

## 1. 서론

현미경 (microscope)은 그리스어에 어원을 둔 말로서 보다(to look, see)라는 의미를 가지고 있다. 육안으로 구별하기 어려운 작은 물체를 관찰하는 도구로서의 현미경은 1665년 Robert Hooke에 의해서 최초로 개발되었다 [1]. 하지만, 일반적인 광학현미경은 빛의 세기만 측정할 수 있기 때문에, 빛의 흡수가 적은 생체 조직이나 세포와 같은 투명한 물질에 대한 이미지를 효과적으로 획득하기 어려웠다. 이러한 문제를 해결하기 위해 Fritz Zernike은 1942년에 빛의 위상차를 빛의 세기로 변환하는 위상차 현미경 (phase contrast microscopy)을 개발하였다 [2]. 이 업적으로 Zernike은 1953년에 노벨 물리학상을 수상하였다. 위상차 현미경의 원리는 측정 하고자하는 물질의 두께와 굴절률에 의해서 생기는 빛의 위상 변화

량적으로 측정하기 어렵다. 2000년 이후 시편의 위상차를 정량적으로 영상화 하려는 노력이 이루어져 왔고, 최근 다양한 종류의 정량 위상 현미경 (quantitative phase microscopy) 기술이 개발되어, 이를 이용한 광학 측정 기반의 다양한 융합 연구가 진행되고 있다. 특히, 빛의 위상 정보를 이용한 생물학/의학 분야에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 글에서는 바이오 이미징 분야에서 다양한 응용이 가능한 정량 위상 현미경의 원리와 연구 개발 동향, 그리고 이를 이용하여 이루어지고 있는 최신 응용 연구 결과들에 대해서 살펴보고자 한다.

## 2. 위상 현미경의 원리

일반적으로 시편에 평면파가 투과하는 경우 (그림1), 시

# 특집 | Optical Microscopy & Biomedicine

## 위상 현미경을 이용한 생물 및 의학적 응용

김영찬, 박용근<sup>1)\*</sup>

를 간단한 필터를 사용하여 빛의 세기로 변환하여 측정하는 방법이다. 위상 현미경은 투명한 물체의 이미지 명암비(contrast)를 획기적으로 향상 시킬 수 있었고, 간단한 장비 구조로 인해 아직까지 수 많은 생물학 실험실과 병원 연구실에서 널리 사용되고 있다.

Zernike에 의해 개발된 위상차 현미경은 살아있는 생물학 시편을 매우 뛰어난 명암비를 가진 이미지로 영상화 시키지만 정량적인 분석이 어렵다는 단점이 있다. 위상차 현미경을 통해 획득한 빛의 세기 이미지는 실제 시편에서 발생한 빛의 위상차와 비선형 관계에 있기 때문에, 위상차 현미경의 영상으로부터 시편의 두께와 같은 정보를 정

편의 두께  $h(x, y)$ 와 굴절률  $n_c$ 에 의해 빛의 파형(wave front)의 왜곡이 위상차  $\Delta\phi(x, y)$ 로 나타난다. 그림 1은 평면파로 입사하는 빛이 시편을 지난 후, 파면의 왜곡이 생기는 것을 보여준다. 이 때 샘플을 지난 후의 광학장(optical field)을 정밀하게 측정하여, 위상 차 정보를 추출하는 것이 정량 위상 현미경의 기본적인 원리이다. 여기서 파장  $\lambda$ 에 대한 위상차는 다음과 같이 표현 된다:

$$\Delta\phi(x, y) = \frac{2\pi(n_c - n_m)}{\lambda} h(x, y). \quad (1)$$

<sup>1)</sup> yk.park@kaist.ac.kr; <http://bmokaist.wordpress.com>

\* KAIST 물리학과

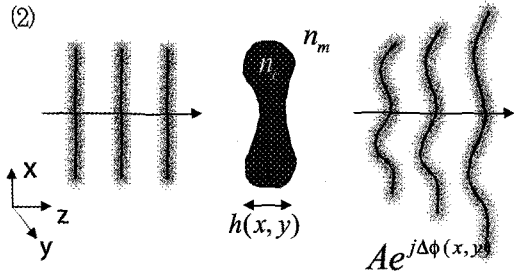
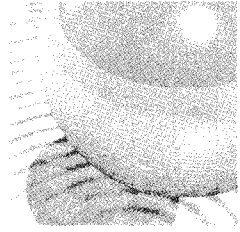


그림 1. 평면파가 시편을 투과할 때, 시편의 두께  $h(x, y)$ 와 굴절률  $n$ 에 의해 위상차를 가지고 파면이 왜곡되어 투과해 진행하는 개념도.  $n_m$ 은 샘플 주위 물질의 굴절률을 나타낸다.

광학장을 정밀하게 측정하기 위해 일반적으로 digital holography나 interferometric imaging 기법을 사용하는데, 빛의 간섭을 사용하여 시편을 투과한 광학장을 정량적으로 측정한다는 점에서 같은 원리를 사용한다. 시편을 투과한 광학장(sample field)과 시편을 투과하지 않은 기준 광학장(reference field)을 간섭 시키는 방식에 따라 여러 가지 기술로 분류가 된다. 대표적으로, (1) reference field의 전체적인 phase를 시간적으로 바꿔가면서 간섭을 시키는 temporal modulation (또는 phase-shifting interferometry), (2) reference field와 sample field가 광학 축 기준으로 작은 각도 차이를 가지고 간섭이 되는 spatial modulation, (3) 빛의 편광을 사용하여 간섭하는 polarization modulation 방법들이 있다.

이 장에서는 spatial modulation을 사용하는 정량 위상 현미경의 원리에 대해서 간단히 설명하고자 한다. 시편을 투과한 광학장을 정량적으로 측정하기 위해, 시편을 투과하지 않은 평면파와 작은 각도 차를 가지고 간섭 시키면, 광학카메라가 위치한 면에서의 광학장은 다음과 같이 표현된다.

$$E(x, y) = |E_0|e^{j(u_0x+v_0y)} + |E_1(x, y)|e^{j\Delta\phi(x, y)} \quad (2)$$

위 식 (2)에서,  $|E_0|$ 와  $|E_1|$ 는 각각 reference와 sample 광학장의 진폭(amplitude) 이고,  $\Delta\phi(x, y)$ 는 시편에서 발생한 위상차 (그림1참고),  $u_0, v_0$ 는 작은 각도 차에 의한  $x, y$  축 방향 공간주파수이다. 식 (2)로 표현되는 광학장은 아래 식 (3)으로 표현되는 간섭광의 세기(intensity)로 카메라를 통해 측정된다.

$$I(x, y) = E \times E^* = |E_0|^2 + |E_1(x, y)|^2 + 2|E_0||E_1(x, y)|\cos(u_0x + v_0y - \Delta\phi(x, y)) \quad (3)$$

식 (3)은 다음과 같이 다시 표현 될 수 있다.

$$I(x, y) = b(x, y) + c(x, y)e^{j(u_0x+v_0y)} + c^*(x, y)e^{-j(u_0x+v_0y)} \quad (4)$$

여기서,  $b(x, y) = |E_0|^2 + |E_1(x, y)|^2$ ,  $c(x, y) = |E_0||E_1(x, y)|e^{j\Delta\phi(x, y)}$ 이다. 그림 2a는 정량 위상 현미경을 사용하여 CCD 카메라에서 측정된 간섭 신호의 예를 보여준다. 시편은 사람의 적혈구이다. 여러 개의 간섭무늬가 사선 방향으로 나타나 있는 것을 확인할 수 있다.

CCD 카메라에서 측정되어 저장된 2차원 간섭광의 세기 정보로부터 공간 푸리에 변환(spatial Fourier transform)을 사용하여 광학장 정보를 추출할 수 있다 [3]. 그림 2a의 간섭광 세기 정보를 2차원 푸리에 변환을 하게 되면 다음과 같은 Fourier spectrum을 얻게 된다 (그림 2b).

$$G(u, v) \equiv \text{fft}[I(x, y)] = B(u, v) + C(u - u_0, v - v_0) + C^*(u + u_0, v + v_0) \quad (5)$$

식(4)로 표현되는 Fourier spectrum 중 에서 측정 하고자 하는 시편의 광학적 정보는  $c(x, y) = |E_0||E_1|e^{j\Delta\phi(x, y)}$ 이다. 이 정보는 그림 2b에서 점성 원으로 표시된 부분이다. 이 정보만을 추출하기 위해 그림 2b의 Fourier spectrum 정보에서  $C(u - u_0, v - v_0)$ 에 해당하는 부분(검정색 원내 영역)만 선택한 후 중앙으로 이동하면  $C(u, v)$ 로 표현된다. 이를 역 푸리에 변환을 하게 되면 식6과 같이 시편에서의 광학장을 정량적으로 추출할 수 있게 된다.

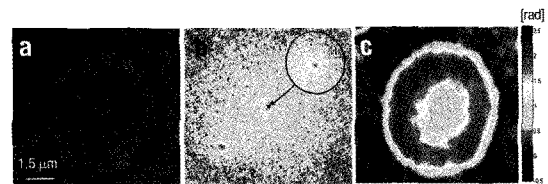


그림 2. 위상 현미경을 이용하여 적혈구에 대한 위상 이미지를 얻는 과정 (a) 샘플을 투과한 왜곡된 평면파와 샘플을 지나지 않은 평면파의 중첩된 신호를 CCD 카메라로 측정된 이미지. (b) (a)에서 측정된 중첩된 신호를 2차원 푸리에 변환을 이용하여 분석한 Fourier spectrum. (c) (b)의 결과를 이용하여 분석한 적혈구의 위상차 이미지.

# 위상 현미경을 이용한 생물 및 의학적 응용

$$fft^{-1}[C(u, v)] = c(x, y) = |E_0||E_1(x, y)|e^{i\Delta\phi(x, y)} \quad (6)$$

그림 2c는 추출된 시편 광학장 정보 중에서 위상차  $\Delta\phi(x, y)$ 를 보여준다. 오른쪽 색 막대기는 위상 지연에 해당하는 단위인 radian을 사용하며, 이 물리량은 샘플의 굴절률을 알고 있을 때 수식 (1)을 이용해서 시편의 절대적인 두께 정보로 변환될 수 있다.

## 3. 위상 현미경 연구 동향

최근 들어, CCD 카메라를 이용하는 디지털 홀로 그래픽 현미경 기술의 비약적인 발전으로 다양한 종류의 응용이 이루어지고 있다. 특히, 다양하게 개발된 전 영역 위상 영상 (full-field phase imaging) 기술에 의해서 생물학적 응용이 활발하게 이루어지고 있다. 이 장에서는 2차원과 3차원 위상 현미경의 대표적인 몇 가지 기술들에 대해서 설명하고자 한다. 이 글에서 다루지 못한 다양한 위상 현미경 기술들에 대한 전반적인 내용에 대해서는 참고문헌 [4-5] 등에서 참고할 수 있다.

### 1) 2차원 위상 현미경

#### (1) 푸리에 위상 현미경 (Fourier Phase Microscopy, FPM)

푸리에 위상 현미경은 Programmable Phase Modulator (PPM)을 사용하여 기준광학장의 위상을 여러 번 바꾸면서 간섭 이미지를 측정하고 이로부터 시편의 광학장 정보를 추출하는 방식이다 [7]. PPM은 액정을 전기적으로 제어함으로써, 액정을 지나는 빛의 위상차를 원하는 대로 조절할 수 있는 장비이다. 푸리에 위상 현미경의 원리는 그림3에 도식되어 있다. 일반적인 현미경에 시편을 위치시키고 평면파를 입사시키면, 현미경의 output port의 영상면(image plane)으로 시편의 광학장이 전달된다. 이 영상면의 광학장을 렌즈 L2이 초점거리 뒤에 위치한 PPM 면으로 전달시키면 시편에서 산란된 빛(점선)은 PPM표면 전체에 걸쳐서 분산되고, 시편에서 산란되지 않은 빛(실선)은 PPM면의 정중앙으로 모이게 된다. 이때 PPM의 정중앙에 위상차를 순차적으로 주면서 그에 따른 간섭이미지를 CCD(charged coupled

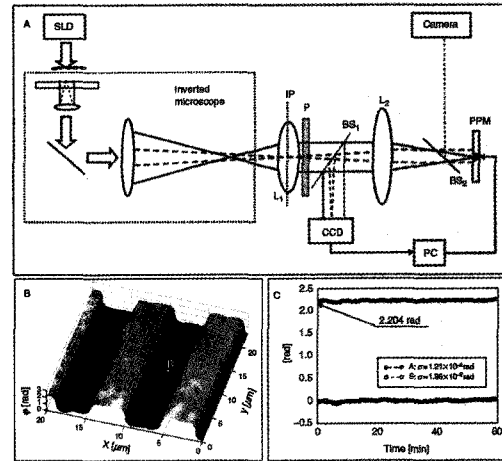


그림 3. 참고문헌 [7]에 소개된 푸리에 위상 현미경의 원리와 응용. (A) 장비 개략도. SLD, Super Luminescent Diode, IP, Imaging plane, P, Polarizer, L1-2, Lens, BS1-2, beam splitter, PPM, Programmable Phase modulator. (B) 푸리에 위상 현미경으로 측정된 Grating 위상 이미지, (C) (B)에 표시된 A와 B지점에서 측정된 위상값의 시간 변화.

device)에서 측정하면, temporal modulation 방법으로 시편의 광학장을 복원해 낼 수 있게 된다.

푸리에 위상 현미경은 시편의 광학장과 간섭에 필요한 기준 광학장이 같은 광학 경로를 지나가는 common-path 구조이기 때문에, 공기의 요동이나 기계적 진동 등에 의해 발생할 수 있는 위상 잡음이 매우 적다는 장점을 가지고 있다. 하지만, 하나의 광학장 정보를 추출하기 위해서는 기준 광학장이 서로 다른 위상차를 가지는 3-4개의 간섭 이미지를 측정해야 하기 때문에, 빠른 동적 변화를 측정하기는 어렵다는 단점을 가지고 있다.

#### (2) 힐버트 위상 현미경 (Hilbert Phase Microscopy, HPM)

FPM은 전 영역에 대한 위상을 정밀하게 측정할 수 있는 장점이 있었지만, temporal modulation 방식이 가지는 근본적인 제약으로 인해 고속 위상 측정이 어려웠다. 이 문제를 해결하기 위해 spatial modulation 방식을 사용하는 HPM이 개발 되었다 [8]. HPM은 결맞은 광원(coherent light source)에서 나오는 빛을 두 갈래로 가른 뒤, 한 빔은 시편을 투과하고, 다른 한 빔은 시편을 투과하지 않게 설계된다. 이 두 빔이 측정면에서 작은 각도차이를 가지고 간섭하면 (그림4A), 공간적인 간섭무늬가 발생하고, 측정된 공간적인 간섭무늬를 위 2장에서 설명한 방식으로 분석함으로써, 시편의 광학장 정보를 추출해 낼 수 있다.

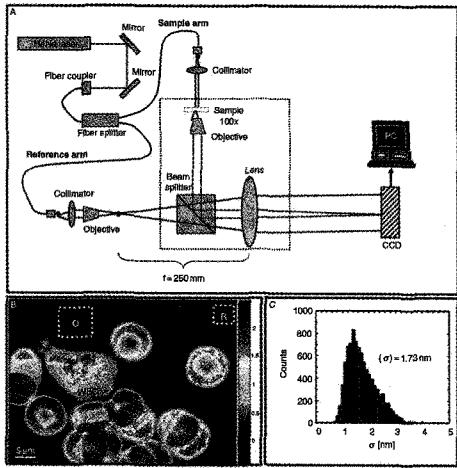
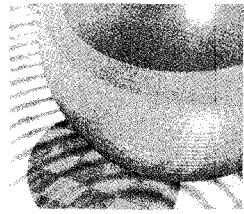


그림 4. 참고문헌 [8]에 소개된 Hilbert 위상 현미경(HPM)의 원리와 측정된 이미지. (A) HPM의 장비 도식도. (B) HPM으로 측정된 혈색 내 적혈구와 백혈구의 위상 이미지. (C) (B) 이미지의 기준점(O)에서 측정된 위상값의 시간적 변화의 표준 편차 값.

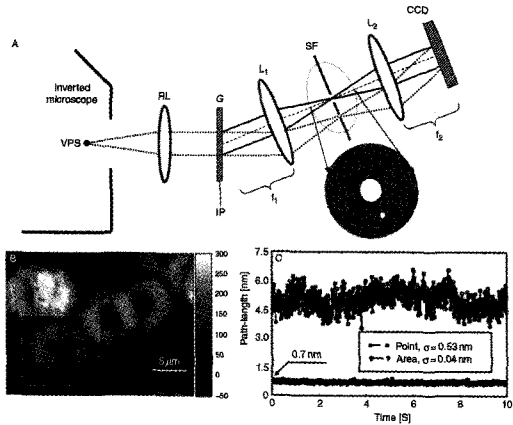


그림 5. 참고문헌 [9]에 나타나 있는 DPM의 도식도와 측정된 위상 영상. (A) DPM의 도식도. RL, relay lens, G, grating, L1-2, Lens, SF, spatial filter, IP, image plane, VPS, virtual point source. (B) DPM을 통해 측정된 적혈구 위상 이미지. (C) 세포가 없는 영역에서 측정된 위상값의 시간 변화.

HPM은 장점은 한 장의 간섭 이미지를 통해서 광학장 정보를 추출할 수 있다는 점이다. 이로 인해, HPM 기술의 측정 속도 한계는 카메라 속도에만 의해서 결정되기 때문현상을 연구하기에 유리하다. HPM에서는 시편을 지나는 빔과 기준 빔이 서로 다른 공간을 지나게 되기 때문에 위상 잡음에 취약하다는 단점이 있다. 따라서 common-path 형태를 취하는 FPM에 비해 Signal-to-Noise Ratio(SNR)이 떨어지게 된다.

### (3) 회절 위상 현미경 (Diffraction Phase Microscopy, DPM)

FPM과 HPM의 장점만을 취하기 위해 개발된 기술이 DPM이다 [9-10]. DPM은 기본적으로 sample 빔과 기준 빔이 거의 같은 광학 경로를 지나기 때문에 위상 잡음 정도가 매우 작고, spatial modulation 방식으로 간섭계를 측정하고 분석하기 때문에, 고속 위상 이미지 측정에 유리하다. DPM의 개념도와 DPM을 통해 측정된 위상 이미지는 그림 5에 나타나 있다.

도립 현미경(inverted microscopy)의 output port를 통해 나오는 영상면에 grating을 위치시키면 회절로 인해 다양한 각도로 진행하는 빔이 발생된다. 회절을 통해 나오는 빔들은 모두 같은 시편 정보를 갖게 된다. 간섭계를 구성하기 위해 이 회절 빔들 중에서 두 빔을 선택한다. 하지만 두 빔이 모두 같은 정보(시편 정보)를 가지고 있기 때문에, 간섭을 시키면 아무런 정보도 얻을 수 없다. DPM에서는 두 빔 중 하나를 평면파로 바꾸어 주고, 나머지 하나와 공간적으로 간섭시킴으로써 광학장 정보를 추출하는 원리를 사용한다. 회절된 두 빔 중 하나를 평면파로 바꾸기 위해서 그림5A에 나타난 것 과 같이 두 개의 렌즈를 사용한 4-f telescopic 영상 계(imaging system)을 만든 다음, 푸리에 면에 필터를 적절히 삽입하여, 회절 빔 중 하나를 매우 작은 구멍을 통과하게 설계한다. 이 때, 작은 구멍은 광학적으로 공간주파수를 필터 하는 역할을 하기 때문에, 시편에서 산란된 높은 공간 주파수 성분들은 모두 막히고, 시편의 정보를 갖고 있지 않은 산란되지 않은 빔만 통과하게 되고, 두 번째 렌즈를 지나게 되면서 평면파로 변환된다.

### (4) 기타 2차원 위상 현미경

위에서 간단히 소개된 FPM, HPM, DPM 이외에도 2차원 위상 영상을 측정하기 위한 다양한 기술들이 최근 10년 동안 여러 연구 그룹들에 의해서 개발되어 왔다. (1) 결맞음이 낮은 (low coherent) 빛을 사용하여 간섭을 일으킴으로써, 시편의 다른 두께에서 오는 위상 정보를 측정하는 low coherent light interferometry 또는 optical coherent microscopy기술 [11-12], (2) 다른 초점면에서 측정된 빛의 세기 영상을 분석하여 광학장 정보를 추출하는 transport of light intensity에 기반을 둔 quantitative phase microscopy [13-15], 그리고 (3) 빛의 간섭을 사용하는 점에서 위해서 소개된 기술들과 근본적으로 같지만 defocus된 면에서 시편의 홀로그래프

을 측정된 뒤 이를 수치적으로 전파시켜서 시편면 (sample plane)에서의 위상 영상을 추출하는 digital holographic microscopy [16-19]가 대표적이다.

## 2) 3차원 위상 현미경

### (1) 단층 위상 현미경 (Tomographic Phase Microscopy, TPM)

위에서 소개된 2차원 위상 현미경들 사용해 측정하는 위상 정보들은 시편의 각 위치가 가지고 있는 3차원 굴절률들의 2차원 projection으로 생각할 수 있다<sup>2)</sup>. 시편의 3차원 굴절률 정보를 측정하기 위해서는 시편에 입사하는 각도를 바꾸어 주면서, 2차원 projection된 위상 영상을 측정하고, 이 2차원 위상 정보들을 후처리 계산 과정을 통해 3차원 굴절률을 복원 하는 방법이 사용 된다 [20]. 앞에서 소개된 2차원 위상 현미경을 실시간 X-ray 영상에 비유하자면, 3차원 위상 현미경 기술은 X-ray CT(Computed Tomography)에 대응된다. 3차원 위상 현미경 기술 중에 대표적인 것으로 TPM이 있다 (그림6) [20].

TPM에서는 레이저 광원을 두 갈래로 나눈 뒤, 한 빔은 시편을 통과하게 되고, 다른 하나는 기준 빔이 되어 두 빔이 CCD camera에서 간섭하게 된다. 이때 시편을 통과하는 평면파는 다양한 입사 각도를 가지고 시편을 통과하게 되는데, 이것은 시편면과 conjugate되어 있는 다른 면에 고속 회전 가능한 거울을 돔으로써 가능하게 된다. 그리고 기준 빔은 두 개의 AOM (Acousto-optic modulator)를 통과하면서 시간에 따라 다른 위상차를 가지게 되는데, 이를 통해 고속의 temporal modulation

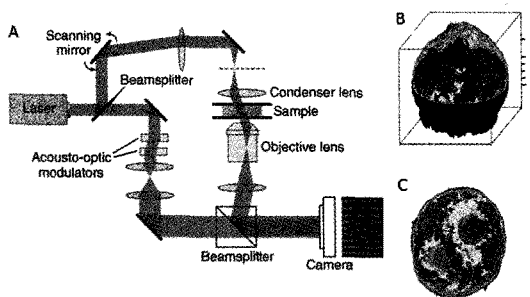


그림 6. 참고문헌 [20]에서 소개된 TPM. (A) TPM 장비 도식도. (B) TPM으로 측정된 HT28 세포의 3차원 굴절률 tomogram, 색상은 굴절률 값을 바탕으로 구성된 pseudo-color. (C) (B) tomogram의 x-y 평면의 굴절률 값 이미지

된 위상을 측정할 수 있다 [21].

## 4. 응용 분야

정량 위상 현미경은 label-free, 정량적 이미지 기법이라는 장점을 가지고 있고, 여러 생물학 의학 분야 연구에 적용이 되고 있고, 그 응용 범위를 늘려 가고 있다. 정량 위상 현미경은 생체분자의 굴절률을 명암비로 사용하기 때문에, 발광 단백질이나 양자점(quantum dot)과 같은 외부 레이블을 사용하지 않고 생물학 시편을 영상화할 수 있다. 세포가 가지고 있는 고유한 광학적 성질인 굴절률을 비침습 비접촉 방식으로 측정함으로써, 세포의 형상 뿐만 아니라 세포의 생리학 병리학적 상태를 유추할 수 있다. 또한 굴절률 정보를 수 mrad 단위로 매우 정밀하게 정량적으로 측정 가능하기 때문에, 이러한 정보들을 정량적으로 측정 가능하다. 이 장에서는 정량 위상 현미경이 응용되고 있는 생물학, 의학 분야에 대해서 소개하고자 한다.

### (1) 세포 질량의 광학적 측정

생물학적 세포의 미세한 질량을 정밀하게 측정할 수 있는 문제는 세포생물학, 발달생물학 분야에서 중요한 이슈로 여겨져 왔다. 일반적인 진핵 세포는 수백 pg 정도의 질량을 가지고 있는데, 정상시에는 그 질량을 일정하게 유지하고 있지만 세포 분열과 같은 생물학적 현상이 일어나는 동안에는 매우 복잡한 조절 과정을 통해 그 질량이 조절된다고 알려져 있다. 액상에서 매우 작은 크기의 단일 세포의 질량을 측정하기는 쉽지 않는데, cantilever의 공진 주파수가 변하는 성질을 이용한 기계진동센서가 최근 소개 되었다.

참고문헌 [23]에서는 정량 위상 현미경을 사용하여 단일 세포의 질량을 비침습 방법으로 측정하는 방법을 발표하였다. 세포내 굴절률은 바이오 분자(단백질, 핵산, 탄수화물, 지질)들의 농도가 증가할수록 선형적으로 증가한다. 세포내 굴절률을 세포 부피에 대해서 적분한 값

<sup>2)</sup> 엄밀히 기술하자면, 시편에서 발생하는 굴절, 회절, 산란 등에 의해서 단순한 projection으로 기술 할 수 없다. 하지만 굴절률 차이가 작고, 두께가 얇은 시편에 대해서는 projection으로 기술 가능하다.

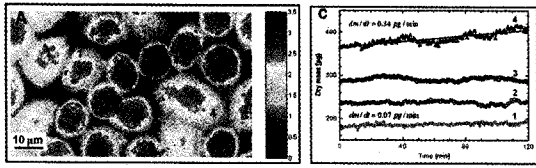
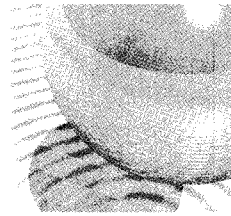


그림 7. 참고문헌 [23]에서 소개된 정량 위상 현미경을 사용해 측정된 세포의 질량. (A) 정량 위상 현미경을 사용하여 측정된 HeLa 세포들 위상 이미지. (B) (A)에 표시된 1-4 세포들의 시간에 따른 질량 변화. 세포 1-3은 2시간동안 큰 질량 변화가 없었지만, 세포분열 중인 세포 4는 질량이 시간에 따라 빠르게 증가한다.

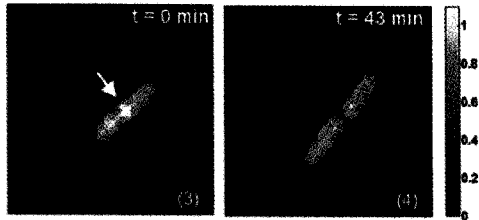


그림 8. 정량 위상 현미경으로 측정된 효모의 분열 과정. 참고문헌 [25]

을 세포의 dry mass라고 하고, 이 값은 세포 질량과 연관시킬 수 있게 된다 [24].

정량 위상 현미경을 사용하여 효모와 같이 단순한 미생물에 대해서, 세포 분열 주기에 따른 세포 질량을 연구하는 내용이 최근 발표되었다 [25].

단순 굴절률만 측정하는 경우에는 세포내에 있는 다양한 종류의 단백질의 질량을 구분할 수 없다. 하지만, 각각의 단백질들이 가지고 있는 고유한 dispersion을 효과적으로 이용하면, 정량 위상 현미경을 통해 세포 내 특정 단백질의 질량을 측정할 수도 있다 [26-27]. 세 가지 다른 파장에서 측정된 위상 정보를 분석하면 적혈구 내부 헤모글로빈(Hemoglobin, Hb) 단백질의 질량을 정밀하게 측정 가능하다 [26].

## (2) 적혈구 관찰 및 분석

정량 위상 현미경이 효과적으로 사용되고 있는 분야 중에 적혈구 세포물리학 연구 분야가 있다. 적혈구는 사람의 혈관계를 따라 순환하면서, 폐에서 받은 산소를 조직으로 전달하는 중요한 역할을 한다. 다른 진핵세포(eukaryotic cell)과는 다르게 지질세포막 내부에 핵이나 미토콘드리아 등 구조체를 가지고 있지 않고, 단순히 Hb 단백질 수용액이 세포 내부를 차지하고 있다. 이 세포 내 Hb 용액은 매우 균일하게 분포되어 있기 때문에 적혈구 내부를 균일한 굴절률을 가지는 물질로 볼 수 있다. 따라

서, 정량 위상 현미경으로 측정된 위상차 정보를 통해 바로 세포의 두께 정보를 측정할 수 있게 된다 [28-29].

적혈구는 매우 부드럽고 탄성이 좋은 세포이다. 적혈구는 크기가 8-9  $\mu\text{m}$  직경, 2-3  $\mu\text{m}$  두께를 가지는 도넛 형태의 세포인데, 인체 혈관계를 순환하면서 적혈구의 크기보다 작은 3-4  $\mu\text{m}$  직경의 모세혈관을 쉽게 통과한다. 이런 놀라운 적혈구의 탄성을 연구하기 위해서 여러 가지 생물물리학적 실험 방법들이 사용되어 왔다 [30]. 이들 중에는, (1) 매우 작은 유리관을 통해 적혈구를 일정한 압력으로 빨아들이고 적혈구의 변형을 관찰하는 micropipette aspiration 방법, (2) 적혈구 양쪽에 플라스틱 구슬을 부착시키고, 이 구슬들을 광학 집계를 사용하여 움직임으로써 변형을 가하는 방식으로 물성치를 측정하는 방법, (3) 자성이 큰 구슬을 적혈구 표면에 부착시키고 자기장을 걸어서 변형을 유도하는 magnetic tweezer cytometry 방법, 그리고 (4) 적혈구를 슬라이드 유리에 붙이고 일정한 유속을 가진 유체를 흘려주면서 적혈구를 변형 시키는 shear flow method 등이 널리 사용되어 왔다. 기존 방법들은 모두 외부에서 큰 힘을 가하고 이에 따른 적혈구의 변형을 측정하게 되는데, 외부 힘 또는 물체의 접촉에 의한 효과와 큰 외부 힘으로 인해 물성치의 선형 구간을 측정하기 어렵다는 단점을 가지고 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 정량 위상 현미경이 적혈구 연구 분야에 응용되고 있다. 정량

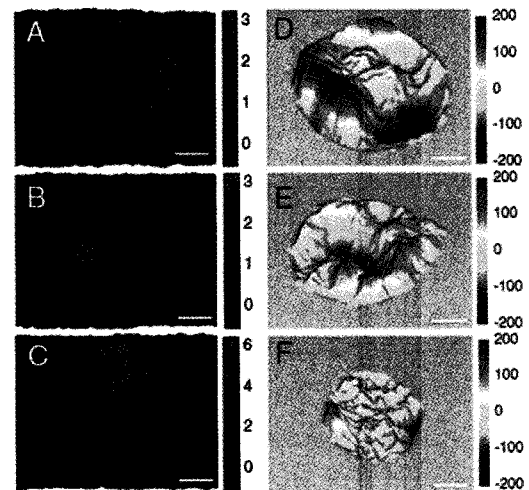


그림 9. 참고문헌 [31]에 소개된 정량 위상 현미경을 사용하여 적혈구의 형태에 따른 형상과 표면진동 측정 연구. (A-C) 각각 discocyte, echinocyte, spherocyte (E-F) (A-C) 적혈구에 대한 순간 진동 진폭. 왼쪽 색막대 단위는  $\mu\text{m}$ , 오른쪽 단위는 nm. 스케일 막대 크기는 1.5  $\mu\text{m}$

## 위상 현미경을 이용한 생물 및 의학적 응용

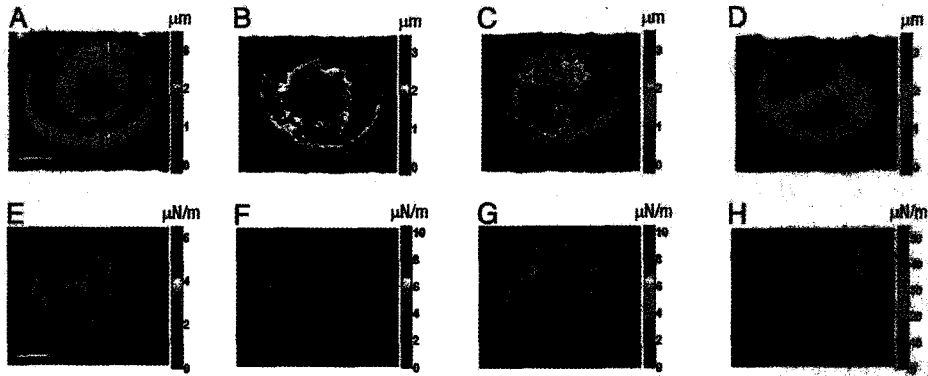


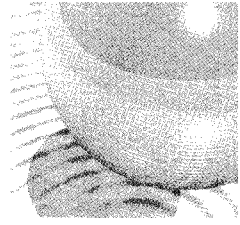
그림 10. 참고문헌 [32]에서 보고된 정량 위상 현미경으로 측정된 말라리아에 감염된 적혈구의 두께 이미지와 세포표면의 단단한 정도 (stiffness). (A-D) 각각 말라리아 감염 전, 감염 초기, 중기, 말기의 적혈구 형상. (E-H) (A-D)에 해당하는 적혈구에 대한 stiffness 이미지. 스케일 막대 1.5  $\mu\text{m}$ .

위상 현미경을 사용하면 적혈구의 전체적인 형상뿐만 아니라 적혈구 표면의 미세한 진동을 정량적으로 정밀하게 측정할 수 있다. 적혈구의 표면은 매우 부드럽고 탄성이 크기 때문에 주변의 열에너지에 의해서 수십 nm의 미세한 세포막 진동을 보이는데, 이 세포막 진동을 정밀하게 측정하고 분석하면 적혈구의 물성치 분석이 가능하다 [31]. 이런 방법을 사용하여 적혈구의 모양에 따라 적혈구의 물성치가 어떻게 달라지는지에 정량 위상 현미경을 통해 밝혀낸 연구 결과가 발표 되었다.

적혈구와 관련된 질병 중에서 말라리아는 특히 감염된 적혈구 모세포의 물성치를 급격하게 바꾸는 것으로 알려져 있다. 최근에는 정량 위상 현미경을 사용하여 말라리아에 감염된 적혈구를 48시간 감염 주기에 따라 측정된 결과가 발표되었다 [32]. 감염된 적혈구의 표면 진동을 각 감염 주기에 따라 정밀하게 측정하고, 이 정보를 바탕으로 적혈구 표면 물성치의 변화를 비접촉, 비침습 방식으로 관찰 하였다. 또한 정량 위상 현미경을 사용하여 적혈구 표면 진동을 일으키는 원인이 열에너지뿐만 아니라 ATP에 의한 생물학적 에너지도 포함되어 있다는 사실이 발표되기도 하였다 [33].

## 5. 결론

위상 현미경이 1950년대에 개발되면서 생물학과 의학 분야의 발전에 지대한 기여를 하였다. 지금도 위상 현미경은 세포생물학 실험실이나 병원 연구실에 꼭 필요한 장비 중에 하나로 여겨지고 있다. 그 후 50년 지난 2000년대에 들어서야 정량적으로 위상 현미경을 사용하는 기술들이 속속 발표되고 있고, 그 응용 분야를 넓혀 가고 있다. 아직은 정량 위상 현미경 분야가 기술적으로도 진보가 이루어져야 하고, 더 많은 분야로 응용 범위를 넓혀 가야 한다. 현재 위상 현미경이 가지고 있는 기술적 한계-장비의 복잡성, 특정 생체 분자를 선택적으로 측정할 수 없는 점, 낮은 해상도 문제-들은 앞으로 해결되어야 할 과제로 남아 있다. 하지만, 이러한 문제들이 해결되고, 정량 위상 현미경이 가지고 있는 장점들-정량적 특성, 외부 염색 분자 등을 사용하지 않는 label-free 이미징-을 효과적으로 이용할 수 있는 적절한 분야에 응용된다면, 새로운 생물학적 의학적 현상 발견에 공헌하고 인류 복지 향상에 기여할 것이다.



## 참고문헌

- [1] Robert Hooke, "Micrographia" (1665).  
 [2] F. Zernike, Physica 9, 686 (1942).  
 [3] M. Takeda, H. Ina, and S. Kobayashi, SPIE MILESTONE SERIES MS 110, 320 (1995).  
 [4] G. Popescu, in Methods in cell biology, edited by B. Jena (Elsevier, 2008), pp. 87.  
 [5] Y. K. Park, C. A. Best, and G. Popescu, in Mechanobiology of Cell-cell and Cell-matrix Interactions (Springer, 2011), p. 279.  
 [6] W. Choi, C. Gang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari, and M. S. Feld, Nat. Methods 4, 717 (2007).  
 [7] G. Popescu et al., Opt. Lett. 29, 2503 (2004).  
 [8] T. Ikeda et al., Opt. Lett. 30, 1165 (2005).  
 [9] G. Popescu et al., Opt. Lett. 31, 775 (2006).  
 [10] Y. K. Park et al., Opt. Express 14, 8263 (2006).  
 [11] C. Joo et al., Opt. Lett. 30, 2131 (2005).  
 [12] Z. Yaqoob et al., Optics Express 17, 10681 (2009).  
 [13] A. Barty et al., Optics Letters 23, 817 (1998).  
 [14] E. Barone-Nugent, A. Barty, and K. Nugent, Journal of Microscopy 206, 194 (2002).  
 [15] C. G. Rylander et al., Opt. Lett. 29, 1509 (2004).  
 [16] P. Marquet et al., Opt. Lett. 30, 468 (2005).  
 [17] B. Kemper, and G. von Bally, Applied optics 47, 52 (2008).  
 [18] C. Mann et al., Optics Express 13, 8693 (2005).  
 [19] F. Charriere et al., Optics Letters 31, 178 (2006).  
 [20] W. Choi et al., Nat Methods 4, 717 (2007).  
 [21] C. Fang-Yen et al., Opt. Lett. 32, 1572 (2007).  
 [22] J. Arlett, E. Myers, and M. Roukes, Nature Nanotechnology (2011).  
 [23] G. Popescu et al., Am. J. Physiol.: Cell Physiol. 295, C538 (2008).  
 [24] R. Barer, Nature 172, 1097 (1953).  
 [25] B. Rappaz et al., Journal of Biomedical Optics 14, 034049 (2009).  
 [26] Y. Park et al., Optics Letters 34, 3668 (2009).  
 [27] D. Fu et al., Biomedical optics express 1, 347 (2010).  
 [28] G. Popescu et al., Journal of Biomedical Optics 11, 040503 (2006).  
 [29] G. Popescu et al., Blood Cells, Molecules, and Diseases 41, 10 (2008).  
 [30] G. Bao, and S. Suresh, Nature Mat. 2, 715 (2003).  
 [31] Y. Park et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 6731 (2010).  
 [32] Y. Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 13730 (2008).  
 [33] Y. K. Park et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 107, 1289 (2010).

### 약 력



#### 김영찬

- 2008년 3월- 현재 한국과학기술원 물리학과, 박사 과정 재학  
 2008년 2월 한국과학기술원 물리학과, 이학 석사  
 2006년 2월 중앙대학교 물리학과, 이학사

### 약 력



#### 박용근

- 2010년 6월-현재 KAIST 물리학과 조교수  
 2010년 6월 Harvard-MIT Healthy Science & Technology, 공학 박사  
 2007년 6월 MIT 기계공학과, 공학석사  
 2004년 8월 서울대학교 기계항공공학부, 공학사