на процедурата по електрохимиотерапия; (б) Сравнение на флуоресцентния сигнал една седмица след третиране в различни участъци на лезията и на нормална кожа.

Процедурата за флуоресцентна диагностика на кожните тумори позволява освен начална неинвазивна диагноза на кожната патология и детектиране на първичната терапевтична реакция на кожата, така и планиране на повторение на терапевтичните процедури при необходимост.

1.4. Разработване и тестване на спектрални еталони за диагностика на кожен рак

Наши предходни изследвания на отразени и емитирани спектри от кожни лезии показаха, че е възможно за всяко заболяване да бъде синтезирано еталонно спектрално разпределение. Това се дължи на сходните изменения в тъканта пораждащи сходни

отклонения в тествания спектър. Освен това, различните типове кожен рак имат вариации в спектрите, които са типични за тях.

Основните проблеми, които възникват в анализа на данните, произлизат от налични изменения в спектрите получени от различни пациенти с едно и също заболяване. Факт, който е отбелязан в редица публикации и на други автори. В допълнение към това, резултатите от нашите изследвания показват зависимост на спектрите от нивото на пигментация на лезиите, което е типично за някои нехомогенно пигментирани увредени области. Всичко това води до две насоки на развитие на работата обобщени до:

- Първо – наличие на вариации в промените за различни пациенти. Това означава, че вариациите – резултат от заболяване, трябва да бъдат подчертани и в същото време индивидуалните пациенти, трябва да бъдат елиминирани и
- Второ – размерът на петно на тестваната светлина сравнен с размера на лезията е относително малък. Това предполага, че данни могат да бъдат получавани от центъра на увредената зона и от периферията и; освен това има още едно разделяне – тестване на по-силно и по-слабо пигментирана част във вътрешността. Доколкото това се обвързва с различна степен на увреждане, може да се предположи, че еталонните спектри за едно заболяване могат да бъдат повече от един.

В процеса на работа бяха определени серии спектри-отношения за различни заболявания от данни за спектри от отражение и емитирани спектри от стимулирана флуоресценция с лъчение с максимум за 385 nm. За всяко заболяване бяха синтезирани еталони. Етапът на изследването е насочено към определяне на различията между тези еталонни спектрални разпределения и избор на подходящата методика за оценка на сходство. За целта е направен начален анализ на условията на регистрация и обработка като, спектралните разпределения са отделени в зависимост от

- здрава – увредена тъкан
- диагноза на заболяването
- различни пациенти
- позиция на тестваната област в границите на лезията.

Метод на изследване

Нашият метод на изследване се базира на хипотезата за еднакви промени в здрава и нездрава тъкан, като реакция от общи промени в организма. Така някои изменения в отразения/емитирания спектър могат да бъдат класифицирани като типични за цялата кожа на индивида. Това е причината, поради която ние ползваме спектър- отношение между спектри от здрава и увредена кожа за елиминирани на съвпадащите отклонения, типични за индивида и подчертаване на отклоненията резултат от увреждането. Праволинейно разпределение в спектъра – отношение ще отразява сходни промени, а всяко налично отклонение – характерни за заболяването изкривявания. На практика, критерият за поява на дадено отклонение, респективно –заболяване, е формата на спектъра-отношение.

Еталоните за различните заболявания са синтезирани чрез осредняване на спектри-отношение за пациенти с една и съща диагноза след нормиране към локалния максимум в разпределението.

Следващата стъпка е осигуряване на значещи разлики, отличаващи всеки еталон от останалите. За целта са използвани два метода:

Традиционна взаимна корелация по формула 1

$$(1) \quad r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - x_{iav})(y_i - y_{iav})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - x_{iav})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - y_{iav})^2}}$$

където γ_{xy} е коефициент на взаимна корелация, N – брой дължини на вълната, x_i, y_i – стойности за двойката спектри-отношение, x_{iav}, y_{iav} – средни стойности за всяко разпределение.

Вторият метод използва отново разпределение на отношение. Оценката на сходството между два еталона се дава след преобразуване на всеки от тях в точка в двумерно пространство, а числената стойност е разстоянието- дистанцията между двете точки.

На този етап от работата преходът към точка в равнина се прави по метода на спектралната колориметрия за определяне на координати на цветност, чрез използване на теглови коефициенти отговарящи на кривите за стандартен статистически наблюдател и акумулиране на получените стойности. Пресмятанията се правят по формули 2.

$$(2) \quad \begin{aligned} X &= \sum_{\lambda=380}^{\lambda=780} x(\lambda) \cdot f_{res}(\lambda) \cdot \Delta\lambda \\ Y &= \sum_{\lambda=380}^{\lambda=780} y(\lambda) \cdot f_{res}(\lambda) \cdot \Delta\lambda \\ Z &= \sum_{\lambda=380}^{\lambda=780} z(\lambda) \cdot f_{res}(\lambda) \cdot \Delta\lambda \end{aligned} \quad \begin{aligned} x &= \frac{X}{X+Y+Z} \\ y &= \frac{Y}{X+Y+Z} \end{aligned}$$

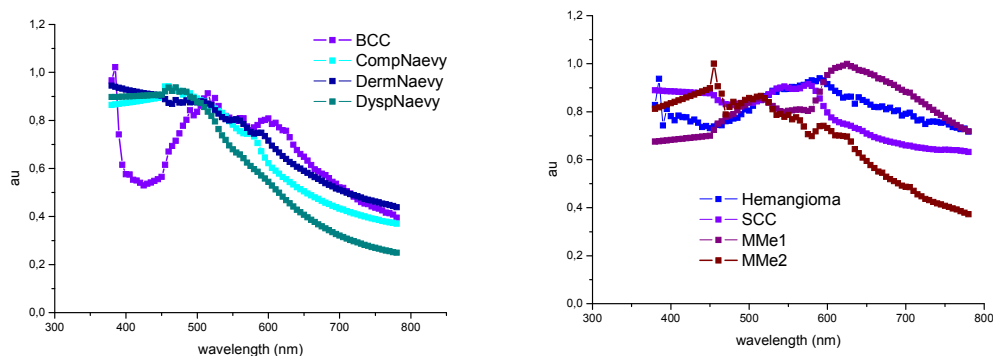
където XYZ са базовите колориметрични параметри; $x(\lambda), y(\lambda), z(\lambda)$ - спектралните коефициенти за стандартен наблюдател; f_{res} – разпределение на спектъра-отношение; $\Delta\lambda$ е интервала дължини на вълната използван за осредняване, x, y – координатите на точка в равнината на цветността.

Ако x_0, y_0 са координатите получени при разпределение – права линия, получено при сходни еталони, а x, y са координатите при всяко друго разпределение, то дистанцията между тях може да бъде пресметната по формула 3.

$$(3) \quad d = \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}$$

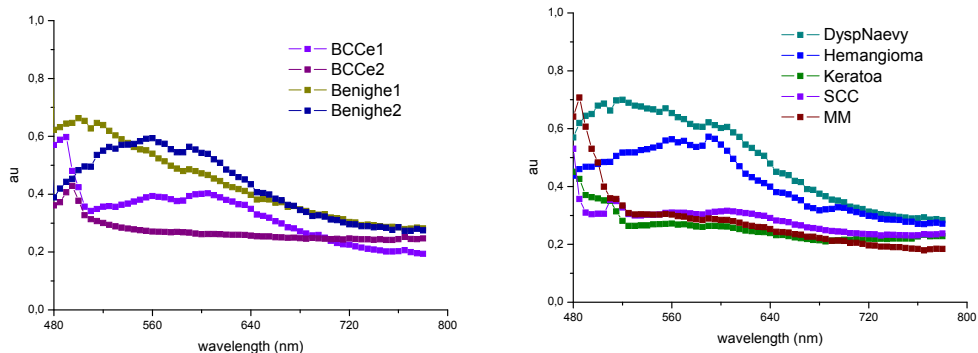
където с d е обозначено разстояние.

Сравнението между еталонните разпределения е направено за спектри получени при отражение на бяла светлина и излъчвателни спектри от флуоресценция, пресметнати след нормализация чрез деление на миксимальната за пациента спектрална стойност и осреднени по диагнози след сравняване за сходство. Броят налични спектри, позволи да бъдат определени еталони само за Basal cell carcinoma (BCC), Compound Naevy (CompNaevy), Dermal Naevy (DermNaevy), Dysplastic Naevy (DyspNaevy), Squamous cell carcinoma (SCC) и Malignant melanoma (MM). Друга специфична особеност беше получаването на два еталона за melanoma поради вътрешната структура на лезията. Синтезираните еталонни разпределения са дадени на фиг. 17.



Фиг.17. Синтезирани еталони за спектри на отражение

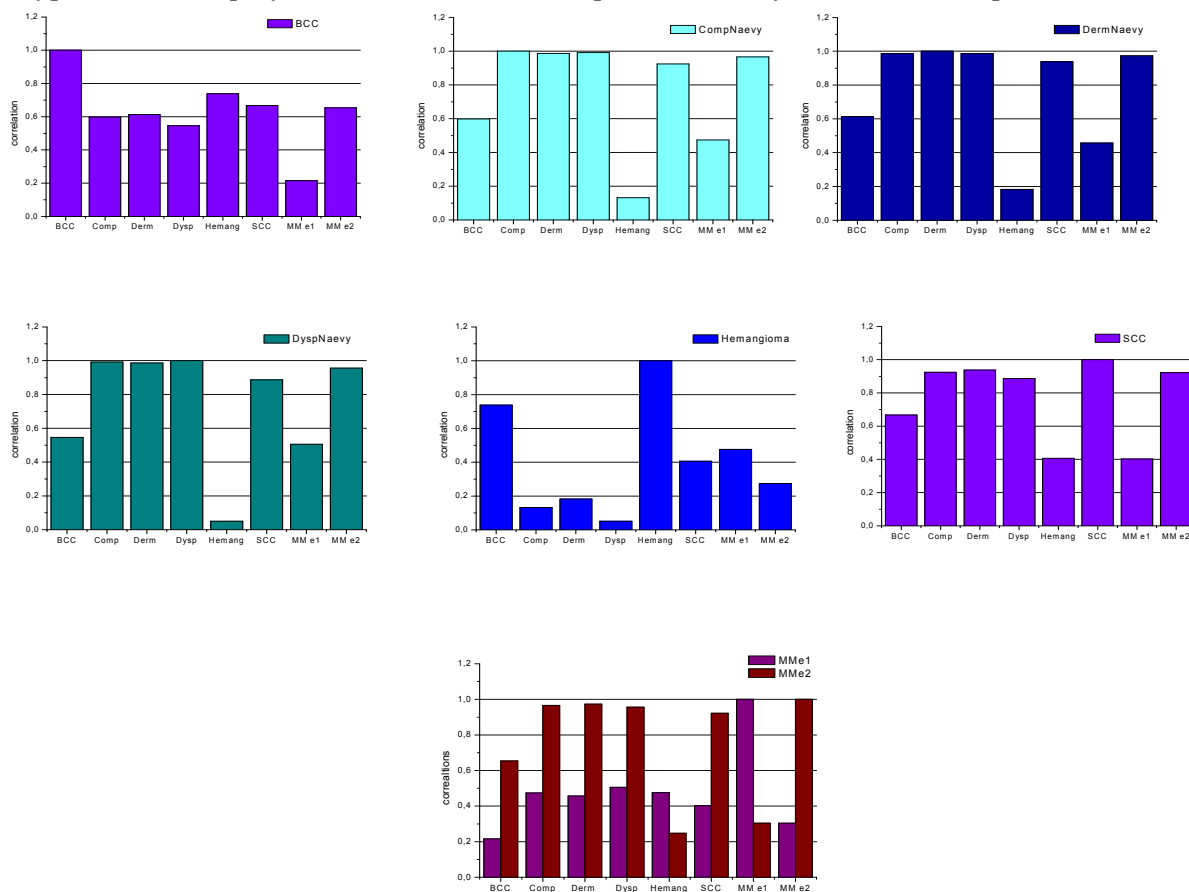
По същата причина, броят на флуоресцентните спектри даде възможност еталони да бъдат синтезирани само за: Basal cell carcinoma, Benign Naevy (Beng), Dysplastic Naevy, Hemangioma, Keratoacanthoma (Keratoa), Squamous cell carcinoma, Malignant melanoma. По същата схема след осредняването две от диагнозите - Basal cell carcinoma и Benign Naevy се появиха с по две еталонни разпределения. На фигура 18 са дадени еталоните, синтезирани за флуоресценция при стимулация с лъчение с максимум на 385 nm.



Фиг.18. Синтезирани еталони при стимулация с максимум на 385 nm

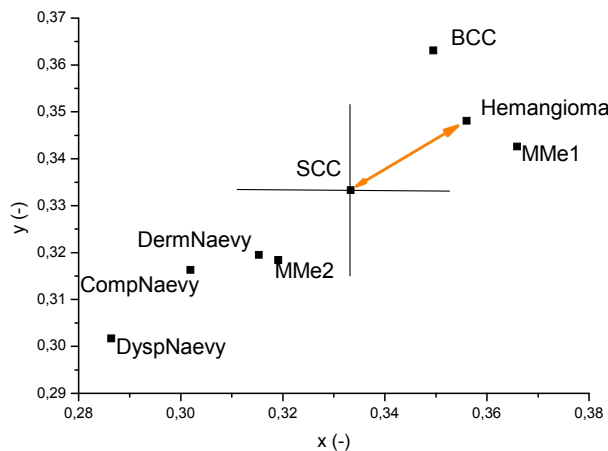
Резултати

По-долу са дадени получените резултати от определеното по двата метода сходство. Фигура 19 показва резултатите от взаимната корелация между еталоните за отражение.

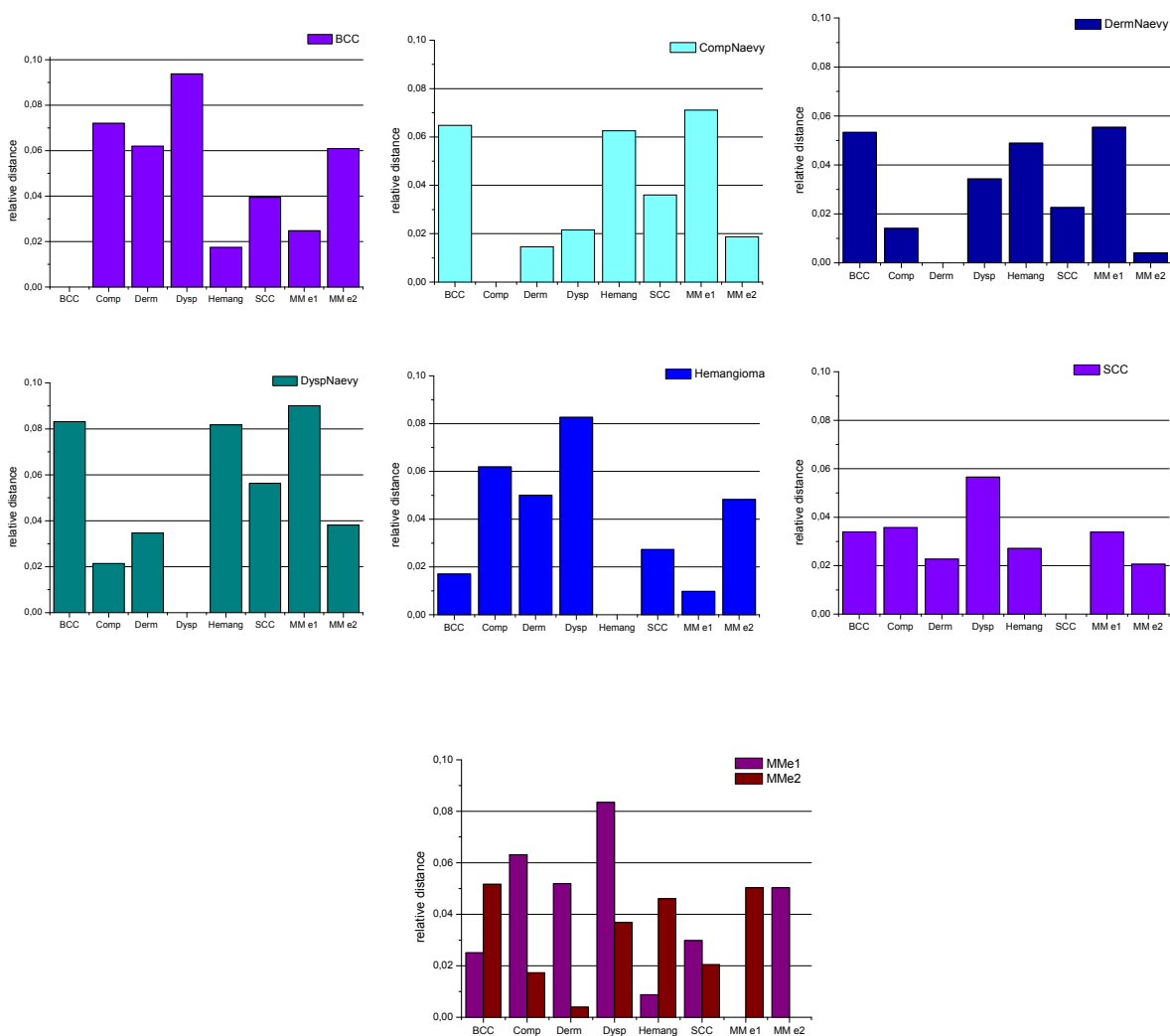


Фиг.19. Взаимна корелация между еталони при отражение

На фигура 20 е показана относителната дистанция в равнината на пресмятаните параметри с отбелязване между точките за SCC и Hemangioma; на фигура 21 са показани относителните дистанции до всеки еталон на останалите разпределения.



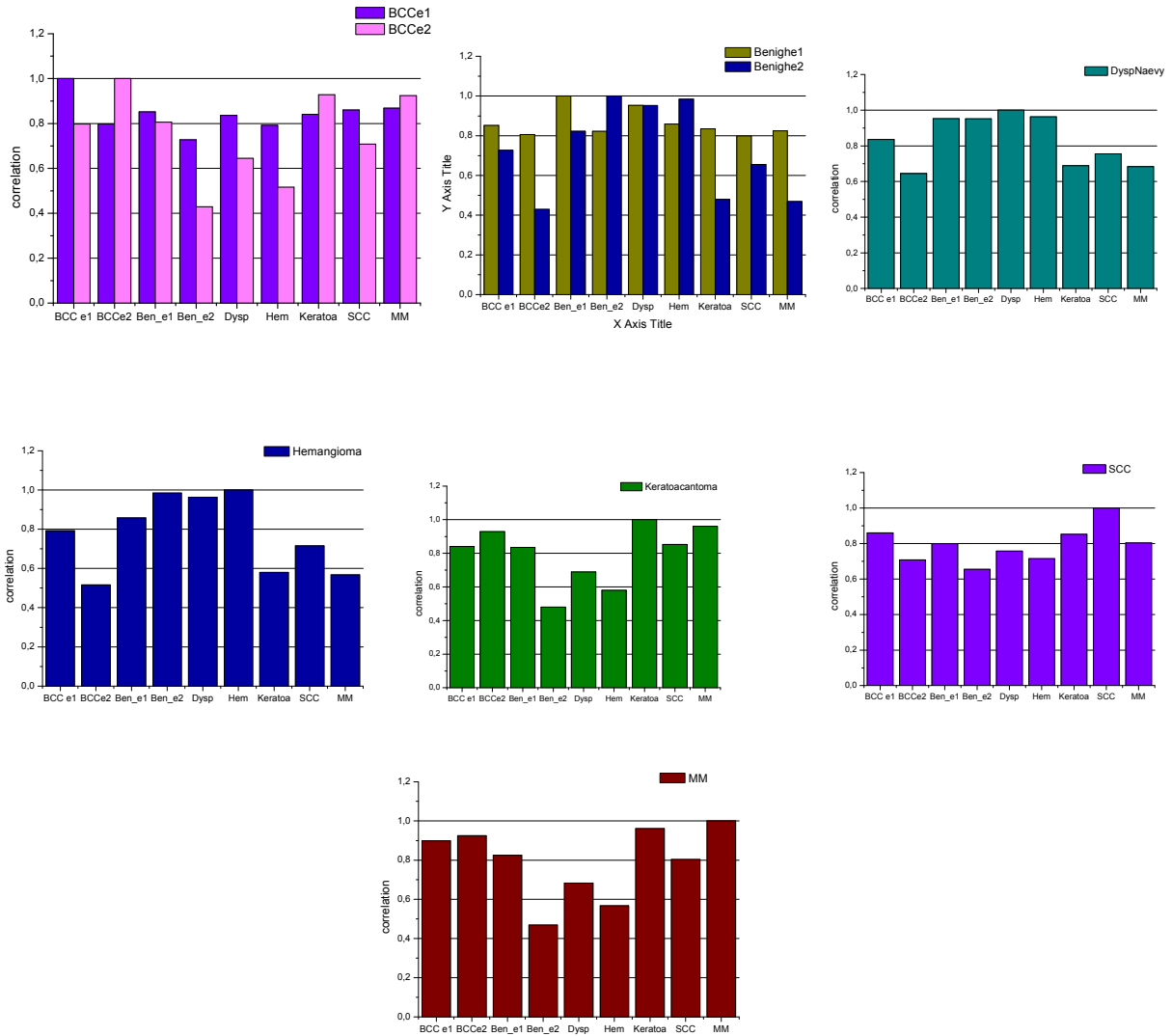
Фиг.20. Измерване на относителна дистанция



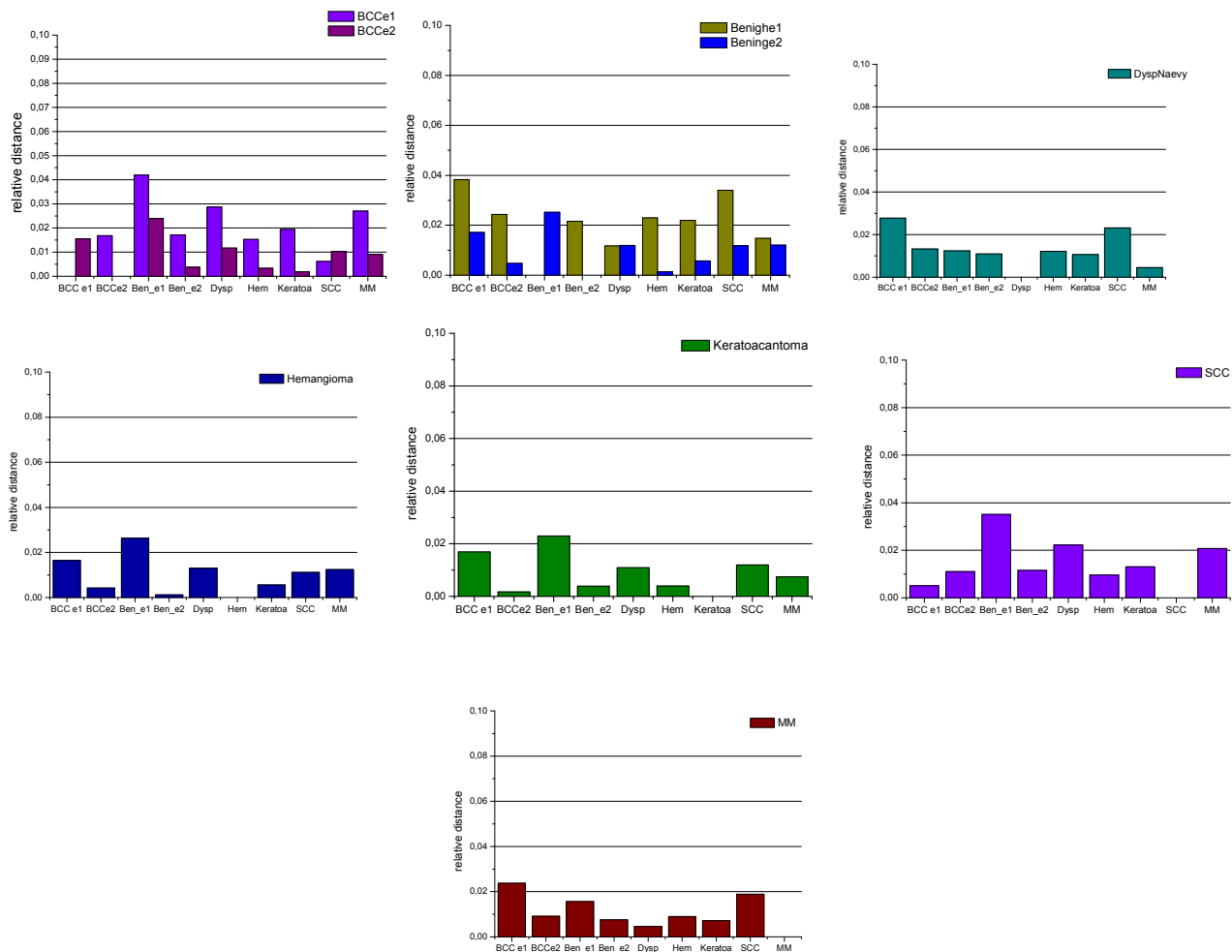
Фиг.21 Относителни дистанции между еталоните за отражение

Отчитайки резултатите за сходство, при еталоните за отражение най-трудно се отделят диагнози Dermal nevus и Malignant melanoma e2.

Резултатите за емитирани при флуоресценция спектри аналогично показват голямо сходство за някои еталони. На фигури 22 и 23 са дадени взаимната корелация и относителна дистанция при емитираните спектри.



Фиг.22. Взаимна корелация между еталони за емитирани спектри



Фиг.23. Относителни дистанции между еталоните при емитирани спектри

В този случай, най-трудно се отделят еталоните за BCC e2 и Keratoacantoma, и също така за Hemangioma и Benign nevus.

В обобщение и анализирайки резултатите може да се каже:

1. Сравнението на спектри –отношение дава добра възможност да се отделят еталонни разпределения, независещи от индивида.
2. Методиката за получаване на спектр-отношение може да се използва за получаване на критерий за сходство между две разпределения.
3. Методът за отчитане на дистанции в двумерно пространство е по-чувствителен към изменение във формата на разпределението в сравнение с метода на взаимната корелация. Той може да бъде оптимизиран чрез модификация на тегловите коефициенти при трансформацията към координати на точка.

Отчитайки коефициентите на взаимна корелация, ние считаме че еталоните за емитирани спектри все още не са достатъчно добре детерминирани. Постигане на подходяща модификация на получаването на отношение също може да подобри резултатите и да елиминира особеностите при регистрация на емитираните спектри.

На този етап, броят еталони за заболяване и точността при диагностиката зависи силно от недостатъчния брой налични спектри за някой заболявания.

1.4. Оптична томография в биологично-подобни мътни среди

Оптичната томография е важна съвременна изследователска област, към която са насочени надеждите за създаване на точни, безкръвни и безопасни методи за ранна диагностика на сериозни заболявания на човешките тъкани. Понастоящем се разработват и изпитват множество варианти на оптична томография, като напр. различни видове кохерентна томография [1,2], некохерентно, разделено по време оптично изобразяване [3-5], изобразяване на основата на фотонна миграция [6,7], и т.н.

Определянето на оптичните свойства на биологични среди чрез използването на различни видове *in vivo* техники за нуждите на ОТ е трудна задача, въпреки постигнатия прогрес в тази област през последните години. За това първата стъпка за решаването на тези проблеми е използването на *in vitro* техники, които дават добро приближение до реалната ситуация и могат да послужат за разработване на нови допълнителни методи за оценка на тези характеристики.

По литературни данни оптичните свойства на биологичните тъкани и по-конкретно патологичните образувания на млечната жлеза, в зависимост от метода на измерване и предварителната подготовка на изследвания образец, показват различни стойности от тезина здрава тъкан. Така например, за ракови лезии редуцираният коефициент на разсейване α_{rs} е с около 10-25% по-голям, в сравнение с този на нормална тъкан; за кисти той е с около 10-50% по-малък в сравнение с този на нормална тъкан; за фиброаденома той е с около 30-80% по-голям от този на нормална тъкан [8,9]. Поради тази причина, оценката на оптичните свойства на тъкани или тъканно-подобни мътни среди (фантоми) е от съществено значение за оптимизиране на съществуващите методи.

Силното разсейване на светлината в тъкани, в т.нар. терапевтичен диапазон води до намаляване на чувствителността на методите за оптична диагностика и съответно до трудно интерпретиране на измерения светлинен сигнал. Именно тези трудности налагат необходимостта от търсене на нови възможности за по-точна оценка на оптичните свойства на различните видове доброкачествени и злокачествени образувания в тъканите.

През последните няколко години, вследствие на сътрудничеството между лаборатория „Лазерна локация” и лаборатория „Биофотоника”, в Института по Електроника-БАН започна съвместна работа по разработването на нов метод за откриване и определяне на координатите на малки ингредиентни тела, поставени във фантом за приложения в ОТ. По време на работния процес, от първоначалната идея произлезе друго направление, свързано с изследване и оценка на оптичните характеристики на фантом и поставено в него малко ингредиентно тяло, имитиращо патологично образувание. За тази цел в настоящата работа са показани експериментални измервания на пространственото разпределение на разсеян напред светлинен сигнал на различни дълбочини във фантоми с различна степен на мътност. За получаване на пълната информация от изследвания обект са измерени следните зависимости на оптичния сигнал, при разпространението му мътната среда:

-D (Depth)-криви, при които се измерват дълбочинните зависимости на светлинния интензитет по оста на разпространение на лазерното лъчение в мътната среда;

-S (Section)-криви, при които се измерва напречното разпределение на светлинния интензитет за различни дълбочини, спрямо оста на разпространение на лазерното лъчение в средата. По измерените S-криви може да се получи информация за наличие или отсъствие на нехомогенност в средата.

1.4.1. Създаване на експериментална установка

Една от основните задачи през периода на договора бе създаването на експерименталната установка за определяне на оптичните характеристики на оптично плътни среди, наподобяващи биологични тъкани и най-вече на тъкани на гърда. Последното беше свързано с намерението да разработим оптичен метод за диагностика на

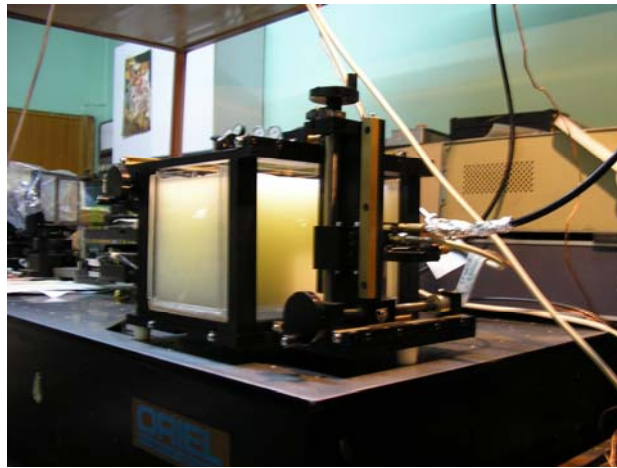
злокачествени образувания в гърда. Тези методи са особено актуални понастоящем, тъй като са напълно безвредни за човешкия организъм в сравнение с широко използваните рентгенови методи.

От физична гледна точка задачата за диагностициране на злокачествени образувания в гръдната тъкан се свежда до откриване и определяне на координатите и размерите на малки мътни обекти (тумори и др.) поместени в по-големи оптично мътни среди и оценка на тяхната специфичност от медицинска гледна точка (т.н. *specificity problem*). Първият проблем, за откриване и определяне на координатите и размерите на малки мътни обекти (тумори и др.) поместени на големи дълбочини, от 5-7см, в по-големи оптично мътни среди намери успешно решение при изпълнение на договора със Siemens Medical Solutions AG и заявените европейски патенти. В момента работим върху по-нататъшното усъвършенстване на нашия подход, развит в тези патенти. Тази задача не е завършена напълно и резултати от нея ще бъдат представени в следващите отчети.

Специално внимание през настоящия етап отделихме на експерименталната оценка на точността на измерване на оптичните характеристики на малките мътни обекти поместени в мътна среда. Тези изследвания, които ще продължат и през следващия етап са основни за решаване на втория проблем, посочен по-горе, а именно оценката на специфичността от медицинска гледна точка (т.н. *specificity problem*) на откритото малко образувание. Този проблем по начало не е решен в световната практика, най-вече що се отнася до използването на методите на оптичната дифузна томография на биологични тъкани.

Нашият подход за решаването на тази задача се свежда до развитие на не разрушаващи методи от типа *in-vivo* за измерване на малки разлики в оптичните характеристики на мътното образувание и мътната среда и сравнението с известни експериментални оценки, получени при измервания на злокачествени тъкани, извлечени и обработени по специфична методика от трупове и др. Получените по последния начин оценки показват например, че относителните разлики в коефициентите на разсейване на злокачественото образувание и мътната среда (здравата гръдна тъкан) са в границите на 20% до 80% за различните злокачествени образувания, като знакът и големината на тези разлики са специфични за всяко образувание. От тези съображения направихме оценката, че една точност на измерване от около 5% на разликата в оптичните характеристики на двете среди, с възможност да се измерва и знакът на разликата са една добра отправна точка при разработката на експерименталната установка и методиката за обработка на оптичните сигнали.

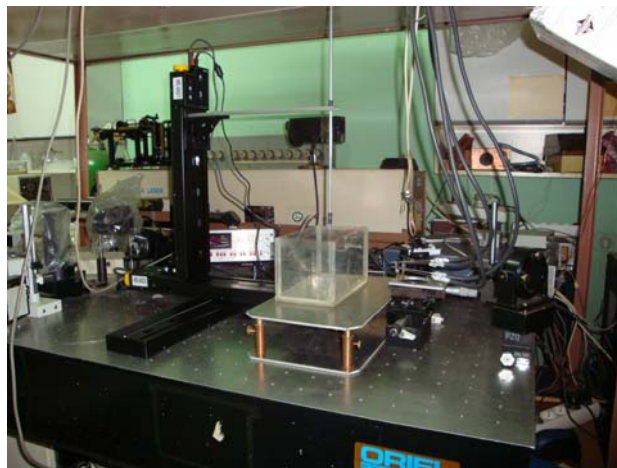
На Фиг.24. е представена фотография на експерименталната установка. Тя включва специална вана, запълнена с мътна среда с голям обем и оптични характеристики, съответстващи на тези на здрава гръдна тъкан и малка кювета, съдържаща малка мътна среда със зададени оптични характеристики по отношение на средата в обема на ваната. Като източници на лъчение са използвани два полупроводникови лазера, излъчващи на дължини на вълната 687nm и 850nm с изходна мощност в диапазона 3-50 mW, стабилизирани по мощност и с модулация на лъчението.



Фиг.24.

На следващите две фигури е показана усъвършенстваната компютризирана експериментална установка за измервания в оптично плътни среди, съдържащи малки също оптично плътни среди със зададени оптични характеристики и точно позициониране в тримерното пространство. Първоначално използваният фантом представлява прозрачен контейнер, направен от плексиглас с размери 12 x 22 x 12cm, напълнен с разтвори на обезмаслено мляко и мастна емулсия (10% и 20% Интралипид), с варираща концентрация в зависимост от характеристиките на тъканта. Впоследствие беше изработен по-голям плексигласов контейнер с кубична форма с размери 25 x 25 x 25cm. Във всеки от използваните разтвори са потопени малки стъклени колбички, пълни с разтвори на Интралипид с подходяща концентрация, имитиращи различни патологични образувания. Разсеяното напред лъчение се детектира с оптично влакно, движещо се в три измерения чрез използване на специално разработената за целта опто-механична система и закупената по-късно сканираща система, състояща се от три моторизирани компютърно-управляеми масички на фирмата Thorlabs модел LTS300 със следните параметри:

- дължина 300 мм.
- минимално постижимо нарастващо придвижване 0.1 μ m.
- минимално постижимо повтаряемо нарастващо придвижване 4 μ m.
- абсолютна по координатна точност 47 μ m.
- максимална процентна точност 0.12%.

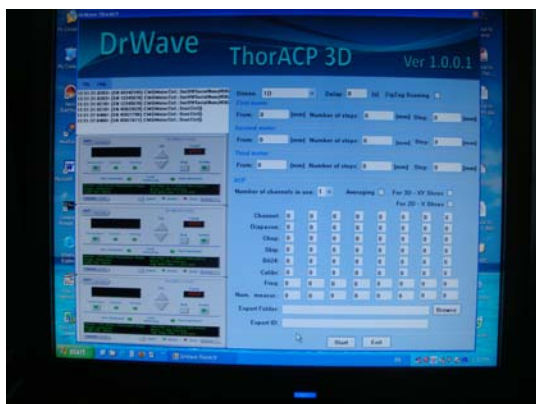


Фиг.25. Фотография на използваната опто-механична система и транслационна масичка за XYZ сканиране.

На Фиг.26.а и 26.б е показан графичният инструментален панел на свързаните през USB три масички, заедно с прецизен 24 битов АЦП – MD155. С помощта на програмен пакет, разработен специално за системата и параметрите, зададени от графичния панел, стъклената колбичка може да се придвижва с голяма точност в пространството.

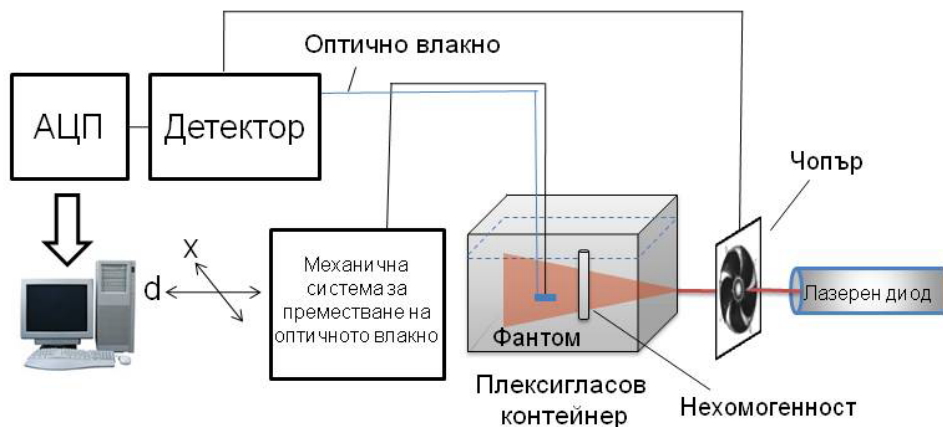


Фиг.26.а



Фиг.26.б

Изследвано е експериментално разпределението на интензитета (по оста на лазерния сноп и в напречно направление) на разсеяното напред лазерно лъчение в мътни среди. Измерванията са правени за две дължини на вълната, 687nm и 850nm, които са обещаващи за приложение в ОТ. Анализирано е също така и влиянието на малки обекти (с различни оптични характеристики), вградени в основната среда. Схемата на експеримента е показана на Фиг. 27.



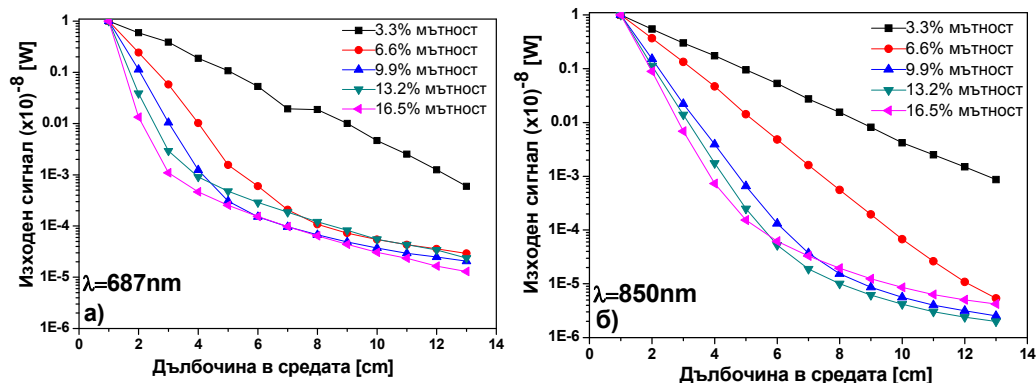
Фиг.27. Блок-схема на разработената експериментална установка.

1.4.2. Експериментални изследвания и резултати

Изследванията, резултатите от които са представени в този раздел, възникнаха като естествено разширение на предложения от нас оптичен томографски метод, базиран на регистриране на обратно разсеяното лъчение. За прилагането на метода, както и на други оптични томографски (ОТ) методи, с цел откриване и разпознаване на различни аномалии в тъкани е необходимо да познаваме оптичните характеристики на основната среда. Литературните данни за оптичните характеристики на тъканите показват значителни разлики, зависещи от методите на измерване и подготовката на материалите за изследване [10-12]. За тази цел, изследванията на разпространението на непрекъснато лазерно лъчение в мътни среди, подобни на биологични тъкани, е важно за развитието на нови методи и техники за по-точно определяне на оптичните параметри на тези среди, както и за откриване на различни доброкачествени или злокачествени образувания в тях.

3.1. Изследване на пространственото разпределение на лазерно лъчение в мътна среда при наличие на ингредиентно тяло в мътна среда

В тази част са представени експерименталните резултати от многократно разсеян светлинен сигнал при разпространението му в мътна среда при наличие и отсъствие на ингредиент в средата. На Фиг. 4 са показани D-кривите, получени при отсъствие на ингредиентно тяло, имитиращо образувание в изследваната среда. Оптичното влакно е поставено вътре във фантома, по оста на разпространение на лазерното лъчение, като дълбочината на която е поставено влакното се определя от предната стена на контейнера и края на влакното. Представените експериментални резултати са получени за двете дължини на вълната, 687nm (Фиг.28.а) и 850nm (Фиг.28.б) при изходна мощност $P_{out}=27mW$. За мътна среда в този случай са използвани концентрации от 3.3% до 16.5% на обезмаслено мляко, разтворено в 2300ml дестилирана вода.



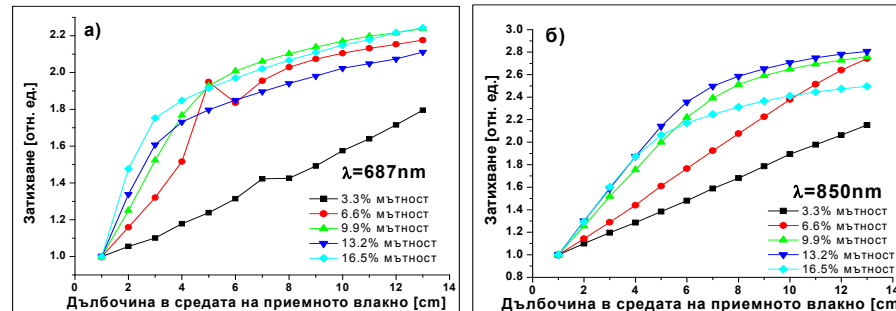
Фиг.28. Сравнение на D-криви за различни дълбочини на приемното оптично влакно вътре във фантома за дължини на вълната 687nm (а) и 850nm (б). Използваните концентрации на мляко са показани на графиките.

От показаните фигури се вижда, че и за двете дължини на вълната в измерените зависимости се наблюдават два участъка с различен наклон. За $\lambda=687nm$ първият участък отговаря на разстоянието от предната стена на контейнера до приблизително 3cm дълбочина на приемното влакно в средата, докато за $\lambda=850nm$ този участък се наблюдава до 6-7cm дълбочина на влакното. Наблюдаваните разлики в наклоните на тези зависимости и за двете дължини на вълната отговарят на стойностите на коефициентите на разсейване и поглъщане на такъв вид фантоми, дадени в литературата, а именно $\mu_s'=0.5mm^{-1}$ за $\lambda=680nm$ и $\mu_a=0.005mm^{-1}$ за $\lambda=850nm$.

Коефициентът на поглъщане μ_a за $\lambda=680nm$ е по-голям, в сравнение с този за $\lambda=850nm$, с което се обяснява по-бързото отслабване на сигнала, вследствие на силното

многократно разсейване при разпространението на светлината в такива среди. Наклонът на кривата за по-малката дължина на вълната е по-малък, отколкото този на по-голямата, което отговаря и на по-ниските стойности на коефициентите на разсейване по литературна справка ($\mu_s' = 0,5 \text{ mm}^{-1}$ за $\lambda = 680 \text{ nm}$ и $\mu_s' = 1,27 \text{ mm}^{-1}$ за $\lambda = 825 \text{ nm}$).

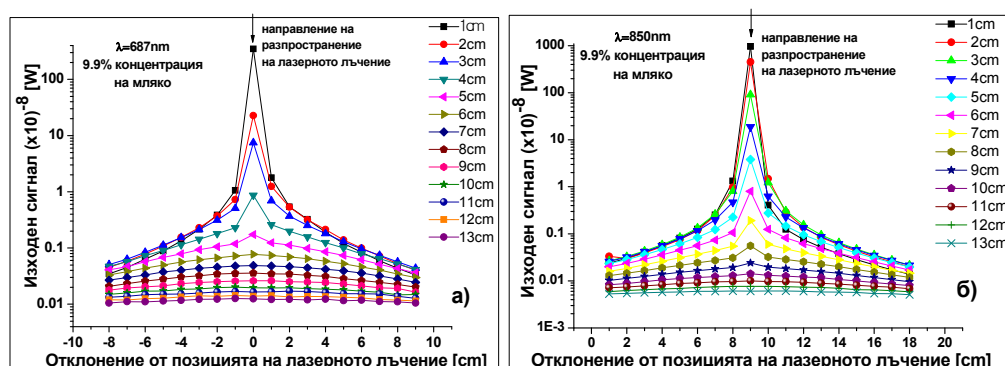
На Фиг.29. са показани пресметнатите по закона на Беер-Ламберт коефициенти на затихване за различни концентрации на мляко и за двете дължини на вълната.



Фиг.29. Сравнение на сигналите за различни концентрации на мляко за $\lambda = 687 \text{ nm}$ (а) и $\lambda = 850 \text{ nm}$ (б).

Показаните графики са нормирани към първата точка от измерванията за 1cm разстояние между източника на светлина и приемното влакно. За по-малките концентрации (от 3% до 6%) на мляко в средата законът на Беер-Ламберт е валиден, но резултатите показват, че при по-големите концентрации и дълбочини (>4-5cm) започват да се наблюдават значителни отклонения на измерения сигнал от този закон, дължащи се на многократното разсейване на светлината за тези дълбочини и по-голямата концентрация на мляко в нея.

На следващата Фиг.30. са показани експериментално измерените зависимости на напречните разпределения на светлинния интензитет (S-криви), спрямо оста на разпространение на лазерното лъчение в средата, за различни дълбочини на оптичното влакно от предната стена на контейнера.

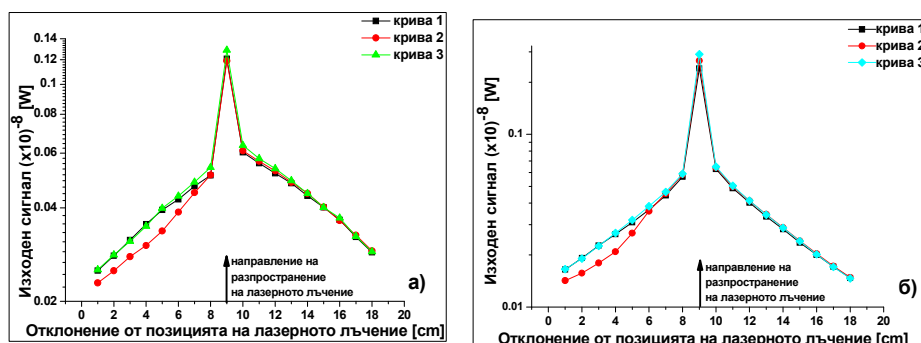


Фиг.30. Експериментално измерени S-криви за $\lambda = 687 \text{ nm}$ (а) и $\lambda = 850 \text{ nm}$ (б) за различни дълбочини и 9.9% концентрация на мляко в средата.

От показаните графики се вижда, че за S-кривите за 9.9% концентрация на мляко и за двете дължини на вълните се наблюдава еднакво поведение на измерените зависимости (Фиг.6). По-голямо разширение на лазерния сноп се получава за $\lambda = 687 \text{ nm}$, в сравнение с това за $\lambda = 850 \text{ nm}$. Добре изразено на тази фигура е пространственото разширение на S-кривите, с нарастване на дълбочината и за двете дължини на вълната. Също така, ясно се наблюдава и разсеяната напред компонента на лазерното лъчение за диапазона около 5cm

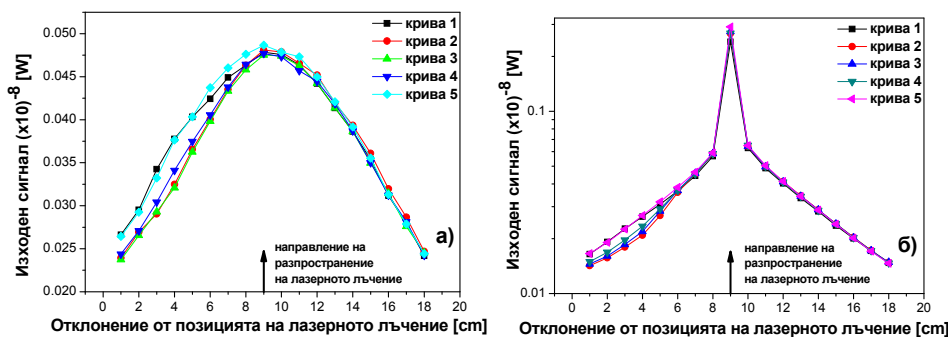
дълбочина в средата за $\lambda=687\text{nm}$, докато за $\lambda=850\text{nm}$, същата тази компонента се наблюдава за около 9cm дълбочина. Подобно поведение се обяснява с по-голямото проникване на светлината за по-дълговълновия диапазон на спектъра.

Ефектите от наличие и отсъствие на малко ингредиентно тяло върху измерени S-криви за среда с 6.6% мътност са показани на Фиг.31.



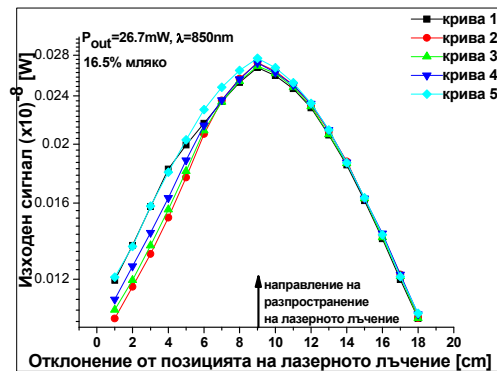
Фиг.31. S-криви за различни дълбочини на приемното влакно във фантома за $\lambda=687\text{nm}$ (а) и $\lambda=850\text{nm}$ (б) без ингредиент (крива 3) и с ингредиентно тяло във фантома (крива 1-100% чиста вода, крива 2-100% мляко) за 6.6% концентрация на мляко във фантома.

В този случай на ингредиентното тяло е поставено на дълбочина 3.5cm в средата и на 1.5cm отляво спрямо оста на разпространение на лазерното лъчение във фантома, като приемното оптично влакно е поставено на 7cm дълбочина във фантома. Експерименталните резултати, представени на Фиг.31 са за случая на среда с 6.6% мътност и поставен в нея ингредиент, който е напълнен със 100% чиста вода (крива 1), 100% мляко (крива 2) и крива 3, на която е показан вариант на фантом без наличие на ингредиент в него. Наблюдаваните отмествания в S-кривите отляво отговарят на мястото, където е поставено ингредиентното тяло в средата (Фиг.31 и Фиг.32). На Фиг.32 са представени резултати, при които са показани зависимостите за фантом без наличие на нехомогенно образуване (крива 5) и зависимости за фантом с наличие на ингредиентно тяло, напълнено със 100% чиста вода (крива 1), напълнен със 100% мляко (крива 2), 50% мляко (крива 3) и 25% мляко (крива 4). Позицията на ингредиентното тяло и оптичното влакно в средата остават същите, както по-горе.



Фиг.32. Експериментално получени S-криви за 9.9% мътност на фантома за $\lambda=687\text{nm}$ (а) и $\lambda=850\text{nm}$ (б) фантом без ингредиент (крива 5) и фантом с наличие на ингредиентно тяло, напълнено със 100% чиста вода (крива 1), напълнен със 100% мляко (крива 2), 50% мляко (крива 3) и 25% мляко (крива 4).

На показаните досега графики много ясно се вижда влиянието на ингредиентното тяло поставено в средата за различни концентрации на мляко и различни дълбочини във фантома, което от своя страна води до асиметрия от страната на ингредиента в измерените зависимости.



Фиг.33. Експериментално получени S-криви за 16.5% мътност на фантома за $\lambda=687\text{nm}$ (а) и $\lambda=850\text{nm}$ (б), фантом без ингредиент (крива 5) и фантом с наличие на ингредиентно тяло, напълнено със 100% чиста вода (крива 1), напълнен със 100% мляко (крива 2), 50% мляко (крива 3) и 25% мляко (крива 4).

Измерените експериментални резултати на S-криви за случаите на различни концентрации на мляко в средата показват, че наличието на малки ингредиенти във фантома водят до структурни промени във формата на измерените зависимости (Фиг.32-33). За сравнение с тези измервания и за по-ясното отчитане на наличието на ингредиент в средата са направени измервания и без наличието на такова тяло. Резултатите са сравнени с останалите за по-добра визуализация на наблюдаваните промени във формата на кривите. Проведени са и измервания с наличие на ингредиент, пълен с 100% чиста вода за определяне на влиянието на стъклените стени на колбичката. Получените резултати за случая на ингредиент, пълен с повече от 25% мляко показват намаляване на сигнала от мястото, където е поставен ингредиента. От друга страна, не се наблюдават изменения във формата на сигнала при липса на ингредиентно тяло.

Анализ и обобщение на получените резултати

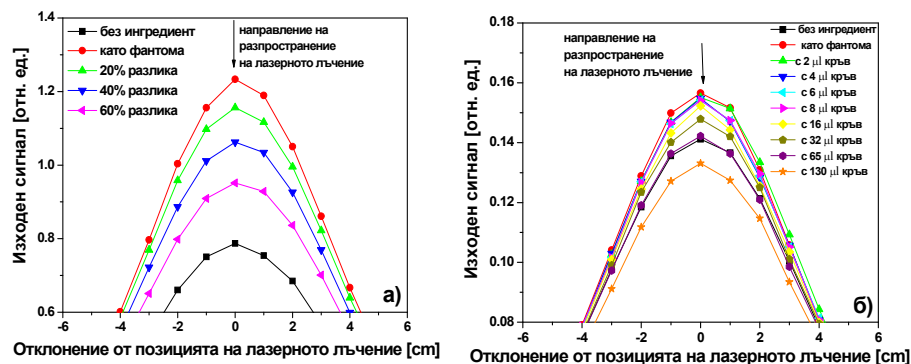
- От получените експериментални резултати се вижда, че напречното разпределение на интензитета на лазерното лъчение в дълбочина се разширява при наличието на ингредиент във фантома. Направени са измервания с и без наличие на такова тяло в средата като получените данни показват, че наличието на такова тяло води до измерими промени във формата на S-кривите. По този начин, на базата на тези резултати могат да бъдат направени оценки за позицията на поставената в средата нехомогенност. Като цяло тези измервания дават възможност за разработване на нови техники за определяне на оптичните характеристики на мътни среди и ингредиентно тяло, поставено в тях, позволяващи по-прецизно определяне на злокачествени и доброкачествени структури, въведени в меки биологични тъкани, като млечна жлеза и мозък.
- Като основен резултат може да се заключи, че наличието на ингредиентно тяло, с различни оптични свойства спрямо тези на заобикалящата го среда, може да се измери.

1.4.3. Измерване на малки промени в оптичните свойства на мътни ингредиентни тела спрямо заобикалящата ги среда

При провеждането на този тип изследвания са измерени S-зависимостите при наличие на ингредиентно тяло като сигналът се регистрира от приемно оптично влакно, поставено на 6cm от предната страна на контейнера и на 2cm разстояние от ингредиентното тяло. Като източник на светлина тук е използван CW лазерен диод, излъчващ на $\lambda=850\text{nm}$ и $P_{\text{out}}=27\text{mW}$. За направата на фантом, в този случай е използван 20% Интралипид[®], разтворен в 2300ml дестилирана вода. За получаване на разлики в оптичните свойства,

както на фантома, така и на ингредиентното тяло са правени измервания при различни концентрации на Интралипид[®], като за вариране на оптичния контраст в нехомогенността са добавени и малки количества кръв. И тук, полезният сигнал зависи от разликите в оптичните характеристики на фантома и нехомогенността, поставена в него, определянето на които изисква голяма точност, стабилност и чувствителност на измерването.

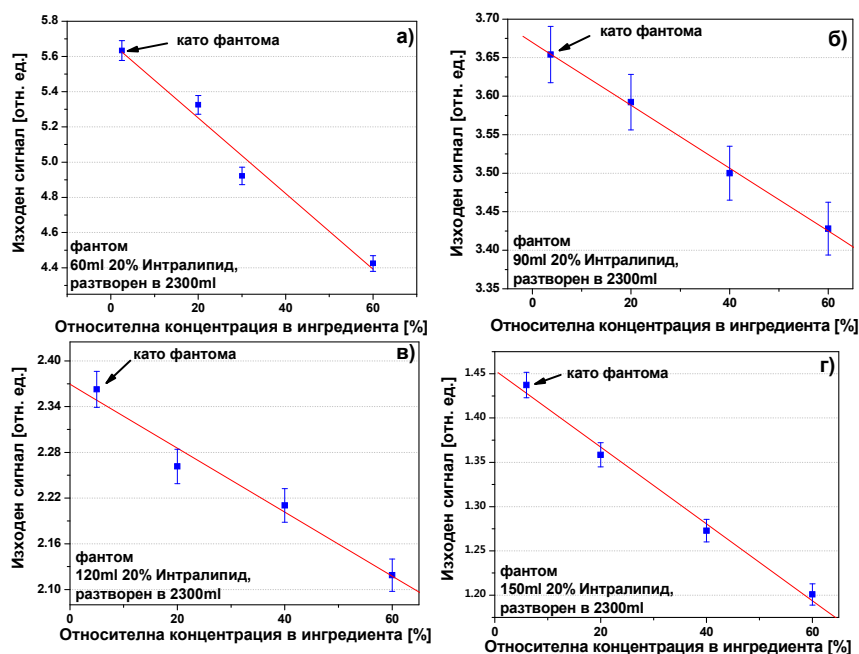
На Фиг.34.а са показани зависимостите на промените в оптичните свойства на ингредиентното тяло спрямо заобикалящата го среда, с максимален контраст от 60%. Анализирани са пет различни варианта, като първият от тях се състои в измерване на разсеян оптичен сигнал от фантом без наличието на ингредиент в него. След което са измерени зависимостите на сигнала от фантом с наличие на ингредиент в него със същата мътност, каквато е и на фантома, за отчитане на влиянието на стъклото на нехомогенността и по-ясното визуализиране на получените разлики в сигнала. Накрая, са измерени S-зависимостите с увеличаване на концентрацията на Интралипид[®] и кръв в ингредиентното тяло спрямо това на фантома (Фиг.34.б). Напречното разпределение на разсеяния напред светлинен сигнал за определена позиция на светлинния източник и ингредиентното тяло, поставено по оста на разпространение на лазерното лъчение във фантома е изследвано чрез сканиране в напречно направление на приемното оптично влакно вътре в изследваната среда. Най-ниската от представения набор зависимости отговаря на отсъствието на ингредиентно тяло във фантома. Въвеждането на нехомогенност в средата, напълнена със същия разтвор Интралипид[®], какъвто е и на фантома води до силно нарастване на сигнала, поради наличието на ефекта на стъклото на кюветата, използвана като нехомогенност. При последващо увеличаване на мътността на ингредиента спрямо тази на фантома (със стъпка 20%) води до намаляване на сигнала като резултат от увеличаването на степента на мътност.



Фиг.34. Експериментално получени S-криви за различни концентрации на Интралипид[®] (а) и кръв (б) в ингредиентното тяло за 60ml 20% разтвор на Интралипид[®], разтворен в 2300ml дестилираната вода.

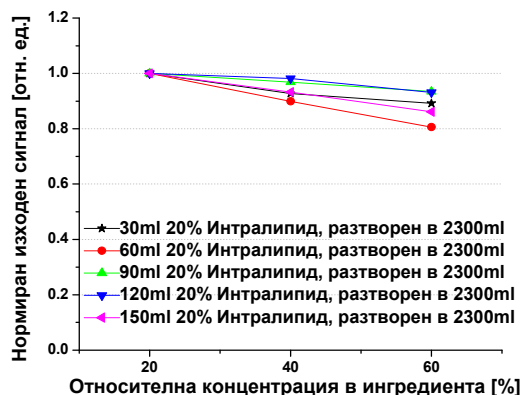
От получените експериментални данни се вижда, че предложеният от нас метод е достатъчно чувствителен за регистрирането на такива малки промени в оптичните свойства, както на фантома, така и на поставеното в него допълнително тяло. Наблюдават се добре изразени разлики между сигналите, отговарящи на 20% промени в мътността на ингредиента. Фиг.1б показва подобни експериментални измервания, но за постоянна концентрация на Интралипид[®] в ингредиента (равно на това на фантома), но с различни добавки на кръв. От получените зависимости много добре се вижда, че използваният от нас метод може да регистрира малки добавки от кръв към обема на ингредиента.

На показаните по-долу графики (Фиг.35) са показани промените в пълната разсеяна оптична мощност с увеличаване на относителната концентрация на Интралипид (от 20% до 60%) в ингредиента спрямо тази на фантома.



Фиг.35. Представяне на пълната разсеяна оптична мощност като функция от относителната концентрация на Интралипид® в ингредиентното тяло спрямо заобикалящата го среда за различни мътности на фантома.

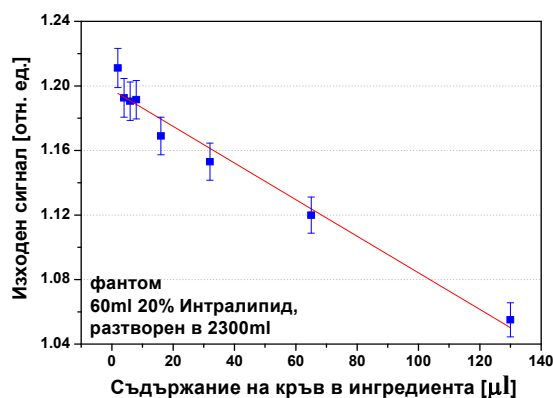
Предоставени са получените резултати за различни концентрации на Интралипид® на фантома (от 60ml до 150ml 20% Интралипид®, разтворен в 2300ml дестилирана вода). Както добре се вижда от представените зависимости, независимо от абсолютната концентрация на разсейващо вещество във фантома, съществува линейна зависимост на измерения оптичен сигнал като функция на относителната концентрация на Интралипид в ингредиентното тяло. На Фиг.36. са представени експериментални данни нормирани към малките концентрации на Интралипид в ингредиента. Разликите в наклона на кривите вероятно се дължат на някои малки грешки в дозировката на отделните концентрации на Интралипид® или някои нестабилности на системата, проявили се по време на измерванията.



Фиг.36. Нормиран изходен сигнал към по-ниските концентрации на Интралипид® в ингредиента за различни степени на мътност на фантома.

Сходството между така получените криви дава възможност за прилагане на получените резултати за определяне на фантоми към други среди с различна мътност. Пълната разсеяна оптична мощност, получена за случая на ингредиент с постоянна концентрация

на Интралипид® (равна с тази на фантома) и с различни добавки на кръв (от 2µl до 130µl, Фиг.16) е показана на следващата Фиг.37.



Фиг.37. Пълната разсеяна оптична мощност като функция на добавките на кръв в обема на ингредиента с постоянна концентрация на Интралипид®, равна на тази на фантома, в който е поставен (60ml 20% Интралипид®, разтворен в 2300ml дестилирана вода).

На тази фигура ясно се вижда влиянието на добавките от кръв към течния разтвор в ингредиента. Както на Фиг.35 и 36 и тук се наблюдава линейна зависимост на пълната разсеяна светлинна мощност от кръвния обем, подобно на това което беше наблюдавано при промяна на концентрациите на Интралипид® в ингредиента, т.е. така разработената експериментална установка регистрира малки добавки от кръв 10µl в обем, по-малък от 10ml.

Анализ и обобщение на получените резултати

- Така представените експериментални резултати показват възможността на разработения от нас метод да измерва относително малки промени в разсейващите свойства на ингредиентни тела, поставени вътре във фантома и имитиращи различните видове патологични изменения в биологичните тъкани.
- Показани са линейните зависимости на измерените промени в изходния сигнал за различни степени на мътност, както на ингредиента, така и на самия фантом. Като получените зависимости показват чувствителността на метода към промените в контраста на разсейването на ингредиента спрямо това на фантома.

3.3. Количествен анализ на експериментални данни, получени при разпространението на лазерно лъчение в мътна среда без наличие на ингредиентно тяло-Henyey-Greenstein и Gauss индикатриси на разсейване

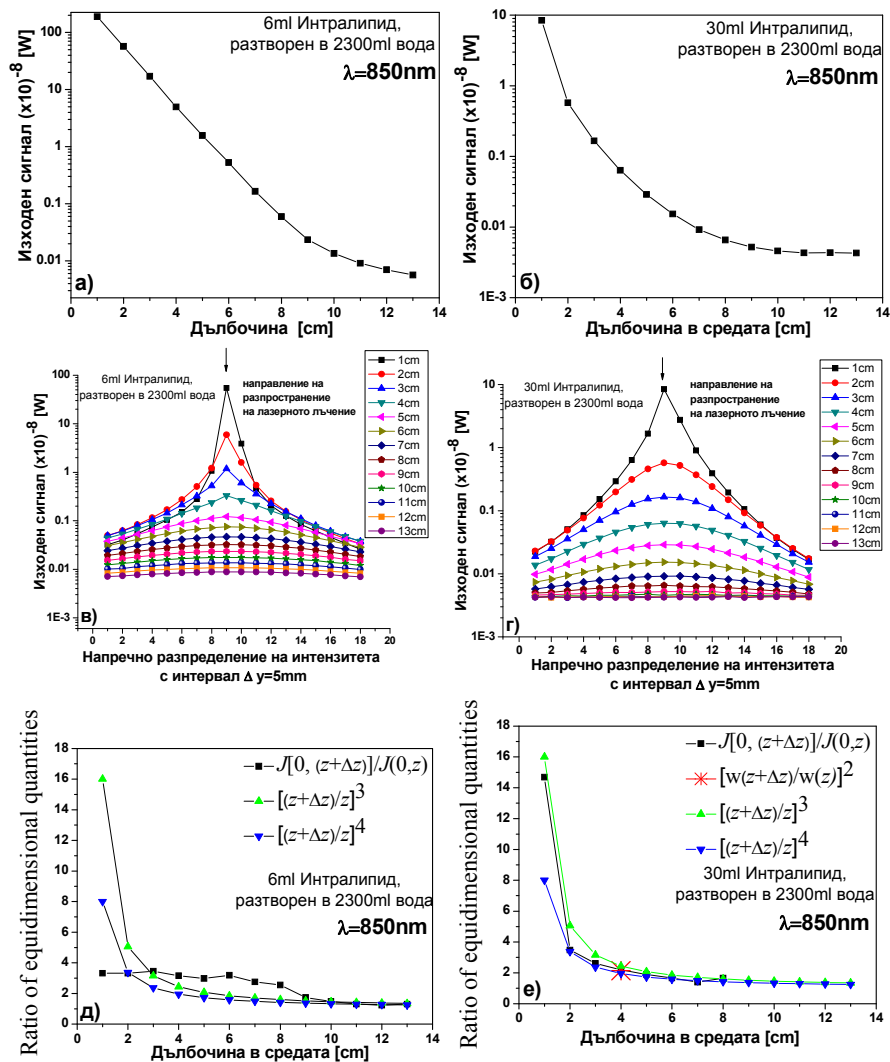
За оценка на оптичните характеристики на мътни среди, имитиращи биологични тъкани беше разработен теоретичен модел на основата на т.нар. приближение на големите частици за решаване на уравнението на преноса на лъчение в оптично плътни разсейващи среди. Въз основа на разработения модел бяха изведени аналитични изрази за определяне на оптичните характеристики, използвайки експериментално определените S- и D-криви, описани по-горе.

Изследователски цикъл 1

Разглежданият в този случай фантом е получен чрез разтвор от 3ml, 6ml, 9ml, 12ml, 15ml, 30ml, 60ml, 90ml и 120ml на 20% Интралипид® в 2300ml дестилирана вода. Използваната дължина на вълната на лъчението в случая е $\lambda=850\text{nm}$, а изходната му

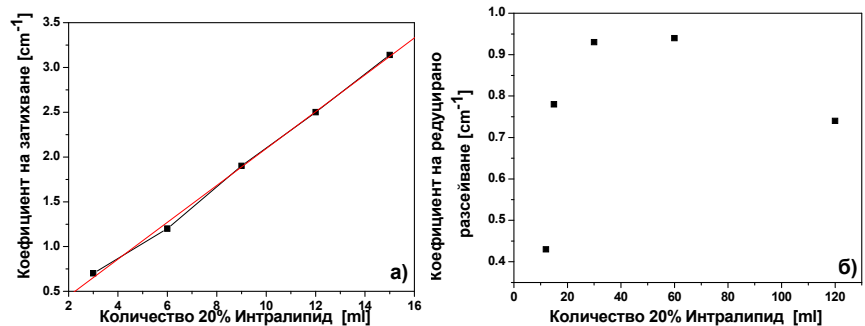
мощност е $P_{out}=27mW$. Стъпката на сканиране на оптичното влакно в дълбочина и в напречно (радиално) направление е съответно $\Delta z=1cm$ и $\Delta y=5mm$. За концентрации на Интралипид[®] от 3ml до 15ml профилът на D-кривите се характеризира с начален участък на експоненциално затихване на сигнала в дълбочина (Фиг.38.а), чийто размер намалява с увеличаване на концентрацията на Интралипид[®]. При концентрации над 15ml този участък вече е под 1cm (Фиг.38.б). Напречното разпределение на измерения светлинен интензитет (Фиг.38.в) се състои от две компоненти-затихващия неразсеян лазерен сноп върху пиедестал от разсеяна светлина. Експоненциалното затихване на сигнала в дълбочина позволява да се определи коефициентът на екстинкция на средата. Оценката на стойностите на този коефициент зависят от концентрацията на Интралипид и се представени графично на Фиг.39.а. Както се и очаква, за малки концентрации на Интралипид зависимостта е линейна.

С увеличаване на дълбочината в разтвора, след преминаване на преходния участък следва област на силно разсейване на светлината, където регистрираният интензитет намалява по-скоро като z^{-4} (Фиг.38.д и 38.е). За тези дълбочини практически цялата светлина вече е разсеяна. Радиалното разпределение на интензитета е близко до Гаусово, като полуширината му w на ниво на e^{-1} нараства като $z^{3/2}$ (Фиг.38.в,г и 1д). Експерименталното определяне на w позволява да се оцени редуцирания коефициент на разсейване α_{rs} чрез използването на теорията. На Фиг.39.б графично са представени получените оценки за стойностите на α_{rs} за количества на ИЛ от 12ml до 120ml. От тези графики се наблюдава максимум в стойностите за 60ml ИЛ. Такова нелинейно поведение, свързано с нарастване на концентрацията на ИЛ, се интерпретира с агрегацията на разсейващото вещество.



Фиг.38. Сравнение на зависимостите на разсеяното лазерно лъчение в среди с мътности 6ml и 30ml на 20% Интралипид, разтворен в 2300ml дестилирана вода: (а) и (б), профили на детектираната по оста мощност на лъчението $J(0, z)$; (в) и (г), напречни-радиални профили $J(0, y, z)$ на детектираната мощност на лъчението на различни дълбочини z в разтвора; (д) и (е), илюстрация на зависимостите $J(\vec{0}; z) \propto z^{-3}$ или z^{-4} , и $w^2(z) \propto z^3$.

Също така, добре е да бъде отбелязано, че определянето на α_t и α_{rs} дава възможност за определяне на фактора на анизотропия g чрез формулата $g = (1 - \alpha_{rs} / \alpha_t)$. От тук, за случая на 12ml и 15ml ИЛ за g -фактора са получени стойностите 0.828 и 0.753. Стойностите на α_a вероятно са сравними и дори по-малки от грешките при измерванията, поради което могат да бъдат оценени при използването на изключително прецизни експериментални данни.



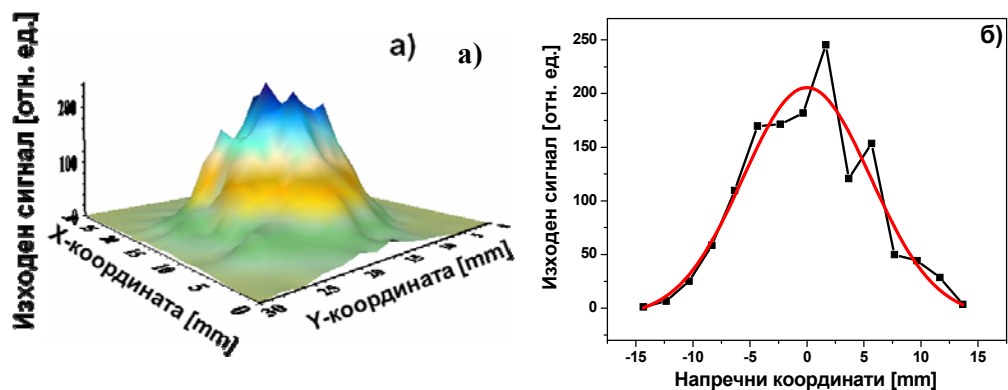
Фиг.39. Експериментално оценени стойности на коефициента на затихване α_t (а) и редуцираният коефициент на разсейване α_{rs} (б) като функция от концентрацията на разтворения във вода Интралипид®.

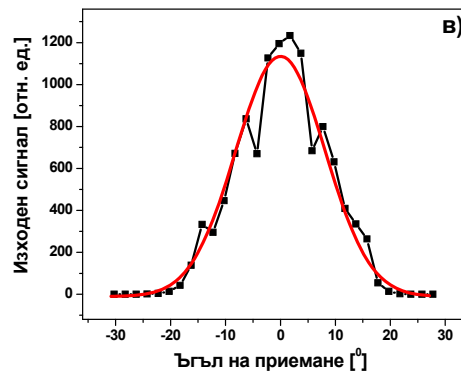
Анализ и обобщение на получените резултати

- Представените тук изследвания показват, че прилагането на приближението на големите частици може да се използва за количествено описание на разпространението на лазерно лъчение в мътна среда. Получените аналитични изрази за S- и D- зависимостите на разпределение на измерения разсеян светлинен сигнал позволяват от получените основни експериментални резултати да бъдат направени оценки на стойностите на α_t , α_{rs} , g и дори на α_a . За подобряване на тези оценки е необходимо по-прецизно сканиране на приемното оптично влакно в дълбочина и напречно направление и изследване на влиянието на стените на използвания контейнер върху получените експериментални резултати.

Изследователски цикъл 2

Както беше споменато в предната точка, за постигането на по-голяма точност при оценяването на оптичните коефициенти, характеризиращи мътната среда беше закупена 3D координатна маса (Thorlabs LTS 300/M) с цел провеждането на по-прецизни измервания на S- и D-зависимостите. Като източник на светлина отново беше използван CW диоден лазер, излъчващ на $\lambda=850\text{nm}$ и $P_{\text{out}}=27\text{mW}$. Сигналът се регистрира чрез използването на оптично влакно с диаметър 0.1mm. Беше измерена и ъгловата диграма на приемане на оптичното влакно, която се апроксимира добре с Гаусова крива (Фиг.40).

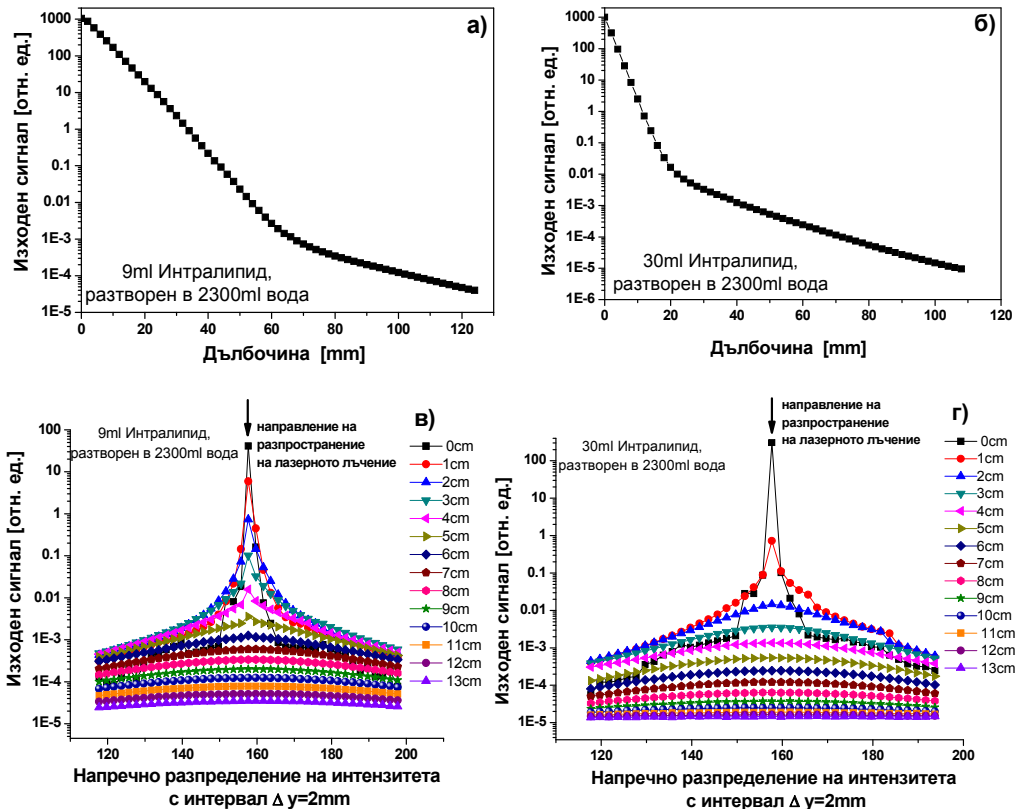


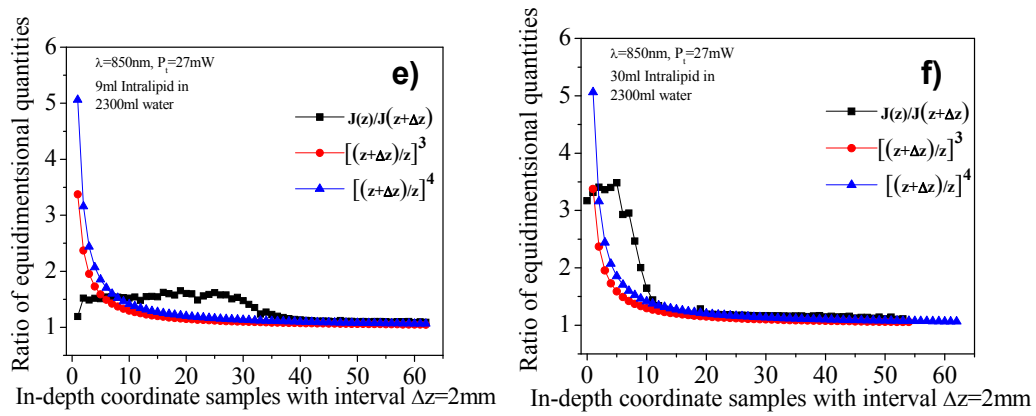


Фиг.40. Изображения на напречните разпределения на интензитета на лазерното лъчение (а,б) и диаграмата на приемане на влакното (в).

Ъгълът на приемане на влакното във въздух е оценен на $\gamma \sim 12^\circ$, т.е. 0.21rad . От където числената апертура на влакното е $NA = \sin \gamma \sim 0.21$. Ако се вземе предвид, че разтворът от Интралипид[®] е водна среда с показател на пречупване $n = 1.34$, тогава ъгълът на приемане на оптичното влакно за тази среда е $\gamma = \arcsin(NA/n) \sim 9^\circ$, т.е. 0.16rad . След провеждането на множество подобни измервания е установено, че на 14cm дълбочина полезният сигнал се губи и, че в този диапазон се регистрират предимно шумове.

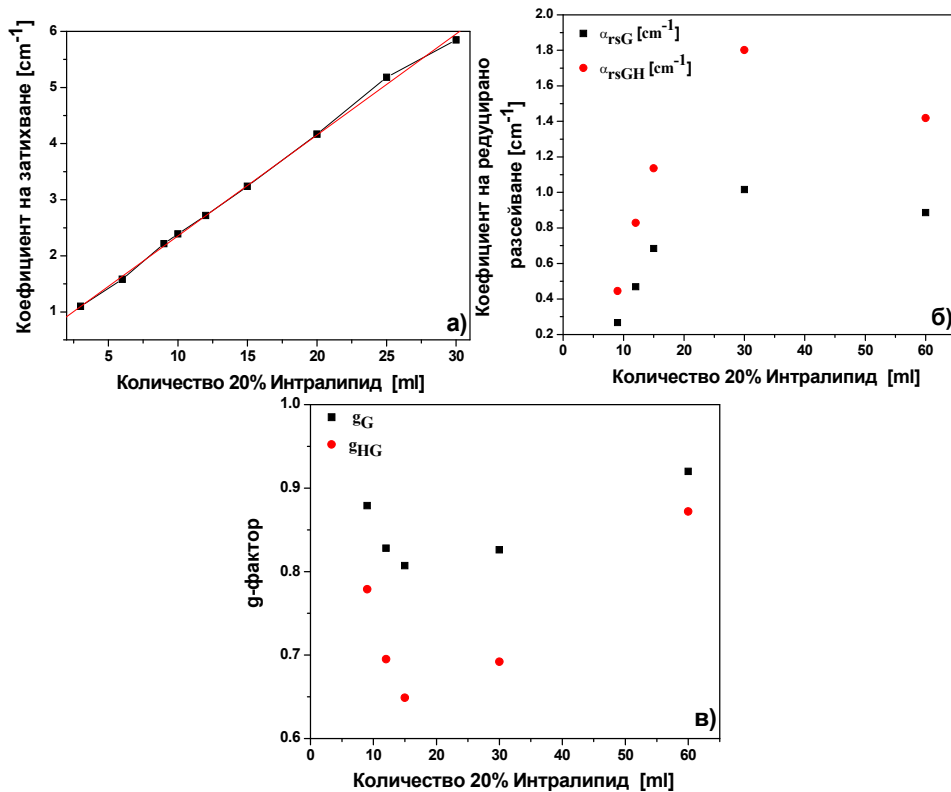
При тези измервания са използвани различни количества на 20% Интралипид[®] (от 3ml до 120ml) в 2300ml вода. За случая на 3ml до 60ml D-кривите показват добре изразена област на експоненциално затихване на сигнала (Фиг.41.а), която се стеснява с увеличаване на концентрацията на Интралипид[®]. За количества от 30ml до 120ml, разтворени в същия обем вода, този участък силно намалява и почти изчезва при 1cm дълбочина (Фиг.41.б).





Фиг.41. Сравнение на зависимостите на разсеяното лазерно лъчение в среди с мътности 9ml и 30ml на 20% Интралипид, разтворен в 2300ml дестилирана вода: (а) и (б), профили на детектираната по оста мощност на лъчението $J(0, z)$; (в) и (г), напречни-радиални профили $J(0, y, z)$ на детектираната мощност на лъчението на различни дълбочини z в разтвора; (д) и (е), илюстрация на зависимостите $J(\vec{0}; z) \propto z^{-3}$ или z^{-4} , и $w^2(z) \propto z^3$.

На следващите две графики (Фиг.42.в,г) са показани експериментално получените S-зависимости, където експоненциалната област дава възможност за определяне на коефициента на затихване α_t чрез използването на теорията. Оценените така стойности на този коефициент зависят от използваната концентрация на Интралипид® (Фиг. 42.а) като за ниските концентрации (от 3ml до 30ml) получените зависимости са линейни.



Фиг.42. Експериментално оценени стойности на коефициента на затихване α_t (а), редуцирания коефициент на разсейване α_{rs} (б) и фактора на анизотропия g (в) на изследваната мътна среда като функция на количеството Интралипид в обема на фантома.

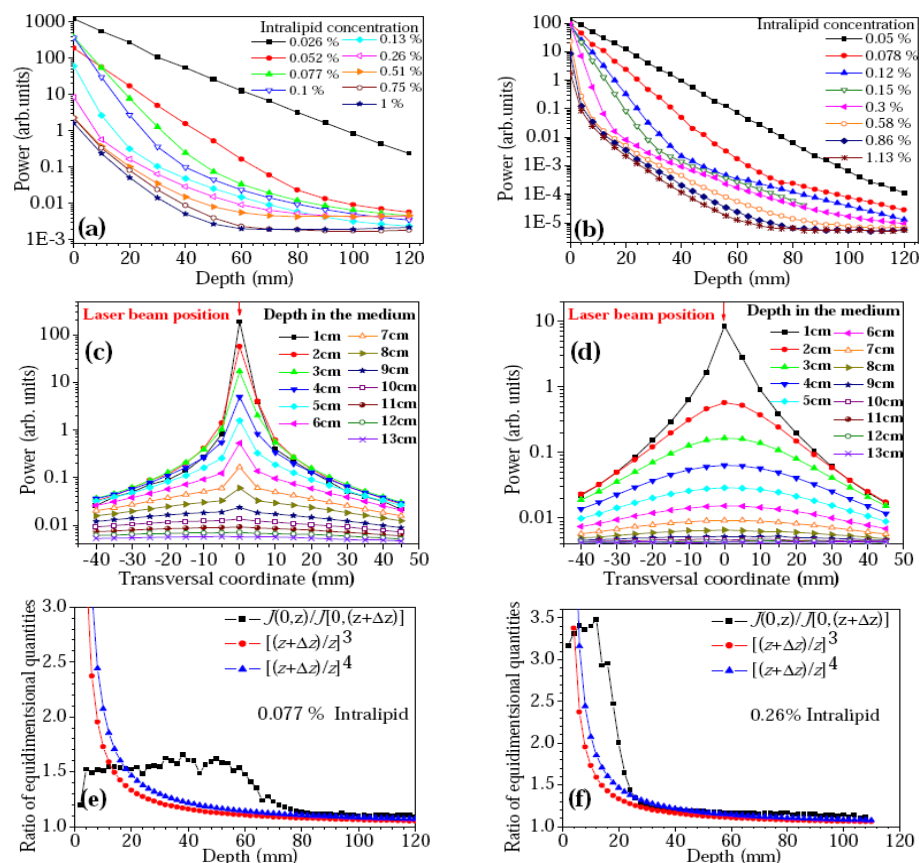
Докато за случая на g -фактора, се вижда, че за представените данни се наблюдава минимум за 15ml Интралипид®. И тук, както беше споменато по-горе остава въпросът с размерите на използваната вана, дали нейните размери оказват влияние върху измерените експериментални резултати.

Анализ и обобщение на получените резултати

- Получените експериментални данни показват, че използването на приближението на големите частици може да бъде приложено за описание на разпространението на лазерно лъчение през мътна среда. Получените аналитични изрази за двете основни зависимости (S- и D-криви) позволява да бъдат направени оценки за стойностите на оптичните характеристики на изследваната среда.
- Представените по този начин изследвания могат да бъдат в основата на разработването на нови методи за измерване на оптични свойства на фантоми, което ще бъде от полза в процеса на установяване на законите, които са валидни за описание на разпространението на лазерно лъчение в такива среди.

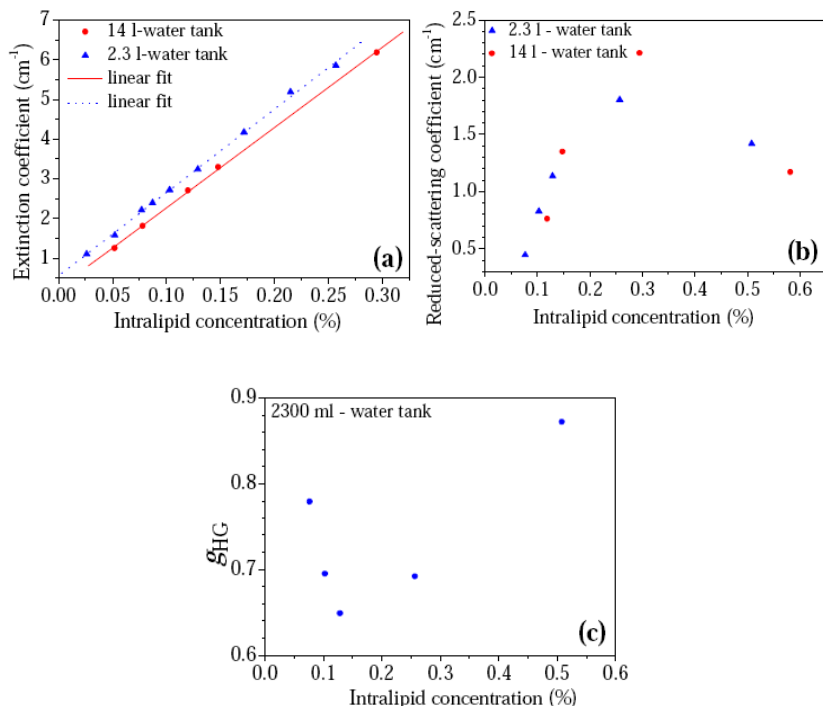
Изследователски цикъл 3

В тази част експерименталната установка е като използваната в предишната точка, но за да се изследва ефекта от влиянието на стените на контейнера беше използвана и вана с размери 25cm x 25cm x 25cm и различни концентрации на 20% Интралипид®, разтворен в 14l дестилирана вода. За тази експериментална кампания са използвани от 0.03% до 1.2% 20% Интралипид®. На Фиг. 43.а и б са представени D-зависимостите, получени за двата използвани обема 2300ml и 14l.



Фиг.43. Експериментално измерени D- (а) и S-криви (б); напречните разпределения на сигнала за различни дълбочини при 0.077% (в) и 0.26% (г) концентрации на Интралипид®; зависимости на $J(\vec{0}, z) \propto z^{-3}$ или z^{-4} (д) и (е) за двете концентрации.

Напречното разпределение на светлинния сигнал на малки дълбочини се състои от две компоненти-затихващия неразсеян лазерен сноп върху пиедестал от разсеяна светлина. На по-големи дълбочини започва да преобладава разсеяната компонента, която намалява пропорционално на z^{-4} (Фиг. 43.д,е).



Фиг.44. Експериментално оценени стойности на коефициента на затихване α_t (а), редуцирания коефициент на разсейване α_{rs} (б) и фактора на анизотропия g (в) на изследваната мътна среда като функция на количеството Интралипид в обема на фантома.

Анализ и обобщение на получените резултати

- Получените експериментални данни показват, че използването на приближението на големите частици може да бъде приложено за описание на разпространението на лазерно лъчение през мътна среда. Получените аналитични изрази за двете основни зависимости (S- и D-криви) позволява да бъдат направени оценки за стойностите на оптичните характеристики на изследваната среда.
- Представените по този начин изследвания могат да бъдат в основата на разработването на нови методи за измерване на оптични свойства на фантоми, което ще бъде от полза в процеса на установяване на законите, които са валидни за описание на разпространението на лазерно лъчение в такива среди.

Обобщение за цялостната работата по договора

Може да се направи заключение, че поставените цели са напълно постигнати. Създадена е нова научно-изследователска лаборатория, разполагаща с многофункционална експериментална база за изследване на фотофизичните характеристики на човешки и други биологични тъкани, с възможност за получаване и анализиране на флуоресцентни, отражателни и абсорбционни спектри в УВ, видимата и близката ИЧ области, както и в различни времеви диапазони.

Експерименталната база е разширена и обновена в две основни направления – спектрално и времево. По отношение на спектралните методи с честотно разрешение съществуващото оборудване покрива изцяло електромагнитния диапазон от УВ до близката ИЧ област, а по отношение на методите с времево разрешение – от непрекъснати процеси до фемтосекундната област. С разширението на възможностите на инструментариума в ИЧ спектъра и включването на фемтосекундни лазери, както и с обогатяването на методическата база с LIBS спектроскопия, в края на двегодишния, финансиран от Ф “НИ” период, научният център е постигнал тематична и инструментална завършеност.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Научни публикации

Глави в монографии:

1. P. Pavlova, E. Borisova, L. Avramov, E. Petkova, P. Troyanova. Investigation of Relations Between Skin Cancer Lesions' Images and Their Reflectance and Fluorescent Spectra, Melanoma in the Clinic - Diagnosis, Management and Complications of Malignancy, Prof. Mandi Murph (Ed.), ISBN: 978-953-307-571-6, InTech, chapter 6, p. 87- 104 (2011).
2. E. Borisova, B. Vladimirov, R. Ivanova L. Avramov. Light-Induced Fluorescence Techniques for Gastrointestinal Tumour Detection, New Techniques in Gastrointestinal Endoscopy, Oliviu Pascu and Andrada Seicean (Ed.), ISBN: 978-953-307-777-2, InTech, chapter 14, p. 231 – 252 (2011).
3. E. Borisova, I. Bliznakova, V. Mantareva, I. Angelov, L. Avramov, E. Petkova. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy of Cutaneous Melanoma, Current Management of Malignant Melanoma, Ming Y. Cao (Ed.), ISBN: 978-953-307-264-7, InTech, chapter 7, p. 141-156 (2011)

Статии в международни списания:	Impact	
	Scopus IR	Thomson IF
Заглавие		
1. Kussovski, V., Mantareva, V., Angelov, I., Orozova, P., Wöhrle, D., Schnurpfeil, G., Borisova, E., Avramov, L. Photodynamic inactivation of aeromonas hydrophila by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity, 2009, FEMS Microbiology Letters 294 (2), pp. 133-140.	0.910	2.274
2. Tsvetkova, T., Balabanov, S., Avramov, L., Borisova, E., Angelov, I., Sinning, S., Bischoff, L. Photoluminescence enhancement in Si+ implanted PMMA, 2009, Vacuum 83 (SUPPL.1), pp. S252-S255.	0.950	0.881
3. Л. Аврамов, Съвременни форми на научен и технологичен		

трансфер, Наука, 3/2009, 20-25.		
4. I. Bliznakova, O. Vankov, T. Dreischuh, L. Avramov and D. Stoyanov, Measurement of Small Variations in Optical Properties of Turbid Inclusions with Respect to Surrounding Turbid Medium, ACTA PHYSICA POLONICA A, No. 4, Vol. 116 (2009), 681-683.	0.290	0.394
5. E. Borisova, E. Carstea, L. Cristescu, E. Pavlova, N. Hadjiolov, P. Troyanova, L. Avramov, "Light-induced fluorescence spectroscopy and optical coherence tomography of basal cell carcinoma", Journal of Innovative Optical Health Sciences vol.2(3), pp 261-268 (2009)	0.262	
6. P. Pavlova, E. Borisova, L. Avramov, El. Petkova, and P. Troyanova, Investigation of relations between skin cancer lesion's images and their fluorescent spectra, Laser Physics, 2010, Vol. 20, No. 3, pp. 1-8.	0.530	0.696
7. K. Koev, E. Borisova and L. Avramov, He-Ne low level laser therapeutic applications for treatment of acute iridocyclitis, ACTA MEDICA BULGARICA 1/2010, Vol. XXXVII, 22-29.	0.050	
8. K. Koev, E. Borisova and L. Avramov, Laser-induced autofluorescence spectroscopy of basal cell carcinoma and papilloma of eyelids and comparison with the results from the histological investigation, ACTA MEDICA BULGARICA 1/2010, Vol. XXXVII, 51-54.	0.050	
9. Tsvetkova, T., Balabanov, S., Avramov, L., Borisova, E., Angelov, I., Bischoff, L., Photoluminescence of Si ⁺ and C ⁺ implanted polymers, Journal of Physics: Conference Series, Volume 223, Issue 1, 2010, Article number 012033, ISSN: 17426588, DOI: 10.1088/1742-6596/223/1/012033	0.043	
10. Balabanov, S., Tsvetkova, T., Borisova, E., Avramov, L., Bischoff, L., Zuk, J., Optical properties of Si ⁺ implanted PMMA, Journal of Physics: Conference Series, Volume 223, Issue 1, 2010, Article number 012032, ISSN: 17426588, DOI: 10.1088/1742-6596/223/1/012032	0.043	
11. T.Dreischuh, D. Stoyanov, L. Gurdev, Orlin Vankov, I.Bliznakova, L.Avramov, E. Borisova, Method for detection and analysis of small turbid inclusions in turbid media using single-sided laser sensing, BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, NEWS, No 1 (89), Year IX, January 2011, ISSN 1312-2436.		
12. Аврамов, Лъчезар. Актуални проблеми на академичната автономия, Стратегии на образователната и научната политика, XIX, 2011, N 1, с. 56-65.		
13. Damyanov ChA, Gherasimova DM, Avramov LA and Maslev IK, Insulin Potentiation Therapy in the Treatment of Malignant Neoplastic Diseases: A Three Year Study, J Cancer Sci Ther 2012, 4.4, http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.1000117	0.032	5.62
14. Ljuan Gurdev, Tanja Dreischuh, Irina Bliznakova, Orlin Vankov, Lachezar Avramov and Dimitar Stoyanov, Scattering of a laser beam in turbid media with forward-peaked Henyey-Greenstein indicatrices, 2012 Phys. Scr. 2012 014074 doi:10.1088/0031-8949/2012/T149/014074	0.367	1.24
15. Ekaterina Borisova, Petya Pavlova, Elmira Pavlova, Petranka Troyanova, Latchezar Avramov, Optical Biopsy of Human Skin – A Tool		

for Cutaneous Tumours' Diagnosis, INT. J. BIOAUTOMATION, 2012, 16(1), 53-72		
16. Ch. Damyanov, J. Sirova, D. Gerasimova, I. Maslev, L. Avramov, A. Gisbreht, "Intravenous laser (405 nm) irradiation of blood for treatment of oncological diseases. Initial investigations." Laser Medicine, v.16, N3, pp. 25-28(2012) ISSN 2071-8004		
17. E.Borisova, B.Vladimirov, I.Terziev, R.Ivanova, L.Avramov, 5-ALA/PpIX fluorescence detection of gastrointestinal neoplasia, 2009, Proceedings of SPIE, Vol. 7368, 736824-1-6.	0.210	
18. E. Borisova, D. Dogandjiiska, I. Bliznakova, L. Avramov, E. Pavlova, P. Troyanova, Multispectral autofluorescence diagnosis of non-melanoma cutaneous tumors, SPIE Proc. 7368, "Clinical and Biomedical Spectroscopy", Irene Georgakoudi; Jürgen Popp; Katarina Svanberg M.D., Editors, 7368-23 (2009).	0.210	
19. L. L. Gurdev, I. A. Bliznakova, T. N. Dreischuh, O. I. Vankov, D. V. Stoyanov, L. A. Avramov, Quantitative analysis of experimental data on the effects accompanying the propagation of laser radiation through biological-tissue-like turbid media, 2010, AIP Conference Proceedings 1203, pp. 716-721.	0.088	
20. A.Deleva, Z.Peshev, Al.Slesar, S.Denisov, L.Avramov, D.Stoyanov, Vertical Profiling of Atmospheric Backscatter with a Raman-Aerosol Lidar, 2010, AIP Conference Proceedings 1203, pp. 388-393.	0.088	
21. E.G. Borisova, Vladimirov, B., Terziev, I., Ivanova, R., Avramov, L. , „5-ALA/PpIX fluorescence detection of gastrointestinal neoplasia”, Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE, Vol. 7368, p.736824 -1-6 (2009).	0.262	
22. E. Borisova, L. Avramov, P. Pavlova, E. Pavlova, P. Troyanova, "Qualitative optical evaluation of malignancies related to cutaneous phototype", Proc. SPIE – PhotonicsWEST- 2010, BiOS, Proceedings of SPIE Volume: 7563, ISBN: 9780819479594.	0.320	
23. Koev, K., Avramov, L., Borisova, E., He-Ne low level laser therapeutic applications for treatment of corneal trauma, 2011, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 7747, art. no. 774711	0.355	
24. Bliznakova, I., Gurdev, L., Dreischuh, T., Vankov, O., Stoyanov, D., Avramov, L., A dual interpretation of experimental data concerning the propagation of laser light through tissue-like turbid media, 2011, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 7747, art. no. 774710	0.355	
25. Deleva, A.D., Avramov, L.A., Stoyanov, D.V., Laser remote sensing of tropospheric aerosols and clouds, 2011, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 7747, art. no. 77470Q	0.333	
26. Mantareva V., Angelov I., Stambolieva N., Kussovski V., Dimitrov R., Borisova E., Avramov L., Wohrle D., Immobilized metallophthalocyanines and fullerene C ₆₀ for inactivation of human		

pathogens, Proceedings of the 13th IPA 2011, 2012, p.115-120.		
27. Mantareva, V., Kril, A., Angelov, I., Dimitrov, R., Borisova, E., Avramov, L., Effects of the position of galactose units to Zn(II) phthalocyanine on the uptake and photodynamic activity towards breast cancer cells, Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE, Volume 8427, 2012, Article number 842743, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care III; Brussels; Code90044	0.310	
28. Kussovski, V., Mantareva, V., Angelov, I., Avramov, L., Popova, E., Dimitrov, S, Al(III), Pd(II) and Zn(II) phthalocyanines for inactivation of dental pathogen Aggregatibacter actinomycetemcomitans as planktonic and biofilm-cultures, Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE, Volume 8427, 2012, Article number 84273X, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care III; Brussels; Code90044	0.310	
29. E. Borisova, P. Pavlova, E. Pavlova, P. Troyanova, L. Avramov, "Optical biopsy of human skin – tool for cutaneous tumours' diagnosis", Int. J. Bioautomation, 16(1), pp.53-72, (2012). ISSN: 1314-2321 (on-line), 1314-1902		
30. E. Borisova, L. Plamenova, M. Keremedchiev, B. Vladimirov, L. Avramov, "Endogenous and exogenous fluorescence of gastrointestinal tumors – initial clinical observations", Proc. SPIE, ISQ12-ISQ100-87, 9 p. (2012)	0.310	
31. E. Borisova, E. Pavlova, P. Troyanova, L. Avramov, "Optical Biopsy of Cutaneous Tumours", Proc. CLSM, CLSM6-2, pp.42-43, (2012).		
32. E. Borisova, T. Uzunov, L. Avramov, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy of Dental Lesions – Tool for Real Time Optical Feedback During Laser Ablation of Caries", Proc. CLSM, CLSM7p-3, pp.48-49, (2012).		
33. Borisova, E., Plamenova, L., Keremedchiev, M., Vladimirov, B., Avramov, L., Endogenous and exogenous fluorescence of gastrointestinal tumors-initial clinical observations, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 8770 , art. no. 87701C, 2013		
34. Mantareva, V., Kril, A., Angelov, I., Avramov, L., Specific light exposure of galactosylated Zn(II) phthalocyanines for selective PDT effects on breast cancer cells, Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 8770 , art. no. 877015, 2013		
35. Ljuan Gurdev, Tanja Dreischuh, Orlin Vankov, Irina Bliznakova, Lachezar Avramov, Dimitar Stoyanov, Turbid media optical properties derived from the characteristics of propagating laser radiation beams, Applied Physics B, September 2013, on line	1.193	1.782

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Патенти

1. ЕВРОПЕЙСКИ ПАТЕНТ с автори: Д.Стоянов, Т.Драйшу, Л.Гърдев, О.Ванков, Л.Аврамов, Е.Борисова, И.Близнакова, *Method for determining optical and spatial characteristics of an inclusion in a turbid medium using multiple-scattering optical tomography*, No. 2007P24470EP, с приоритет от 13 Август 2008.
2. ЕВРОПЕЙСКИ ПАТЕНТ с автори: Д.Стоянов, Т.Драйшу, Л.Гърдев, О.Ванков, Л.Аврамов, Е. Борисова, И.Близнакова, *Apparatus for determining optical and spatial characteristics of an inclusion in a turbid medium using multiple-scattering optical tomography*, No. 2008P07934EP, с приоритет от 10 Ноември 2008.
3. Патентно ведомство на Р България с автори: Д.Стоянов, Л.Гърдев, Т.Драйшу, О.Ванков, Л.Аврамов, Е.Борисова, “*Оптична многоканална облъчващо-приемна система*”, патент No. 65769 B1 (2009).

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Участия в конференции и семинари

1. Мюнхен, Германия, 13-19.06.2009, участие в European Conference on Biomedical Optics - ECBO'2009 с постерни доклади. Текстове са отпечатани в SPIE Proc. – Д. Стоянов, Л. Аврамов, И. Близнакова, Е. Борисова, Ал. Даскалова
2. Барселона, Испания 11-18.07.2009, участие в Workshop Laser Physics'2009 – два устни доклада – материалите в пълен текст са отпечатани в Laser Physics - Е. Борисова, П. Павлова.
3. Вроцлав, Полша – 05.09-10.09.2009 - участие с поканен устен доклад на XIII Congress of ESP'2009 – Е. Борисова
4. Москва-Саратов, Русия, 13-23.09.2009 с цел – участие в Международна Школа за млади учени по Оптика, Лазерна физика и Биофизика (SFM'09) – поканен лектор. – Е. Борисова.
5. Анталия, Турция, 26.09-01.10.2009, участие с поканен доклад на Advanced Laser Technologies – подготвя се статия в пълен текст за LasPhys – Е. Борисова, Л. Аврамов
6. Смолян, България – 18-22.10.2009 – участие с постерни доклади в ILLA/LTL'2009 – Е. Борисова, Л. Аврамов, И. Ангелов, Ал. Гизбрехт, Ц. Узунов, А. Делева
7. Чикаго, САЩ, 22.10 – 28.10.2009 –, участие с поканен устен доклад на “5 th annual conference of IPT medicine”, статия в пълен текст за Journal of Cancer Csience and Therapy, - Хр. Дамянов, Л.Аврамов
8. Сан Франциско, САЩ, PhotonicsWEST-2010, BiOS - участие с постерни доклади Л. Аврамов, Е. Борисова
9. Европейска Конференция по Биомедицинска Оптика'09 - Мюнхен (European Conferences on Biomedical Optics-ECBO) от 13 до 19 юни 2009 участие с устен доклад - Ир. Близнакова
10. Белград, Сърбия, Участие в Международна Школа и Конференция по Фотоника'09 - (II International School and Conference on Photonics-Photonica'09, Belgrade, Serbia) от 23 до 28 август 2009 участие с устен доклад - Ир. Близнакова
11. Morzine, France, “2nd ITS LEIF WINTER SCHOOL” 0106/03/09 - Physics & Techniques for Studies of complex systems, участие с устен доклад, Web address: <http://www.its-leif.org/NAdissemination/winterschool2009/main.html> - Албена Даскалова
12. CLEO/Europe - EQEC 2009 - European Conference on Lasers and Electro-Optics and the European Quantum Electronics Conference, 06.04.09-11.04.09, участие с устен доклад - Албена Даскалова
13. Александрополис, Гърция, 7-ма Балканска конференция по физика (9-13.09.2009), Гърция - участие с устен доклад - Е. Ангелова
14. Александрополис, Гърция, 7-Балканска конференция по физика (9-13.09.2009), Гърция - участие с устен доклад - Т. Драйшу, Л. Гърдев

15. Дюселдорф, Германия, 15th International Congress on Photobiology, June 18-23,2009, участие с един доклад В, Мантарева
16. Охрид, Македония, Microbiologia Balkanica 2009, October 28th-31st, – участие с два доклада, В. Късовски
17. 20th International Laser Physics Workshop (LPHYS'11) July 11–15, 2011, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. – доц. Е.Борисова, доц. П.Павлова
18. Белград, Сърбия, 29август- 2 септември 2011, Участие с доклад в Международна Школа и Конференция по Фотоника - PHOTONICA 2011 (III International School and Conference on Photonics - PHOTONICA 2011, 29 August – 2 September 2011, Belgrade, Serbia) – доц. Т. Драйшу.
19. Златни пясъци, България, 03-08 Септември 2011, Участие с доклад на 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'11) – доц. Л. Гърдев, докторант И. Близнакова.
20. SPIE Photonics Europe, 16-20.04.2012, Брюксел, Белгия, д-р И.Ангелов, доц. В.Късовски
21. Работно съвещание по съвместна научно-изследователска работа по тема: 02-01065-2007/2014, Русия, Дубна, 04-08-03.2012 – проф.Л.Аврамов, доц.И.Цаков
22. INTERNATIONAL CONFERENCE BIOPHOTONICS IN DERMATOLOGY AND CARDIOLOGY, 29.03.-04.04.2012, Латвия, Рига, проф. Л.Аврамов
23. INTERNATIONAL CONFERENCE OF INTEGRATIVE MEDICINE, Австрия, Виена, 04- 09.05.2012 - проф. Л.Аврамов
24. Международен симпозиум Tetrahedron, Амстердам, Холандия, 25.06.2012 г. – д-р В.Мантарева
25. „Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, Йокохама, Япония, 23-29.04.2012 г. - проф. Л.Аврамов, доц. Е.Борисова

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Командировки в чуждестранни лаборатории

1. Саратовски Държавен Университет, Саратов, Руска Федерация – май 2009 - измерване на абсолютни оптични свойства на лигавица на стомах и оценка на влиянието на просветляването на тъканите ин витро при прилагане на глюкоза и хемоглобин–Екатерина Борисова
2. Университет на Брайтън, Брайтън, Великобритания – юли/август 2009 – създаване на моделни кожни тъкани – върху колагенова и Integra® матрици, с добавяне на фибробласти и кератиноцити. Измерване на основни спектрални свойства – абсорбционни, трансмисионни и флуоресцентни свойства на създадените фантоми на човешка кожа – Екатерина Борисова
3. Хераклион, Крит - май 2009 - Провеждане на серия научни експерименти за получаване на лазерна аблация на твърди биологични образци (зъбна тъкан) с фемтосекундни и пикосекундни лазерни импулси при три различни дължини на вълната за изследване на модификацията на зъбната повърхност – Ирина Близнакова
4. CEA-CIMAP, GANIL, Каен, Франция - април 2009 - Подготовка на проект на тема: „Highly Charged Ion-Induced ToF-SIMS Studies of Hard Dental Tissue” - Албена Даскалова
5. CEA-CIMAP, GANIL, Каен, Франция - юли 2009 - Провеждане на серия експерименти, свързани с получаването на експериментални резултати, в следствие на взаимодействието на Хе²⁰⁺ йони с твърда дентална зъбна тъкан, използвайки ToF-SIMS – Ирина Близнакова, Албена Даскалова
6. Минск, Беларус юни 2009 - Институт по физика, Белоруска академия на науките - Провеждане на серия експерименти, свързани с фотоиндуцирана оксигенация на тъкани с цел повишаване на ефективността на антиракови терапии – Александър Гизбрехт