

# 세포의 섬모 운동 변화 분석을 위한 CBF 분포도 구성 및 국소적 분포 분석에 관한 연구

°이원진, \*박광석, \*\*민양기, \*\*성명훈, \*\*이강수

°서울대학교 대학원 협동과정 의용생체공학, \*서울대학교 의과대학 의공학 교실

\*\*서울대학교 의과대학 이비인후과학 교실

## Distribution Mapping and Local Analysis of Ciliary Beat Frequencies

°W. J. Yi, \*K. S. Park, \*\*Y. G. Min, \*\*M. W. Sung, \*\*K. S. Lee

°Interdisciplinary Program in Medical and Biological Engineering Major, Seoul Nat'l Univ.

\*Dept. of Biomedical Engineering, College of Medicine, Seoul Nat'l Univ.

\*\*Dept. of Rhino-Laryngology, College of Medicine, Seoul Nat'l Univ.

### Abstract

By their rapid and periodic actions, the cilia of the human respiratory tract play an important role in clearing inhaled noxious particles. Based on the automated image-processing technique, we studied ciliary beat frequency (CBF) objectively and quantitatively. Microscopic ciliary images were transformed into digitized gray ones through an image-grabber, and from these we extracted signals for CBF. By means of a FFT, maximum peak frequencies were detected as CBFs in each partitioned block for the entire digitized field. With these CBFs, we composed distribution maps visually showing the spatial distribution of CBFs. Through distribution maps of CBF, the whole aspects of CBF changes for cells and the difference of CBF of neighboring cells can be easily measured and detected. Histogram statistics calculated from the user-defined polygonal window can show the local dominant frequency presumed to be the CBF of a cell or a crust the region includes.

### Keywords

CBF(Ciliary beat frequency), FFT(Fast Fourier transform), CBF 분포도, Ampicillin

### 1. 서론

인체 내에서 섬모는 후각 상피 세포, 상하기도, 그리고 중추 신경계의 전정기관의 와우관에서 발견된다. 기도와 후각 상피 세포 섬모의 중요한 역할은 미세 먼지 및 독소들을 동기된 빠른 동작을 통하여 제거하는 것이다. 섬모 운동 특성을 나타내는 운동 주파수(CBF ciliary beat frequency)는 인간에 있어서 체온하에서 보통 분당 1000회 정도의 스트로크를 가지는 것으로 알려져 있다. 한 개 섬모의 운동 특성을 분석해 보면 자유형 수영 선수의 움직임과 비슷하다는 것을 알 수 있다. 즉 빠른 forward beat(effective stroke)와 느린 return beat(recovery stroke)로 이루어져 있다. 여러 개 섬모의 beat는 동기화 되고 정렬된 metachronal한 파동을 형성한다. 섬모는

유체 내에서만 동작한다. 따라서 기도 내 유동적인 표피 층이 심모 운동과 점액 수송계의 각각의 심모 운동을 통합하는 역할에 있어서 매우 중요하다. 점액 수송계는 직경이 0.5mm나 되는 입자까지도 이송할 수 있는 능력이 있다. 따라서 이 메커니즘이 정상적으로 동작될 때는 박테리아 같은 경우에는 거의 점막 세포에 침투할 수 없다. 점액 수송계의 성능을 결정하는 심모의 CBF는 종들 간에 다양한 양상을 보일 뿐만 아니라 질병의 유무여하에 따라서 많은 영향을 받는다. 심모 운동의 beat 메커니즘과 질병 및 치료 약물에 의해 CBF가 변화되는 양상을 검사하기 위해서는 CBF를 정량적이고 객관적으로 측정할 수 있어야 한다.

CBF의 객관적인 측정을 위해 지금까지 여러 가지 방법이 시도되었다. 가장 고전적인 방법은 스트로보스코프를 이용하는 방법이다. 스트로보스코프의 주파수가 CBF에 동기화될 때 가장 작은 움직임을 나타내게 되고 이 주파수를 CBF로 간주하게 된다. 이 방법은 수 많은 심모 세포에 대해서 한 개의 주파수만을 측정할 수 있어서 결과적으로 측정된 주파수는 평균화된 심모 운동 주파수를 제공한다. 따라서 이 방법은 주위의 여러 다른 심모 세포들로부터 측정하고자 하는 부위의 CBF를 분리해 낼 수 없으며 한 개 세포의 CBF를 측정하는 것은 불가능하다. 그 이후 고속 촬영술 등 여러 가지 방법이 도입되어서 CBF의 좀 더 정확한 측정이 가능해졌지만 경제성 결여, 검사자 간 오류 등 기본적인 문제점을 안고 있었다.

1970년대 이후 photoelectric 신호를 이용한 방법이 보편화되었다. 심모 세포의 일정한 beat를 투과하거나 또는 beat에서 반사되는 빛이 광전 소자를 통해 전기 신호로 변환된 다음 오실로스코프를 통하여 관찰되거나 종이에 기록되었다. 이 방법에 의해서 얻을 수 있는 CBF의 해상도는 보통 10개의 심모 세포에 해당한다. 즉 10개 정도의 세포의 CBF가 평균된 값이 측정된다. 레이저 빛을 이용하여 측정에 포함되는 세포의 수를 1~2개로 한정시킬 수 있는 방법도 연구되었는데 이 방법은 너무 복잡하다. 광전

신호를 이용하는 방법이 보편화 됨에 따라서 여러 가지 보완된 기술이 응용되었다. 그 가운데에는 제한된 렌즈의 구경을 이용하여 입력되는 세포 영역을 한정시킴으로써 CBF의 해상도를 높일 수 있는 방법도 등장하였다. 또한 측정된 데이터를 분석하는 방법도 FFT(Fast Fourier Transform)를 이용하여 검사자 오류를 줄일 수 있게 되었다. 그러나 이 방법들은 현미경의 영상을 직접적으로 이용하지 않고 반사 또는 투과되는 빛을 이용한다. 따라서 특정 부위의 CBF를 측정하고자 할 때 주위의 다른 외래의 변화량이 포함되기 쉽다. 또한 이 방법도 한 개 세포의 CBF를 측정하는 것은 불가능하다.

최근 들어 개인용 PC와 영상 처리 기술의 발달에 힘입어서 디지털화된 영상을 이용하여 자동적으로 심모의 활동을 분석하는 방법이 등장하였다. 이 방법에서는 현미경이나 녹화된 영상으로부터 관심 영역이 디지털화된 다음 분석된다. 컴퓨터와 영상 처리 기술의 응용으로 말미암아 CBF의 측정에 있어서 좀 더 객관적이고 효과적인 결정을 할 수 있는 길이 열리게 되었다. 이 방법 가운데 하나는 여러 개의 세포를 동시에 측정한 다음 서로 간에 상관 관계가 분석되었다. 그러나 대부분의 방법은 영상의 전체 영역 가운데서 관심 영역만을 분석할 수 있으며 한 개의 세포에 대한 CBF는 제공하지 못한다.

본 논문에서는 영상 전체 필드에서 전반적인 CBF의 변화 추이를 측정할 수 있을 뿐만 아니라 각각의 세포들 간의 CBF 변화량도 동시에 측정할 수 있는 방법을 연구하였다. 영상의 전체 필드는 일정한 크기의 사각형 블록으로 나누어지며 FFT를 이용한 파워 스펙트럼(power spectrum)의 첫 번째 최고치 주파수가 그 블록의 CBF로 추정된다. 컬러 코드화된 CBF 분포도는 전체적인 CBF의 변화 추이를 반영하며 사용자가 지정한 다각형의 윈도우 영역의 히스토그램 분포도로 부터는 특정한 세포 또는 세포 크루스트(crust)의 CBF를 알 수 있다.

## 2. 재료 및 방법

본 연구는 일반적인 영상 처리 시스템을 기반으로 한다. 즉 현미경-CCD 카메라에 의해서 NTSC 영상 신호가 PC에 장착된 영상 수집 보드에 의해 디지털 영상으로 전환된다. 약 2초(64 frame) 동안의 영상이 PC의 주메모리에 저장된다. 저장된 영상의 크기는 가로 640 화소 세로 480 화소이며 각각의 화소는 256가지의 그레이 레벨(8 bit)로 표시된다. 분석 시 각각의 영상은 현미경의 배율과 측정하고자 하는 CBF의 공간적인 해상도를 고려하여 일정한 사각형의 블록으로 나누어진다. 블록의 가로와 세로의 크기가 각각 4 화소일 경우 최대의 해상도로 CBF를 측정할 수 있다. 이때 전체 블록의 수는 19200(160\*120)이 되며 다소 낮은 배율에서도 세포 간의 CBF 차이를 분석할 수 있는 공간적 해상도를 갖는다. 현미경의 배율이 1000(\*100)일 경우에는 블록의 가로 세로의 크기가 각각 10 화소(64\*48)이면 충분히 세포 및 세포 크러스트 간의 CBF를 분리해 낼 수 있다.

세포의 주기적인 움직임은 영상에 있어서 고정된 위치에서는 화소의 주기적인 밝기의 변화로 나타난다. 이것은 세포의 CBF와 상관되어 있으며 기준 프레임의 영상에서 연속적인 영상에 대해 빼게 되면 일정한 주기적인 신호를 얻을 수 있다. 각각의 블록에 대해 화소 대 화소 차이가 계산된 후 블록 내의 모든 화소에 대해 더해지게 된다. 영상으로부터 데이터를 추출하는 식은 아래와 같다. 추출된 데이터는 FFT를 통하여 CBF가 결정된다.

$$a_i(k) = \sum_{x=0}^{m-1} \sum_{y=0}^{n-1} [g_k(x,y) - g_0(x,y)], \text{ for } k = 0 \dots 63$$

$$h_i(k) = a_i(k) - \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} a_i(n), \text{ for } k = 0 \dots 63, N = 64$$

$i$  : number of divided blocks per field

$k$  : number of successive image frames

$g_k(x,y)$  : grey-level of the pixel(x,y) of frame k

$g_0(x,y)$  : grey-level of the pixel(x,y) of reference frame

$a_i(k)$  : summed grey-level difference of block i, frame k

$h_i(k)$  : mean subtracted difference of block i, frame k

영상 신호의 획득 속도는 초당 30 frame(60 fields per sec)이다. 따라서 프레임 단위로 영상을 분석할 경우 CBF를 15Hz까지 측정할 수 있으며 필드 단위로 분석할 경우에는 30Hz까지 측정 가능하다. 전체 획득되는 영상의 수가 64프레임이므로 FFT 파워 스펙트럼의 최소의 주파수 단위는 0.47Hz(30/64)가 된다. 각각의 블록으로부터 구해진 파워 스펙트럼에서 최고치를 나타내는 주파수를 이용하여 CBF 분포도가 구성된다. 분포도를 구성할 때 파워 스펙트럼의 두 번째 최고치가 첫 번째 최고치보다 80%이하 일 경우에만 칼라 코드화된 CBF 값을 표시하고 다른 나머지 블록에 대해서는 화소의 그레이 값을 표시한다. 256 가지의 팔레트에 대해 128개의 팔레트는 0Hz부터 15Hz에 이르는 CBF 값을 표시하고 나머지 팔레트는 절반으로 축소된 화소의 그레이 값을 나타낸다. 0Hz는 RGB 팔레트에서 파랑(0,0,255)으로 표시되고 7.5Hz, 15Hz는 각각 녹색(0,255,0), 빨강(255,0,0)으로 표시된다. 중간 단계는 선형적으로 추정된다.

파워 스펙트럼으로부터 구성된 CBF 분포도는 획득된 영상의 모든 필드에 포함되는 세포의 세포 운동 주파수를 가지적으로 표현한다. 실제로 세포의 세포 자체 뿐만 아니라 세포 자체와 세포를 둘러싸고 있는 용액도 세포의 주기적인 운동에 영향을 받아서 일정한 주기적인 움직임을 보인다. 이러한 움직임은 분포도 상에서 낮은 주파수 즉 파랑 색으로 코딩되어 나타난다. 또한 분포도는 세포의 세포 운동 주파수가 서로 다를 경우 특성을 쉽게 구분할 수 있게 해준다. 같은 세포 크러스트 내의 CBF는 물론이고 같은 세포의 세포에서도 약간씩 다른 CBF 양상을 나타낸다. 약물 투여 후 CBF의 변화 분석 시 CBF 분포도로부터 CBF의 변화 추이를 쉽게 측정할 수 있다. 즉 현미경에서 획득되는 영상을 세포가 배양된 용액 내의 특정 세포에 고정된 다음 일정한 시간 간격으로 녹화한 다음 분석하면 약물에 의한 CBF의 변화를 직접적으로 관찰할 수 있다. 이비인후과에서 사용되는 여러 가지 치료제 및 항생제의 투여 후 시간 경과에 따른 세포 운동에 미치는 영향을 쉽게 분석할 수 있다. 인체 및 동물의 여러 다른

기관으로부터 채취한 세포의 섬모 운동의 비교 연구에도 유용하게 사용할 수 있다. 즉 다양한 실험 동물들의 기관별 세포를 서로 다른 배양액 상에서 영상을 저장한 다음 CBF 분포도를 통하여 분석하면 약물 실험시 대조군으로 이용될 수 있다. 섬모 운동 분석 시 CBF 변화의 전체적인 양상뿐만 아니라 특정 세포 또는 특정 세포 크러스트의 국소적인 CBF의 값을 측정할 필요가 있다. 즉 섬모의 주기성을 대표할 수 있는 CBF를 추정해야 한다. 이를 위해 사용자가 특정 세포의 일정한 부위를 지정한 후 여기서 CBF의 히스토그램 분포가 구해진다. 히스토그램의 최고치를 나타내는 주파수가 그 영역 즉 세포 또는 크러스트를 대표하는 CBF로 추정할 수 있다. 또는 높은 CBF의 발생율을 가지는 일정한 주파수 영역에서 자신의 조건부 확률을 곱한 가중치 주파수가 대표 주파수로 결정될 수도 있다.

### 3. 결과 및 토의

약물에 대한 CBF의 변화를 측정하기 위해서 인 비인후과에서 중이염의 치료에 널리 사용되는 항생제인 ampicillin을 이용하였다. 아직까지 중이 상피 세포의 섬모 운동(CBF)에 대한 ampicillin의 직접적인 연구는 시행된 바 없다. 쥐(rat)의 중이상피에서 채취한 표본을 배양액에서 ampicillin을 투여한 후 시간 경과에 따른 CBF의 변화를 측정하였다. 600(\*100), 60(\*10), 6(\*1), 0.6(\*0.1) 그리고 0.06(\*0.01) mg/ml의 농도를 가지는 ampicillin 용액에 표본을 노출시킨 후 5, 10, 20, 40 그리고 60 분의 시점에서 영상을 녹화한 후 분석하였다. 녹화시 지정된 필드를 고정시키고 시간경과에 따른 영상을 같은 지점에서 획득하였다. 대부분의 고정된 필드에서 CBF에 대한 ampicillin의 영향은 600, 60 그리고 6 mg/ml의 농도 하에서는 세포의 CBF를 증가시켰으나( $P < 0.0001$ ) 0.6 과 0.06 mg/ml의 농도 하에서는 무시할 수 있었다. 시간 경과에 대한 ampicillin의 농도에 따른 CBF의 평균적인 변화 추세가 그림 7에 나타나 있다.

고정된 세포에 대한 CBF의 단기적인 변화 추이

가 그림 2-4에 나타나 있다. 전체적으로 세포의 섬모에 해당하는 필드에서 시간 경과에 따라 색조가 빨강색으로 변화되고 있음을 알 수 있다. 즉 히스토그램으로부터 얻어진 세포의 섬모 부분의 CBF가 최고치 주파수나 가중치된 주파수 값에 있어서 역시 증가하고 있음을 보여주고 있다. 같은 크러스트 내의 세포들도 서로 다른 CBF 양상을 가짐을 CBF 분포도를 통해서 쉽게 파악할 수 있다. 세포 내에서도 섬모의 위치에 따라 약간씩 다른 CBF 값을 갖는데 세포에 대한 대표적인 CBF를 부여하기 위해 그 세포를 포함하는 다각형 영역의 히스토그램으로부터 최고치 주파수 또는 높은 확률을 가지는 주파수 영역에 대한 가중치 값을 사용한다. 획득되는 영상의 프레임 대 프레임(30Hz) 분석과 필드 대 필드(60Hz) 알고리즘으로 분석한 결과가 그림 5-6에 나타나 있다. 세포의 CBF의 히스토그램 분포로부터 전체적인 양상에 있어서 유의한 차이가 없음을 알 수 있다.

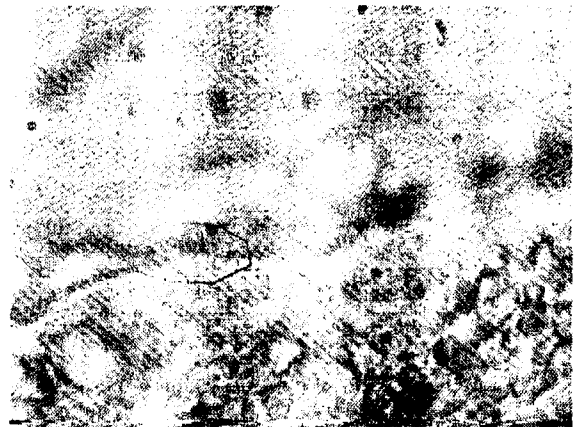


그림 1. 섬모 세포 영상

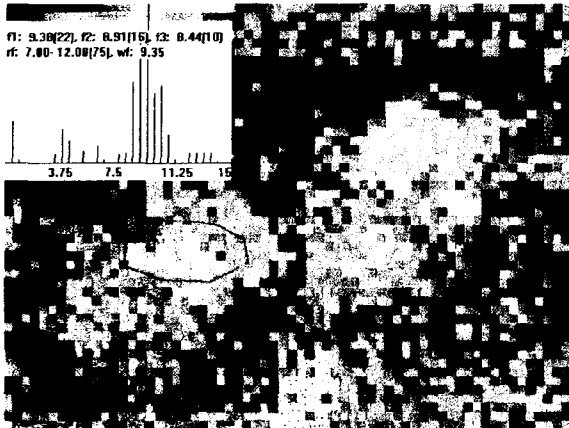


그림 2. 5분 경과 후 CBF 분포도

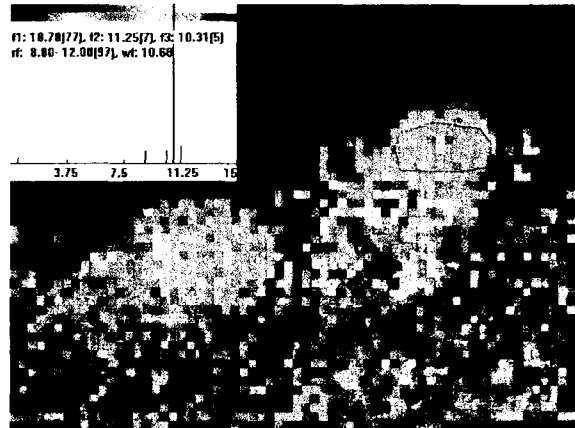


그림 5. 30Hz 분석시 CBF 분포도

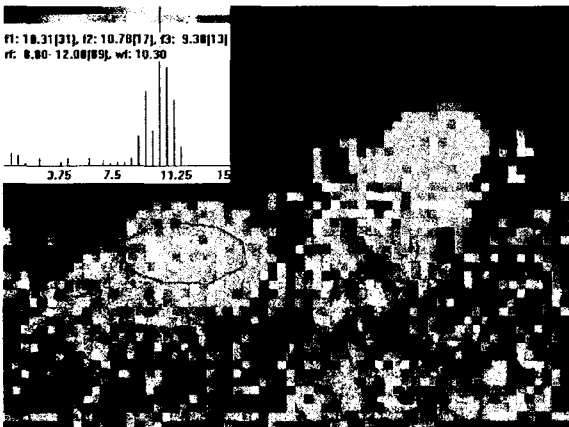


그림 3. 10분 경과 후 CBF 분포도

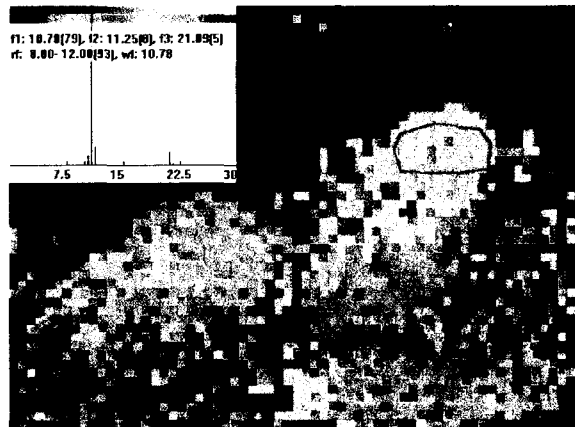


그림 6. 60Hz 분석시 CBF 분포도

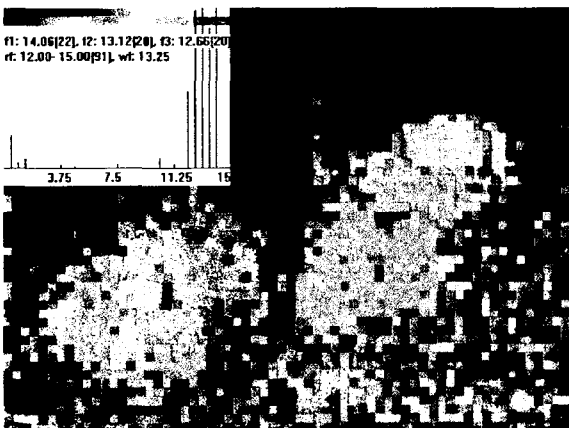


그림 4. 40분 경과 후 CBF 분포도

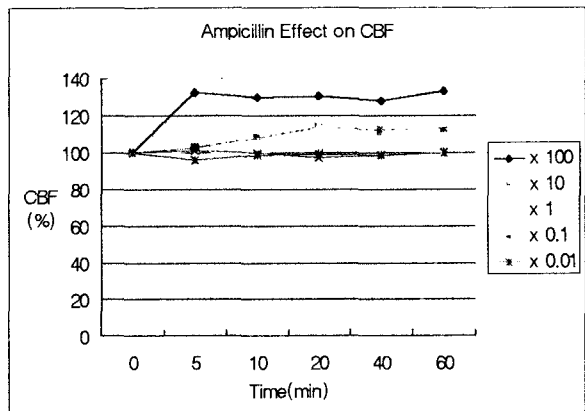


그림 7. ampicillin의 CBF에 대한 단기적인 영향

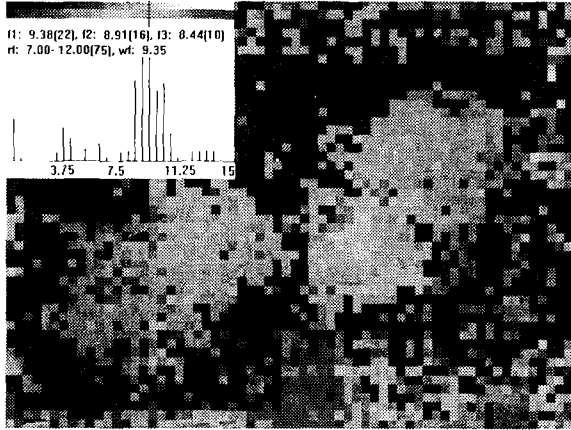


그림 2. 5분 경과 후 CBF 분포도

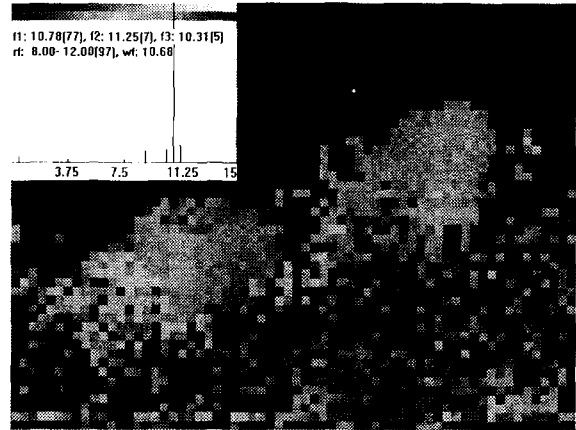


그림 5. 30Hz 분석시 CBF 분포도

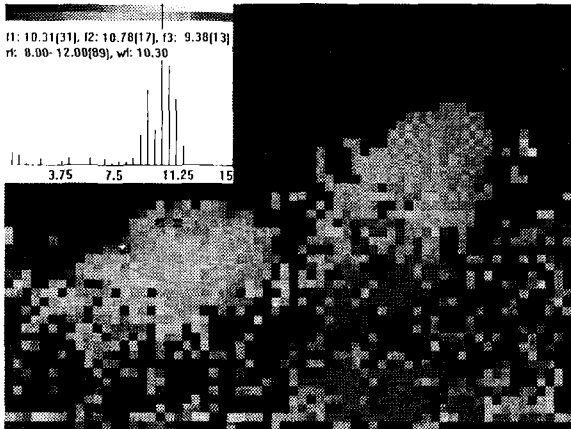


그림 3. 10분 경과 후 CBF 분포도

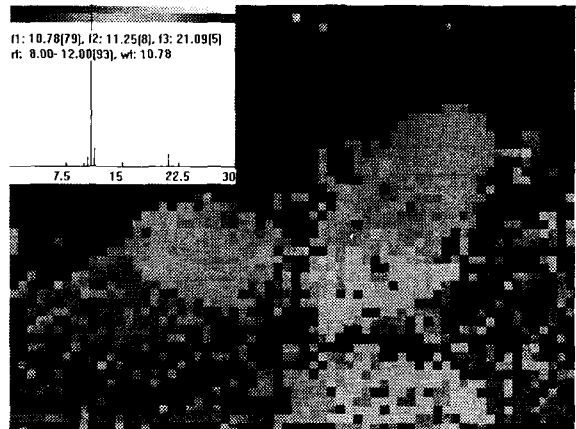


그림 6. 60Hz 분석시 CBF 분포도

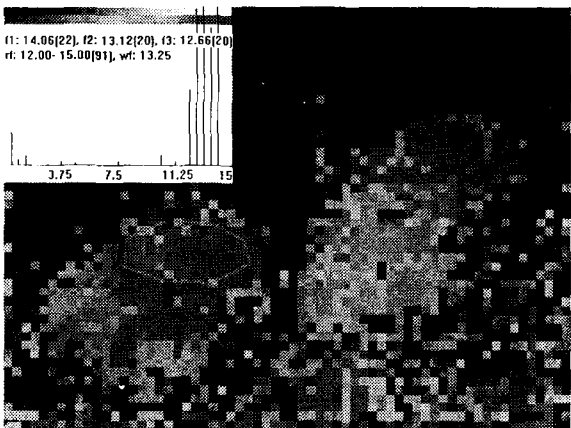


그림 4. 40분 경과 후 CBF 분포도

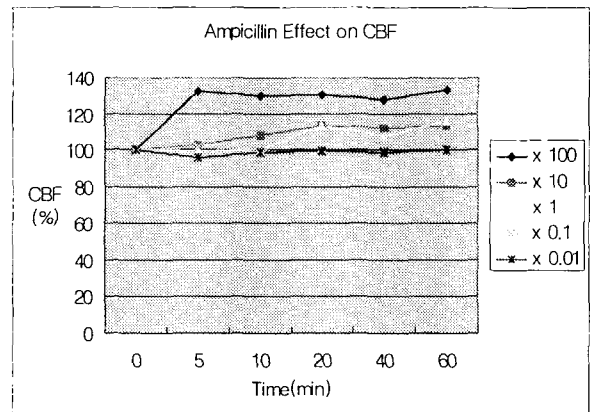


그림 7. ampicillin의 CBF에 대한 단기적인 영향

#### 4. 결론

세포의 섬모 운동 변화 분석을 위한 CBF 분포도는 CBF의 장 단기적인 변화 추이를 객관적이고 정량적으로 반영하므로 약물에 대한 CBF 영향 분석 시 매우 유용하다. 또한 같은 필드 내의 세포간의 CBF 차이 정도를 쉽게 측정할 수 있다. 고정된 세포에 대한 CBF의 변화 분석 시 지정된 영역의 히스토그램 분포를 이용하면 CBF의 변화를 정량적으로 측정이 가능하다. 본 연구는 이비인후과에서 사람에게 투여하는 여러 가지 치료제 및 항생제에 대한 CBF의 영향을 분석하기 위해 사람 및 동물 표본에 대한 실험에 실제로 많이 사용되고 있다.

#### References

DALHAMN T. (1974) : 'Mucous flow and ciliary activity in the trachea of healthy rats exposed to respiratory irritant cases', Acta. Otolaryngol., **78**, pp. 118

GEORGES NASR, DAMIEN SCHOEVAERT, FRANCELIN MARANO, ANNICK VENANT and JEAN JACQUES LEGRAND (1995) : 'Progress in the measurement of ciliary beat frequency by automated image analysis : Application to mammalian tracheal epithelium', Anal. Cell. Path., **9**, pp. 165-177

HISAMATSU K. (1995) : 'Factors Relevant to Ciliary Activity of the Airway Mucosa', Med. J. of Yamanashi Med. Univ. in Japan, **12**, pp. 23-34

H. Teichtahl, P. L. Wright and R. L. G. Kirsner (1986) : 'Measurement of *in vitro* ciliary beat frequency : a television-video modification of the transmitted light technique', Med. & Biol. Eng. & Comput., **24**, pp. 193-196.

INGELS K.J.A.O. VAN STRIEN H.L.C.J., GRAAMANS K., SMOORENBURG G.F. and HUIZING E.H.(1992) : 'A study of the photoelectrical signal from human nasal cilia under several conditions', Acta. Otolaryngol., **112**, pp. 831-838

JEAN YAGER, TZENG-MING CHEN and MAURICIO J. DULFANO (1978) : 'Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium', Chest, **73**, pp. 627-633

JOHN R. KENNEDY and KERMIT E. DUCKETT (1981) : 'The study of ciliary frequencies with an optical spectrum analysis system', Experi. Cell Res., **135**, pp. 147-156

REIMER A. and TOREMALM N.G.(1978) : 'Mucociliary activity of the upper respiratory tract', Acta. Otolaryngol. **86**, pp. 283-288

ROMET S., DUBREUIL A., BAEZA A., MOREAU A., SCHOEVAERT D. and MARANO F.(1990) : 'Respiratory tract epithelium in primary culture : Effects of ciliotoxic compounds', Toxic. in Vitro, **4**, pp. 399-402

STEPHEN J. HENNESSY, LID B. WONG, DONOVAN B. YEATES and IRVING F. MILLER (1986) : 'Automated measurement of ciliary beat frequency', J. Appl. Physiol., **60**(6), pp. 2109-2113

TEICHTAHL H., WRIGHT P.L. and KIRSNER R.L.G.(1986) : 'Measurement of *in vitro* ciliary beat frequency : a television-video modification of the transmitted light technique', Med. & Bio. Eng. & Com., **24**, pp. 193-196

WYLIE I. LEE and PEDRO VERDUGO(1976) : 'Laser Light-scattering spectroscopy : A new application in the study of ciliary activity', Biophy. J., **16**, pp. 1115-1119

#### Corresponding Author

Kwang-Suk Park