홀로그래픽 광학 영상 및 제어 기법

DOI: 10.3938/PhiT.26.008

박정훈·김규현·박용근

Holographic Optical Imaging and Manipulation Techniques

Jung-Hoon PARK, Kyoohyun KIM and YongKeun PARK

Optical imaging of live cells is essential for the study of cell biology and is important for the diagnosis of several diseases. In addition, optical manipulation of individual cells may open new avenues for the investigation of various cell mechanisms and physiology. One of the challenges in bioimaging is that individual biological cells are transparent due to weak scattering whereas biological tissues, which consist of multiple layers of transparent cells, are opaque due to strong scattering. To address this challenge, several holography-based techniques have been introduced over the past decade. Three-dimensional holographic microscopy enables 3D label-free imaging of live cells and tissues. Holographic control, in combination with holographic measurements, provides a method to systematically manipulate live cells. Furthermore, holographic wavefront shaping offers a non-invasive method to image individual cells through intact biological tissues. To provide insight into how holography techniques can be exploited for various applications in bioimaging, we summarize recent progress

on holographic methods and their applications in bioimaging.

다양한 질병을 이해하고, 진단하고, 또 치료하기 위해서는 세포 수준에서 일어나는 변화를 효과적으로 관찰하는 것이 매우 중요하다. 이때 현미경은 세포를 관찰하는 연구와 진단에 빼놓을 수 없는 중요한 기술이다. 예를 들면 병원의 병리학과에서는 환자의 위장이나 대장에서 채취한 조직 시편을 얇게 썰고 핵과 같은 세포 내 특정 부위를 염색 후, 광학 현미경으로 핵과 세포의 형상을 관찰하여 암 조직의 유무를 판별한다. 또한, 말라리아와 같은 다양한 기생충 질환의 연구와 진단은 적혈구와 같은 모세포에 기생충 또는 관련 물질이 존재하는지를 현미경으로 관찰하는 것이 매우 중요하다. 또한 최신 신약 개발 과정에서는 후보 항암 물질이 실제 세포에 어떤 영향을 미치는지 관찰하기 위해 현미경을 이용하여, 항암 물질에 대한 세포의 반응을 관찰하여 분석한다. 최근에는 세포를 생체 조직에서 현미경으로 옮기는 과정 없이, 살아있는 조직 내에서 바로 세포를 관찰하려는 in vivo 생체 영상 분야도 급속히 성장하고 있다.

바이오 이미징 분야에서 최근 중요하게 부상하고 있는 기술은 홀로그래픽 광학 영상 및 제어 기법이다. 3차원 홀로그래픽 현미경 기술은 레이저 간섭과 단층 촬영(computed tomography) 기술을 이용하여, 세포의 3차원 굴절률 정보를 측정할 수 있다. 이를 이용하면, 추가적인 염색이나 준비 과정 필요 없이, 세포가 살아있는 상태 그대로 영상을 얻을 수 있다. 이 때문에, 오랜 시간 동안 세포를 관찰할 수 있으며, 또한, 줄기 세포나 면역 세포와 같이 염색 과정을 쓸 수 없는 연구 분야에 활용될 수 있다. 또한, 홀로그래픽 제어 기법을 활용하면 피부와 같이 광 산란이 심한 생체 조직에서도 살아있는 세포를 효과적으로 관찰할 수 있게 된다. 광 산란을 효과적으로 줄여, 세포를 채취해서 외부에서 관찰하지 않고도, 생체 조직 내의 세포를 관찰할 수 있는 기술들이 속속 개발되고 있다. 본 글에서는 홀로그래픽 측정과 제어 기술이 어떻게 생체 영상 분야에 이용될 수 있는지를 소개하고자 한다.

저자약력

박정훈 교수는 2014년 KAIST 물리학과에서 박사학위를 취득하였으며, Janelia 연구소와 Purdue 대학에서 연구원을 거쳐, 2016년부터 UNIST 생명공학과 조교수로 재직 중이다. (jh.park@unist.ac.kr)

김규현 박사는 2017년 KAIST 물리학과에서 박사학위를 취득하였으며, 현재 동 대학에서 박사후연구원으로 재직 중이다. (kkh2580@kaist.ac.kr)

박용근 교수는 2010년 Harvard-MIT 의과학과에서 박사학위를 취득하였으며, 2010년부터 KAIST 물리학과에서 근무하고 있다. 홀로그래픽 기술 개발과 의생명 분야 응용 연구를 하고 있다. 100편 이상의 연구 논문을 발표했으며, 박용근 교수 연구 내용을 바탕으로 2개의 회사(Tomocube Inc., The.Wave.Talk)가 설립되었다. (yk.park@kaist.ac.kr)

시작하는 글

의사가 외래 환자를 대할 때 가장 먼저 해야 하는 것은 관찰이다. 환자의 걸음걸이, 안색, 말투 등을 포함한 모든 사소한 것들로부터 정보를 얻기 위해 세심한 관찰을 한다. 마찬가지로 연구자들이 세포를 포함한 측정 대상의 정보를 파악하기 위해서 가장 많이 사용하는 방법이 형상 관찰이다. 시편의 형상을 관찰하기 위해서는 가장 많이 사용하는 방식이 광학 영상(imaging)이다. 물리적으로는 빛을 시편에 입사시켜, 시편의 각 지점에서 산란된 입사광을 렌즈와 같은 광학 기기를 이용하여 다시 다른 공간상의 한 점으로 모아주어 시편의 형상을 재구성한다.

빛은 특히 생체 세포나 조직에 거의 영향을 주지 않기 때문에, 세포와 조직의 원 상태 그대로 두면서 관찰할 수 있게 만들어 준다. 하지만, 광학 영상으로 생체 세포를 관찰하는 데에는 근본적인 어려움이 있다. 세포가 빛을 거의 산란시키지 않기 때문에, 세포가 투명하게 보여서 광학 영상을 얻기가 어렵다는 점이다(그림 1A). 세포를 구성하는 주요 성분, 즉, 물, 단백질, 탄수화물, 지질, 핵산 등이 모두 가시광선 대역에서 빛을 거의 산란시키지 않는다. 다른 한편으로는 생체 조직은 매우 불투명하다(그림 1B). 이 때문에 피부 속 깊숙이 있는 세포를 직접 자세히 관찰하기가 매우 어렵다. 외과적인 절제술을 통해 조직 일부를 떼어 내서 외부에 있는 현미경으로 관찰해야 한다. 피부가 여러 층의 투명한 세포들로 구성되어 있음에도 불구하고, 피부 자체가 불투명한 것은 빛이 피부에서 흡수되었기 때문이 아니다. 실제로 레이저 포인터로 손가락 끝에 대어보면 상당히 많은 빛이 손가락을 투과해서 나오는 것을 관찰할 수 있다. 피부가 불투명한 것은 산란이 너무 많이 일어나기 때문이다. 각각의 세포들은 투명하지만, 수많은 세포가 쌓여 있게 되면, 각 세포에 의해 미세하게 일어난 빛의 굴절과 반사가 중첩되어 매우 복잡한 형태로 산란이 되는 것이다. 마치 매우 작은 물방울 하나는 투명해서 잘 안 보이지만(그림 1C), 물방울들이 매우 많이 모여 있는 구름은 빛을 심하게 산란시켜 하얗게 보이고, 구름 뒤의 하늘을 볼 수 없게 만드는 것과 같은 현상이다(그림 1D).

바이오 이미징 분야에서의 이 paradox를 해결하기 위해 다양한 홀로그래피 기술이 개발되고 상용되고 있다. 단순히 빛의 세기(intensity)만을 가지고 빛에 담긴 정보를 측정하거나 역으로 제어하려고 하는 것이 아닌, 빛의 세기와 방향 정보, 즉 빛의 홀로그래피 정보를 활용하였을 때 바이오 이미징 분야의 난제를 해결할 수 있을 것이라는 다양한 결과들이 발표되고 있다.

물리적인 관점에서 보면, 이 문제는 파동 광학으로 잘 설명

Fig. 1. (A) *Acanthamoeba* trophozoites with the characteristic acanthopodia in bright field microscopy. Scale bar: 10 μ m. (B) Light transmits through human hands. Biological tissues are opaque because of multiple light scattering. (C) Individual water droplets are transparent. (D) Cloud is highly scattering. Reproduced from Refs. [1-4]. (CC By 2.0).

할 수 있다. 개별 세포에서는 빛의 흡수는 거의 무시할 수준으로 일어나고, 빛의 파면이 왜곡된다. 따라서 위상 샘플(phase object)이라고 광학적으로 구분할 수 있다. 일반적인 광학 현미경(bright-field microscopy)은 빛의 세기를 이용해서 영상화를 하므로 빛의 세기가 거의 바뀌지 않는 위상 샘플의 영상을 얻기는 매우 어렵다. 이러한 문제 때문에 17세기 현미경이 개발된 이후 수 세기 동안 생체 세포를 직접 관찰하기는 쉽지 않았다. 이러한 어려움을 해결한 기술은 위상 차 현미경(phase contrast microscopy)이다. 네덜란드 물리학자 Frits Zernike는 빛의 간섭을 이용해서 위상 샘플을 쉽게 영상화할 수 있는 기술을 간섭을 이용해서 구현함으로써, 노벨 물리학상을 받았다.^[5]

위상 차 현미경은 생체 세포와 같은 위상 시편을 영상화하

REFERENCES

- [1] J. Lorenzo-Morales, N. A. Khan and J. Walochnik, *Parasite* **22**, 10 (2015).
- [2] Jason Hickey, "Light bulb." Online image. Flickr. 24 July 2008. <<https://www.flickr.com/photos/exquisitur/2699850137/>>.
- [3] Law Granit, "drops on glass." Online image. Flickr. 26 Jan 2012. <<https://www.flickr.com/photos/lawlesstech/6775981295/>>.
- [4] Edward Stojakovic, "Clouds." Online image. Flickr. 20 Aug 2014. <<https://www.flickr.com/photos/akasped/14963879736/>>.
- [5] F. Zernike, *Science* **121**, 345 (1955).

는 데에는 매우 효과적이기 때문에 지금도 수많은 생물학 연구실이나 병원에서 널리 사용되고 있지만, 중요한 기술적인 한계가 있다. 3차원 영상을 얻을 수 없다는 문제와 위상 정보를 정량적으로 얻을 수 없다는 한계가 있었다. 2000년대 들어 MIT를 포함한 여러 연구 그룹에서 이 문제를 본격적으로 다루기 시작하였고, 최근 10년 사이 정량 위상 영상(quantitative phase imaging)이라는 분야로 급격히 성장하였다.^[6,7] 홀로그래피 또는 간섭계를 이용하여 투명한 세포와 같은 위상 시편의 위상 정보를 정량적으로 측정하는 이 분야는 혈액학,^[8] 세포생물학,^[9] 신경생물학,^[10] 면역학^[11]을 포함한 생물학/의학 분야뿐만 아니라, 나노과학,^[12] 정밀계측^[13,14] 분야에서도 큰 응용 가능성을 보인다.

또한, 최근 10년 사이 홀로그래픽 기법이 파면의 제어에 사용되는 경우 피부와 같이 산란이 심한 매질에서의 다중 산란을 효과적으로 제어할 수 있다는 다양한 연구 결과가 소개되고 있다. 파면 제어(wavefront shaping)라고도 불리는 이 분야는, 매우 복잡한 형태로 일어나는 다중 산란이 stochastic한 현상으로 보이나, 물리적으로는 deterministic한 현상이라는 점에 착안해서, 산란 매질 내에서 빛의 투과를 홀로그래픽 기술을 이용해서 측정하고 제어한다.^[15,16] 이러한 홀로그래픽 파면 제어를 이용하면, 산란이 매우 심한 피부와 같은 시편을 지난 빛으로 광 초점을 만들 수 있다.^[17] 또한, 다중 산란의 높은 자유도로 인해 이렇게 제어된 빛을 특정 파장이나 편광 성분으로도 선택적으로 조절할 수 있으며,^[18,19] 심지어는 기존 광학계로는 제어가 매우 어려운 근접장, 또는 시공간(spatiotemporal) 제어 또한 가능하게 해준다.^[20-22]

본 글에서는 이처럼 홀로그래픽 측정과 제어 기술을 이용한 바이오 이미징 분야의 기본 원리와 첨단 연구 동향을 살펴보고자 한다.

고속 광 회절 단층 촬영법

홀로그래픽 측정을 이용한 정량 위상 영상을 통해 투명한 세포와 같은 위상 시편의 위상 정보뿐만 아니라 시편의 3차원 굴절률 분포 또한 정량적으로 측정할 수 있다. 굴절률은 생물학 시편의 화학적 조성 및 구조에 민감한 물질의 고유 광학 특성이다. 생물학 시편의 굴절률 값은 시편 내 단백질 농도에 정비례하므로, 생물학 시편의 굴절률 값으로부터 시편 내의 단백질 농도, 건조 질량(dry mass), 부피 등을 정량적으로 구할 수 있다.^[6,23]

미세 입자의 3차원 굴절률 분포는 다양한 정량 위상 현미경 기법을 사용하여 측정할 수 있다. 이 중 광 회절 단층 촬영법은 시편에 여러 다른 각도로 빛을 입사하고 이때 시편에 의해

산란된 광학장(optical field)을 간섭계를 이용하여 측정한 뒤 푸리에 회절 이론(Fourier diffraction theorem)을 이용하여 시편의 3차원 굴절률 분포를 측정하는 방법이다.^[24] 푸리에 회절 이론에 따르면 특정 각도로 입사한 빛에 의해 산란된 시편의 광학장의 2차원 푸리에 스펙트럼(Fourier spectrum)은 3차원 푸리에 공간상에서 Ewald 구면으로 사영(mapping)된다. 다양한 각도로 빛을 입사하며 측정한 광학장의 2차원 푸리에 스펙트럼을 3차원 공간에 사영한 뒤 3차원 역 푸리에 변환하면 시편의 3차원 굴절률 분포를 측정할 수 있다.

광 회절 단층 촬영법은 시편에 의한 빛의 회절과 굴절을 고려하기 때문에 시편의 3차원 굴절률 분포를 모양의 왜곡 없이 고해상도로 측정할 수 있다는 장점이 있다. 최근 광 회절 단층 촬영법을 이용, 적혈구뿐만 아니라 백혈구, HeLa 세포 등 내부 구조가 더 복잡한 생물 세포의 3차원 굴절률 분포를 측정하여 다양한 생리병리학적 환경에서의 생화학적, 구조적 변화

REFERENCES

- [6] K. Lee *et al.*, *Sensors* **13**, 4170 (2013).
- [7] G. Popescu and Y. Park, *Proc. of SPIE* **9336** (2015).
- [8] Y. Park, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, T. Kuriabova, M. L. Henle, A. J. Levine and G. Popescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6731 (2010).
- [9] K. Kim, S. Lee, J. Yoon, J. Heo, C. Choi and Y. Park, *Scientific Reports* **6**, 36815 (2016).
- [10] P. Jourdain, N. Pavillon, C. Moratal, D. Boss, B. Rappaz, C. Depeursinge, P. Marquet and P. J. Magistretti, *The Journal of Neuroscience* **31**, 11846 (2011).
- [11] J. Yoon, K. Kim, H. Park, C. Choi, S. Jang and Y. Park, *Biomed Opt. Express* **6**, 3865 (2015).
- [12] G. Baffou, P. Bon, J. Savatier, J. Polleux, M. Zhu, M. Merlin, H. Rigneault and S. Monneret, *ACS Nano* **6**, 2452 (2012).
- [13] K. Kim, J. Yoon and Y. Park, *Optics Letters* **41**, 934 (2016).
- [14] J. Park, H. Yu, J.-H. Park and Y. Park, *Optics Express* **22**, 24304 (2014).
- [15] H. Yu, J. Park, K. Lee, J. Yoon, K. Kim, S. Lee and Y. Park, *Current Applied Physics* **15**, 632 (2015).
- [16] A. P. Mosk, A. Lagendijk, G. Leroose and M. Fink, *Nature Photonics* **6**, 283 (2012).
- [17] I. M. Vellekoop and A. P. Mosk, *Optics Letters* **32**, 2309 (2007).
- [18] J. H. Park, C. H. Park, H. Yu, Y. H. Cho and Y. K. Park, *Opt. Lett.* **37**, 3261 (2012).
- [19] J.-H. Park, C. Park, H. Yu, Y.-H. Cho and Y. Park, *Opt. Express* **20**, 17010 (2012).
- [20] J. Park, J.-Y. Cho, C. Park, K. Lee, H. Lee, Y.-H. Cho and Y. Park, *ACS Nano* **10**, 6871 (2016).
- [21] J.-H. Park *et al.*, *Nature Photonics* **7**, 454 (2013).
- [22] J. Aulbach, B. Gjonaj, P. M. Johnson, A. P. Mosk and A. Lagendijk, *Phys. Rev. Lett.* **106**, 103901 (2011).
- [23] G. Popescu, Y. Park, N. Lue, C. Best-Popescu, L. Deflores, R. R. Dasari, M. S. Feld and K. Badizadegan, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C538 (2008).
- [24] E. Wolf, *Optics Communications* **1**, 153 (1969).

Fig. 2. (A) Cross-sectional slices of 3D RI tomograms of a macrophage and an optically trapped silica bead in the x-z plane. Modified from Ref. [28] (B) Cross-sectional slices of 3D RI tomograms of live mouse red blood cells flowing inside microcapillary of live mouse mesentery. Modified from Ref. [29] (CC By 4.0).

를 측정하는 연구가 수행되고 있다.^[25] 그러나 기존의 광 회절 단층 촬영법은 수백 개의 다양한 각도로 빛을 입사하며 수백 장의 영상을 촬영하므로 영상 촬영 시간에 제한이 있으며, 복잡한 연산을 수반하는 푸리에 변환을 반복적으로 수행하므로 3차원 영상을 재구성하는 데에 많은 계산 시간이 필요했다. 이로 인해 기존의 광 회절 단층 촬영법은 고속 촬영 및 실시간 촬영에 제한이 있었다.

이러한 한계를 극복하기 위해 최근 시편의 3차원 굴절률 분포를 고속 촬영할 수 있는 고속 광 회절 단층 촬영법 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^[26,27] 고속 광 회절 단층 촬영법 개발은 1) 입사 각도를 줄이며 다양한 각도로 빛을 빠르게 입사하는 기술 개발, 2) 그래픽 처리 장치(GPU: Graphic Processing Unit)를 사용하여 복잡한 계산이 필요한 푸리에 변환 등의 계산 속도를 향상하는 기술 개발의 두 단계로 나뉜다. 이를 통해 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ 부피의 3차원 굴절률 분포를 0.2초에 복원하는 실시간 광 회절 단층 촬영법이 개발되었으며, PMMA 이합체(dimer)의 3차원 브라운 운동, 유속의 흐름 변화에 따른 적혈구 모양의 변화를 실시간으로 3차원 영상화할 수 있었다.^[26] 또한, 이러한 광 회절 단층 촬영법은 1초당 60개의 3차원 굴절률 분포를 측정할 수 있어, 광 집게(optical tweezers)로 포획한 실리카 입자로 백혈구 세포막에 힘을 가하는 모습(그림 2A),^[28] 간 세포(hepatocyte) 내부 지방 방울(lipid droplet)의 3차원 브라운 운동,^[9] 살아있는 쥐 장간막 혈관 내부를 흐르는 살아있는 적혈구의 3차원 운동(그림 2B)^[29] 등 생명 세포 및 조직의 3차원 운동을 고속으로 측정하는 데에 이용되었다.

한편, 최근 디지털 소형 거울 장치(DMD: Digital Micromirror

Device)를 이용, 입사하는 빛의 각도를 빠르게 바꿔 시편의 3차원 굴절률 분포를 측정하는 속도를 향상하는 연구가 발표되었다.^[30,31] DMD는 상용 프로젝터의 영상 재생 기능에 핵심적인 부품으로써 수십만 개의 마이크로미터 크기의 소형 거울로 구성되며, 각각의 소형 거울의 켜짐/꺼짐 상태를 개별적으로 조절하여 DMD에 반사된 빛의 파면을 제어할 수 있다. DMD는 개별 거울의 크기가 매우 작아 광 회절 단층 촬영 장비에서 입사광의 각도를 수 kHz의 빠른 속도로 안정적으로 바꿀 수 있었으며, 이를 통해 폴리스티렌 구슬의 3차원 브라운 운동을 100 Hz의 속도로 측정할 수 있었다. DMD를 이용한 광 회절 단층 촬영 현미경은 최근 상업화되어, 여러 생명과학 연구실과 병원에서 활용되고 있다.^[32]

DMD를 이용하면 임의의 입사 파면을 안정적으로 제어할 수 있으므로, 향후 같은 광 경로 상에서 광 회절 단층 촬영과 구조화 조명 현미경(Structured illumination microscopy) 등의 다양한 현미경 기술을 동시에 구현하여 세포의 3차원 굴절률 분포뿐만 아니라 형광 정보를 이용하여 높은 분자 특이성(molecular specificity)을 갖는 영상을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

능동 홀로그래픽 광 제어

고속 광 회절 단층 촬영법을 이용하여 시편의 3차원 굴절률 분포를 실시간으로 구하는 기술은 복잡한 물체를 안정적으로 광 제어하는 데에도 효과적으로 응용될 수 있다. 기존의 광 제어 기술은 광 집게(optical tweezers)라 불리는데, 레이저 빛의 초점을 강하게 모아주면 초점 근처에서 인력이 작용하게 되어 시편을 포획하고, 초점의 위치를 바꿔주어 시편을 3차원 상에서 움직일 수 있다.^[33]

기존의 광 집게 기술의 경우 주로 구형 입자를 포획하고 3

REFERENCES

- [25] K. Kim, J. Yoon, S. Shin, S. Lee, S.-A. Yang and Y. Park, Journal of Biomedical Photonics & Engineering 2, 020201 (2016).
- [26] K. Kim, K. S. Kim, H. Park, J. C. Ye and Y. Park, Optics Express 21, 32269 (2013).
- [27] G. Dardikman, M. Habaza, L. Waller and N. T. Shaked, Opt. Express 24, 1839 (2016).
- [28] K. Kim, J. Yoon and Y. Park, Optica 2, 343 (2015).
- [29] K. Kim, K. Choe, I. Park, P. Kim and Y. Park, Sci. Rep. 6, 33084 (2016).
- [30] S. Shin, K. Kim, J. Yoon and Y. Park, Opt. Lett. 40, 5407 (2015).
- [31] S. Shin, K. Kim, T. Kim, J. Yoon, K. Hong, J. Park and Y. Park, Proc. of SPIE 9718, 971814 (2016).
- [32] For further information, please refer to Tomocube Inc. (www.tomocube.com).
- [33] D. G. Grier, Nature 424, 810 (2003).

Fig. 3. (A) Schematic figure and optical setup for tomographic mold for optical trapping (TOMOTRAP). (B) Time-lapse cross-sectional slice images of the measured tomograms for red blood cells which are trapped, rotated, translated and assembled by TOMOTRAP. (C) Time-lapse cross-sectional slice images of the measured tomograms for a red blood cell folded to be an L-shaped cell. (D) Time-lapse 3D isosurface of a HT-29 cell rotated by TOMOTRAP. Modified from Ref. [37](CC By 4.0).

차원 위치를 제어하는 데 이용되었다. 이는 빛이 구형 입자에 작용하는 힘과 이에 따른 입자의 반응은 Mie 이론을 이용하여 분석적으로 계산될 수 있기 때문이다. 그러나 입자의 모양과 내부 구조가 복잡해지는 경우 빛의 초점을 모아 광 집계를 만드는 경우 입자에 선형 힘뿐만 아니라 돌림 힘(torque)이 작용하여 입자가 광축 방향으로 정렬하려는 움직임이 있어 물체가 불안정한 운동을 하며, 광축 방향으로 정렬하여 물체의 방향을 제어하는 데 어려움이 있었다. 빛이 입자의 입자에 작용하는 힘을 예측하기 위해서는 T-matrix 방법, 이산 쌍극자 근사법 (Discrete Dipole Approximation) 등의 복잡한 수치 계산이 필요하여 비 구형 입자를 안정적으로 광 제어하는 것은 제한적이었다.^[34]

영국 Padgett 교수 연구팀은 최근 활발히 연구되고 있는 이광자 중합(two-photon polymerization) 기술을 이용하여 복잡한 형상의 물체에 구형 핸들을 만들고 이를 광 집계로 포획하여 안정적으로 위치 및 방향을 제어하는 기술을 발표했다.^[35] 이를 이용하여 구형 핸들이 붙은 표면 측정 탐침을 광 제어하여 물체 표면의 지형을 방향과 관계없이 탐지할 수 있음을 보였다. 또한 호주 Rubinsztein-Dunlop 교수, Bowen 교수 공동 연구팀은 T-matrix 방법을 반복적으로 사용하여 포획광의 최적화된 파면을 계산하는 기술을 개발했다.^[36] 이를 이용하여 크기가 큰 구형 입자의 포획 효율을 최대 20배가량 높일 수 있었다. 위의 연구들은 기존의 광 집계 기술로 안정적으로 제어할 수 없는 물체의 광 제어를 가능하게 했으나, 시편의 모양 및 광학적 특징에 대한 사전 정보가 필요하며, 이광자 중합 기술을 이용한 시편 제작과 T-matrix 계산 모두 많은 시간이 걸려 임의의 물체의 실시간 안정적 광 제어에는 한계가 있었다.

최근 본 연구진은 시편의 3차원 형상을 실시간으로 측정하고 이를 바탕으로 포획광의 파면을 제어하면 복잡한 형상의 시편의 방향 및 모양의 안정적 조절이 가능하다는 연구를 발표했다.^[37] 전자기 변분 원리(electromagnetic variational principle)에 따르면,^[38] 포획광과 유전(dielectric) 물체가 중첩되는 부분의 부피가 최대가 될 때 포획광에 대한 유전 물체의 전자기 에너지가 최소화된다. 따라서 임의의 모양을 가진 유전 물체를 기존 광 집계의 가우시안 빔으로 포획하면 포획광과 중첩되는 부분의 부피가 최대화되도록 방향(orientation)을 바꾸어 광축 방향으로 정렬하려고 할 것이며, 이는 앞서 언급한 현상을 잘 설명한다. 반대로, 이러한 원리를 역으로 생각하여 포획광의 모양을 물체의 모양과 같도록 파면을 제어하여 입사하면 어떻게 될까? 포획광과 유전 물체가 겹치는 부분의 부피는 자연스럽게 최대가 되어 포획광에 대한 유전 물체의 전자기 에너지가 최소화되므로 유전 물체는 방향을 바꾸지 않고 안정적으로 포획될 수 있을 것이다. 또한, 포획광의 모양을 유전 물체의 움직이고자 하는 방향, 위치 또는 모양으로 입사해주면, 유전 물체는 다시 전자기 에너지를 최소화하기 위해 갱신

REFERENCES

- [34] S. H. Simpson, J Quant Spectrosc Ra **146**, 81 (2014).
- [35] D. B. Phillips, M. J. Padgett, S. Hanna, Y. L. D. Ho, D. M. Carberry, M. J. Miles and S. H. Simpson, Nature Photonics **8**, 400 (2014).
- [36] M. A. Taylor, M. Waleed, A. B. Stilgoe, H. Rubinsztein-Dunlop and W. P. Bowen, Nature Photonics **9**, 669 (2015).
- [37] K. Kim and Y. Park, Nature Communications, in press (2017, arXiv preprint arXiv:1611.00638).
- [38] J. D. Joannopoulos, S. G. Johnson, J. N. Winn and R. D. Meade, *Photonic crystals: molding the flow of light* (Princeton university press, 2011).

된 포획광의 모양으로 정렬하게 되므로, 복잡한 형상의 물체의 방향, 위치 또는 모양을 안정적으로 제어할 수 있을 것이다.

본 연구진은 이를 구현하기 위해 고속 광 회절 단층 촬영법을 이용하여 시편의 3차원 굴절률 분포를 실시간으로 측정하고, 포획광의 3차원 광도 분포(light intensity distribution)가 시편의 3차원 굴절률 분포를 갖도록 포획광의 파면을 제어했다(그림 3A). 포획광의 3차원 광도 분포를 원하는 모양으로 만들 2차원 파면은 3차원 Gerchberg-Saxton 알고리즘^[39]을 이용하여 GPU로 실시간 계산하였으며, 이 파면을 공간 광 변조기(SLM: Spatial light modulator)에 투영하여 포획광의 3차원 광도 분포를 제어했다. 이를 통해 구형 입자로부터 대칭이 깨져있는 PMMA 이합체의 3차원 방향과 위치를 자유자재로 제어하고 조립하는 데 성공했으며, 적혈구(그림 3B-C), 대장암 세포(HT-29)(그림 3D) 등 복잡한 형상과 내부 구조를 갖는 다양한 생체 시편의 방향, 위치 및 모양을 안정적으로 제어할 수 있었다. 본 방법은 시편의 모양과 광학적 특성에 대한 사전 정보를 알지 않아도 임의의 비구형 입자를 안정적으로 제어하고 조립할 수 있다는 장점이 있다. 구현된 방법은 세포를 원하는 모양으로 안정적으로 변형시킬 수 있어 세포의 역학적 반응을 정량 분석할 수 있다. 또한 복잡한 형상을 갖는 세포들을 포획하고 조립하는, 세포 단계의 수술 작업을 광 제어하고 실시간 촬영하여 세포의 반응, 수술 예후 등을 모니터링할 수 있을 것으로 기대된다.

빛의 위상과 심부 조직 이미징

바이오 이미징에 대한 바탕 지식이 있는 독자의 경우 심부 조직(deep tissue) 이미징에서 위상의 중요성에 대해 의문을 품을 수 있을 것이다. 실제 현재 심부 조직 이미징 분야를 이끌고 있는 multiphoton 현미경, photoacoustic 현미경, diffuse optical tomography 등의 이미징 기술들은 각각 형광의 세기, 음파의 세기, 그리고 산란된 빛의 세기 분포를 측정하여 이미지를 구현한다. 이는 앞서 살펴본 홀로그래피 기반 현미경 기술들이 위상 측정에 주안점을 두는 것과 상반된 모습이다. 허나 Abbe가 처음 주장하였듯이, 모든 이미지 형성은 빛의 회절과 간섭의 결과물이다. 다시 말하자면, 빛의 세기만을 최종적으로 측정하더라도 그 이미지를 형성하기까지의 빛의 경로는 빛의 파면에 의해 결정되고 변화한다는 것이다.

이와 같은 이유로 심부 조직 고해상도 이미징을 구현하기 위해서는 최대한 작은 크기의 광 초점을 생체조직 깊숙이 전달할 수 있는 파면을 설계할 수 있는 위상 제어가 필수적이다. 일반적인 광학 렌즈는 평면파를 수렴하는 구면파로 변형시켜 목표 지점에 광 초점을 형성하도록 설계되어 있다^[40](그림 4).

Fig. 4. (Top Left) A lens is designed to transform a plane wave into a spherical wave that converges at the focal plane. (Top right) Light passing through inhomogeneous media results in a severely aberrated focus. (Bottom) Light passing through homogeneous media with different refractive index. Aberrations deteriorate the focus much more severely for high NA lenses. Modified from Ref. [40].

하나 렌즈와 목표 초점면 사이에 임의의 굴절률을 갖는 물질이 분포하게 되면 기존 렌즈의 디자인대로 회절 한계에 해당하는 광 초점이 형성되지 못한다. 굴절률이 높은 균일한 물질이 렌즈와 초점면 사이를 채울 경우, 높은 각도로 입사하는 빛의 성분들이 직각으로 입사하는 빛의 성분보다 상대적으로 큰 광 경로를 겪게 되어 곡면 수차(spherical aberration)가 발생하게 되며 이와 같은 수차는 고해상도 이미징을 위한 높은 개구수의 대물렌즈를 사용할수록 심하게 나타난다. 심부 조직 이미징의 경우 이보다 더 어려운 문제를 극복해야 한다. 조직을 이루는 각각의 세포 내부는 대부분 물로 이루어져 있지만 세포벽과 세포 내 소기관들은 복잡하고 불균일한 모양을 띠고 있다. 또한 이들 기관의 외벽은 대부분 지질로 이루어져 있으므로 각각의 경계면에서 굴절이 무수히 일어나게 되어 광 경로가 완전히 일그러지게 된다. 이 경우에는 렌즈를 이용하더라도 회절 한계에 해당하는 광 초점이 아닌 무작위적인 speckle 패턴이 나타나게 되어 고해상도 이미징은 불가능해진다.

수차를 일으키는 불균일한 굴절률 분포는 같은 조직 내에서도 관찰하고자 하는 위치에 따라 급격히 변하게 된다. 이에 따라 생체 조직에 의한 수차를 예측하여 렌즈의 디자인에 포함하는 것은 불가능하며 관찰하고자 하는 생체 조직에 따라 역동적으로 변할 수 있는 수차 보정이 요구된다. 이를 구현하기

REFERENCES

- [39] G. Whyte and J. Courtial, New J Phys **7**, 117 (2005).
- [40] N. Ji, Nature Methods **14**, 374 (2017).

위해서는 첫째, 생체 조직에 의해 교란된 빛의 파면 측정과 둘째, 교란된 빛의 파면을 다시 고해상도 광 초점 형성을 위해 필요한 구면파로 되돌릴 수 있는 파면 제어를 동시에 구현해야 한다.

수차 측정 및 보정을 위한 노력은 바이오 이미징이 아닌 천문학 분야에서 먼저 발전하였다.^[41] 허블 망원경과 같이 우주에 배치된 소수의 망원경을 제외한 지구상의 모든 망원경은 대기를 통과한 후의 별빛을 측정해야 하기 때문에 대기의 요동으로 인한 수차 보정을 해야 고해상도 이미지를 얻을 수 있다(아 이러니하게도 허블 망원경 또한 대기에 의한 수차가 아닌 잘못된 설계된 렌즈로 인한 수차 보정이 추후에 필요했다). 천문학에서는 빠르게 변하는 대기의 요동 속도를 따라가기 위해 수 밀리 초 단위의 시간 분해능으로 수차를 측정 및 보정해야 한다. 이에 따라 widefield 카메라를 이용하여 single shot으로 파면을 측정할 수 있는 Shack-Hartmann 파면 측정기의 개발이 주를 이루었다. Shack-Hartmann 파면 측정기는 카메라와 마이크로 렌즈 배열을 결합하여 파면의 tip/tilt를 초점의 공간상 이동으로 변환하여 파면을 측정 가능케 한다.

초창기 수차 보정(Adaptive Optics) 현미경에도 Shack-Hartmann 파면 측정기를 사용한 응용 사례들이 주를 이루었었다. 하나 Shack-Hartmann 파면 측정기는 마이크로 렌즈 배열을 구성하는 렌즈의 크기 및 개수에 따라 해상도가 제한되며, tip/tilt가 너무 클 경우, 혹은 렌즈의 크기에 비해 파면이 빠르게 변할 경우 정확한 파면 측정이 불가능하다. 천문학의 경우 대기에 의한 수차의 복잡도가 낮아 낮은 파면 해상도만으로도 어느 정도 정확한 보정이 가능하지만 생체 조직에 의한 수차는 복잡도가 훨씬 높기 때문에 더 높은 해상도의 정밀 측정 및 제어가 필수적이다(그림 5).

이에 따라 생체 조직에 의한 수차, 특히 뇌와 같이 산란이 심한 장기를 관찰하고자 할 때는 보다 높은 해상도의 파면 측정 및 제어가 필요하다. 이를 해결하기 위해 바이오 이미징 분야에서는 Shack-Hartmann 센서 등의 장비를 이용한 직접적인(direct) 파면 측정 방법 외에 파면 측정장치를 사용하지 않고 이미지 신호 등을 이용한 간접적인(indirect) 파면 측정 방법들이 최근 발전되고 있다. 예를 들어, 이광자 현미경의 경우 이미지 신호의 세기가 광초점의 세기의 제곱에 비례하여 증가하므로 이미지의 총 세기를 최대화할 수 있는 방향으로 파면을 조절하여 최적의 광초점을 복원할 수 있다. ~100개 정도의 픽셀로 제한되는 Shack-Hartmann 파면 측정기에 비해 파면 제어 장비는 수백만 개의 픽셀을 독립적으로 제어할 수 있는 액정 기반 공간 광 변조기 등을 사용할 수 있으므로 생체 조직뿐만 아니라 복수산란이 더욱 심하게 일어나는 두꺼운 페인트층도 통과하여 광초점을 재건할 수 있다. 간접적인 파면 측

Fig. 5. Typical measurement of the aberrated wavefront per depth in tissue using a Shack-Hartmann wavefront sensor. For low order aberrations (shallow depths), the aberrated wavefront is measured correctly. As we go deeper into tissue, higher aberrations occur and the pixelation due to the finite size of each lens results in incorrect measurements. Modified from Ref. [42].

정 방법은 또한 독립적인 파면 측정기가 필요 없으므로 가격 및 시스템 복잡도 측면에서 더욱 유리하다.

수차에 의해 왜곡된 파면을 측정/보정할 수 있는 다양한 기술들이 최근 개발되었지만, 실제 바이오 이미징에 사용할 수 있는 기술들은 극히 제한되어 있다. 예를 들면, 광간섭 단층촬영기(optical coherence tomography)를 피부와 같이 산란이 심한 조직에 적용할 경우, 다중 산란으로 인해 투과 깊이의 제약이 있는 문제가 있었다. 이를 극복하기 위해, 파면 제어 기법을 이용하여 각 측정 지점마다 광 초점 형성을 최적화하여 투과 깊이를 두 배 이상 증가시킨 연구도 보고된 바 있었다.^[44-46] 하지만, 모든 3차원 공간마다 파면을 제어하기 위해서는 상당히 오랜 제어 시간과 복잡한 측정 과정을 거쳐야 한다

REFERENCES

- [41] J. W. Hardy, *Adaptive optics for astronomical telescopes* (Oxford University Press, New York, 1998).
- [42] K. Wang, W. Z. Sun, C. T. Richie, B. K. Harvey, E. Betzig and N. Ji, *Nature Communications* **6**, 7276 (2015).
- [43] J. H. Park, W. Sun and M. Cui, *P Natl Acad Sci USA* **112**, 9236 (2015).
- [44] J. Jang *et al.*, *Optics Express* **21**, 2890 (2013).
- [45] H. Yu, J. Jang, J. Lim, J. H. Park, W. Jang, J. Y. Kim and Y. Park, *Optics Express* **22**, 7514 (2014).
- [46] H. Yu, J. P. Lee, K. Lee, J. Jang, J. Lim, W. Jang, Y. Jeong and Y. Park, *Journal of Biomedical Optics* **21**, 101406 (2016).

Fig. 6. Imaging through the skull of live mice. (Left) Conventional two photon microscope image. (Center) Aberration corrected image of dendritic spines through the skull, scale bar: 5 μ m. (Right) Correction wavefront. Modified from Ref. [43].

는 단점이 있었다.

이는 바로 생체 조직에 의한 수차가 위치에 따라 변한다는 점 때문이다. 이미지 구현을 위해서는 광 초점을 한 군데에서 가 아닌 이미지를 얻고자 하는 넓은 영역 내 모든 지점에서 복원해야 한다. 허나 앞서 살펴본 바와 같이 생체 조직의 불균일성으로 인해 하나의 보정 파면이 효과적으로 작동할 수 있는 영역은 극히 제한된다.

본 연구진은 이러한 문제를 해결하기 위한 첫 걸음으로 생체 조직에 의한 수차를 하나의 파면만으로도 보다 넓은 영역에 대해 보정할 수 있는 기술을 최근 선보였다. 이는 천문학에서 개발된 Multiconjugate Adaptive Optics에서 착안한 아이디어로 특정 두께를 갖는 산란층의 수차를 누적하여 하나의 파면 제어기로 보정하는 것이 아니라 대기의 여러 층에서 발생하는 수차를 층별로 구분하여 다수의 MEMS 거울을 사용하여 각각의 층에 의한 수차를 보정하는 개념이다. 이때 층별 수차를 구분하기 위해서는 앞서 살펴본 홀로그래피 기반 3차원 굴절률 측정과 유사하게 여러 대의 파면 측정기를 이용하여

서로 다른 각도에서 수차를 측정, 이들 정보를 취합하여 수차 tomogram을 얻게 된다. 허나 이러한 접근 방법을 산란이 심한 생체 조직에 그대로 적용하기에는 어려움이 있다. 이에 따라 본 연구진은 하나의 파면기만을 이용하여 수차 보정 이미징 측정 영역을 극대화하기 위해 파면 제어를 일반적인 현미경의 pupil plane이 아닌 산란층이 위치한 conjugate image plane에 설치하여 파면 제어의 효과적인 영역을 확대할 수 있음을 선보였으며, 이를 이용하여 생체조직 중 산란이 가장 심한 두개골을 통과하여 살아있는 쥐의 뇌세포 구조 및 뇌 내부면역 세포의 실시간 움직임을 관찰한 바 있다^[43](그림 6).

맺음말

바이오 이미징의 관찰 대상이 되는 세포는 대부분 물로 이루어져 있어 가시광선 대역에서의 흡수가 미미하다. 이러한 상황에서 세포와 빛의 상호작용은 세포의 굴절률 분포와 입사되는 빛의 파면에 의해 결정되게 된다. 최근 홀로그래피 기법을 통해 빛의 파면을 측정하고 제어함으로써 단일 세포의 3차원 굴절률 분포를 측정하거나 복잡한 모양의 세포 내 소기관 등을 독립적으로 제어할 수 있는 새로운 연구 결과들이 보고되고 있다. 더 나아가 생체 조직 내부에서 세포의 자연상태 그대로의 모습을 비침습적으로 관찰할 수 있는 위상 제어 기술들이 개발되고 있다. 앞으로 해당 기술들의 속도, 효율 등 실용적인 부분에서 획기적인 발전이 이루어질 경우 현재 대부분 연구실에 국한되고 있는 현미경 기술이 임상 그리고 더 나아가 우리의 실생활에 깊숙이 파고들 수 있게 되리라 기대한다.