

# 공초점 현미경에서 초점 가변 렌즈를 통한 샘플 움직임 보정

장민석<sup>1</sup>, 송준우<sup>2</sup>, 김진원<sup>2</sup>, 유흥기<sup>1\*</sup>

한국과학기술원 기계공학과<sup>1</sup>, 고려대학교 구로병원 심혈관센터 멀티모달 이미징-테라노스틱 연구실<sup>2</sup>

## Motion compensation using focus tunable lens in confocal microscopy

Minseok Jang<sup>1</sup>, Joon Woo Song<sup>2</sup>, Jin Won Kim<sup>2</sup>, Hongki Yoo<sup>1\*</sup>

Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Korea<sup>1</sup>  
Multimodal Imaging and Theranostic Lab, Cardiovascular Center, Korea University Guro Hospital, Korea<sup>2</sup>  
\*h.yoo@kaist.ac.kr

### Abstract

Intravital fluorescence microscopy provides real-time, high-resolution images in vivo, but motion artifacts from heartbeat and respiration limit its wide range of applications. Here, we developed a system and motion reconstruction algorithm that can probe and compensate for sample motion using a focus tunable lens. As a result, the focal plane that follows the predicted motion of the sample can remain on the surface of the sample, generating in-focus movies. This method can minimize motion artifacts induced by heartbeat and breathing of small animals under experiment without the necessity of an invasive stabilizer or additional equipment. Therefore, the proposed method, which can be easily implemented in other microscopy systems, contributes to further understanding of cell biological findings in moving organs.

### 1. 연구 배경

생체 내 형광성 현미경(intravital fluorescent microscopy)은 살아 있는 생물의 조직 및 장기를 세포 수준의 해상도로 얻을 수 있다는 이점이 있어 지난 수십 년간 세포 생물학 분야 발전에 지대한 기여를 하였다. 생체 내에서 일어나는 세포 분열이 체외(in vitro) 조건보다 더 적은 빈도수로 일어난다는 것을 처음으로 발견할 수 있었으며, T 임파구에 의해 세포자멸사(apoptosis)가 진행되는 암세포 영상 또한 얻을 수 있었다. 이외에 생체 내 형광성 현미경은 백혈구에 의한 면역 반응을 관찰하기 위해 채장, 재관류된 심장(reperfused heart), 죽상동맥경화증이 발현된 경동맥 등에서 세포 수준의 이미지를 얻어 세포 추적(cell tracking)을 가능하게 해준 바 있다[1].

생체 내 형광성 현미경은 생물 내의 여러 기관과 조직의 세포 수준에서 연구를 돕고 있지만 박동하고 있는 심장이나 경동맥과 같이 움직임이 있는 부위에 대한 영상을 얻고자 할 때는 사용이 크게 제한을 받는다. 특히 고배율 영상일수록 움직임에 의한 이미지 저하는 더욱 불가피하다. 이러한 이유로 심장이나 동맥에서는 다른 조직에 비해 세포 생물학적 이해에 대한 한계가 존재한다. 최근, 이를 해결하기 위해 효과적으로 조직의 움직임을 억제하거나 보상해주는 다양한 접근 방식이 제안되고 있다. 조직의 일부를 흡입 장치를 사용해 심박이나 호흡의 영향을 받지 않도록 하는 방법, 조직 위에 3-D 접촉 센서를 올려 두어 움직임을 실시간으로 측정하면서 움직임이 발생한 즉시 대물렌즈를 움직여주는 방법도 있었다[2]. 그러나 위의 방법은 조직에 침습적으로 접근한다는 단점이 존재하여 ECG (Electrocardiogram) 트리거링 기술을 생체 내 형광성 현미경에 적용하여 이미지 처리만으로 심박에 의한 움직임을 성공적으로 보상해주는 연구가 진행되었다. 이 기술은 현재 더욱 발전하여 심박 조율기(cardiac pacemaker) 신호와 이미지 획득 간의 주기를 맞춰주어 심박의 모든 주기에서 박동하고 있는 심장근육세포 영상을 얻을 수 있다는 것을 확인하여 ECG 트리거링 기술의 효용성을 입증하였다[3]. ECG 트리거링 기술은 움직임에 의한 이미지 저하를 효과적으로 보상해주는 강력한 기술이지만 획득한

모든 이미지를 활용하지 않는다는 단점과 심박 조율기 없이는 박동하고 있는 심장의 모든 주기에서 이미지를 얻을 수 없다는 제약이 존재한다.

따라서 본 논문에서는 공초점 현미경에서 샘플에 직접 접촉하지 않으면서 샘플의 움직임을 측정하고, 샘플의 움직임에 맞춰 초점 평면을 옮겨주어 샘플이 움직이고 있는 동안에도 고해상도 이미지를 획득할 수 있도록 하는 기술을 개발하였다. 초점 가변 렌즈와 샘플 움직임 복원 알고리즘을 활용하였고, 샘플 움직임이 효과적으로 보상될 수 있음을 확인하였다.

### 2. 연구 방법

그림 1. 은 초점 가변렌즈를 포함하여 개발된 공초점 현미경의 개념도를 보여주고 있다. 488 nm 파장대의 빛을 사용하였고, 샘플에서의 파워를 5 mW로 설정하였다. 기존 시스템의 광학계를 유지한 채로 초점 가변 렌즈를 대물렌즈 앞에 추가하여, 초점 가변 렌즈의 빠른 반응속도를 이용하여 빠른 속도로 초점 평면을 변화시켜줄 수 있다(그림 1).

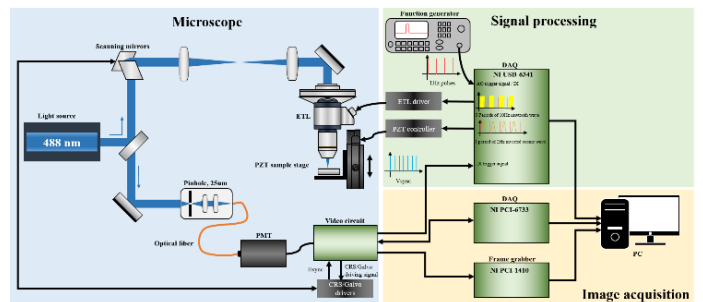


그림 1. 움직임 보정 공초점 현미경 모식도.

축방향 움직임 보정에서 샘플은 거울을 사용하였고, 축방향으로 2 Hz의 뒤집힌 코사인파 형태로 매초마다 1 주기씩 입력하여 움직여주었다. 거울을 사용하면 샘플로부터 많은 빛을 받을 수 있어 움직임이 보상된 이미지를 효과적으로 보여줄 수 있다는 점을 활용하고자 하였다. 본 연구의 목적은 위와 같이 움직이는 거울의 움직임을 초점

가변 렌즈를 통해 측정하고, 거울의 표면에 초점을 유지하는 것이다. 따라서 해당 움직임을 측정하기 위해 초점 가변 렌즈를 톱니파 형태로 10 Hz로 구동하였으며, 이때 이미지는 1-D 스캐닝을 하여(그림 2b) 거울과 초점 가변 렌즈의 초점이 맞는 시점을 이미지에 시간축 방향으로 표시하였다. 또한 추후에 생체 내 이미징에서 활용하기 위해 ECG R 파를 모사하는 1 Hz 펄스를 거울의 코사인파와 초점 가변 렌즈의 톱니파 입력의 트리거링 신호로 사용하였다.

획득한 이미지는 샘플 움직임 복원 알고리즘으로 분석하여 샘플의 축방향 움직임에 대한 파형을 알아내도록 하였다. 이를 통해 계산해낸 샘플의 파형을 초점 가변 렌즈에 입력하여 샘플의 움직임대로 현미경의 초점 평면이 함께 움직여주도록 하였다. 또한, 샘플 움직임 복원 알고리즘에 횡방향 움직임 보정 기능도 구현하였다. 기준 이미지와 횡방향 움직임이 존재하는 이미지간에 상호 상관계수를 계산해주어 횡방향 이미지 저하를 해결하였다. 횡방향 움직임 보정에서는 Balb/c apolipoprotein E-deficient 쥐의 장골동맥을 FITC로 염색한 후, 생체 내 형광성 현미경을 사용하여 획득한 이미지를 사용하였다.

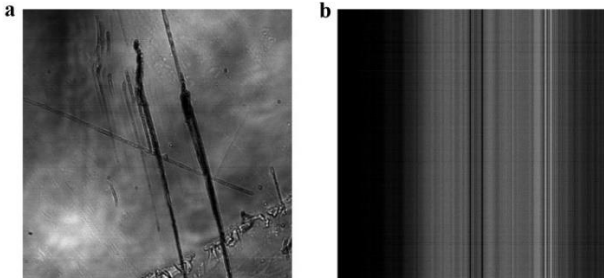


그림 2. (a) 2-D 스캐닝으로 얻은 거울 표면 이미지, (b) CRS 스캐너만 구동하여 1-D 스캐닝으로 얻은 시간 방향 이미지. 1024X1024, FOV 550um, 10배율

### 3. 연구 결과

초점 가변 렌즈로 샘플의 움직임을 보정해주기 전과 후의 이미지를 그림 3. 에 정리하였다. 움직임 보정 처리가 되지 않은 그림 3a. 에서는 모션으로 인해 초점 일부가 맞지 않아 어두운 영역이 존재한다. 반면, 그림 3b. 에서는 공초점 현미경의 초점 평면이 초점 가변 렌즈를 통해 샘플과 함께 움직이기 때문에 샘플이 움직이더라도 초점과 샘플의 표면이 일치하여 고해상도 이미지 획득이 가능하다.

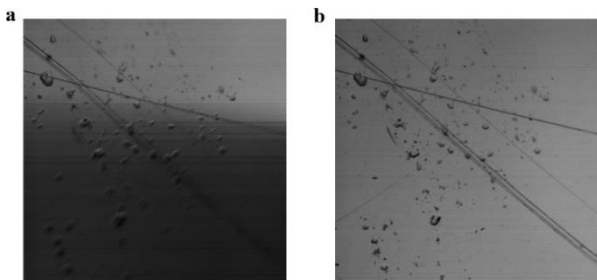


그림 3. (a) 움직임 보정 처리가 되지 않은 거울, (b) 움직임 보정 처리를 한 거울, 1024 X 1024, FOV 550um, 10배율

움직임을 보정하기 전과 후의 이미지 저하를 정량적으로 비교하기 위해, 보정 전과 후 이미지 집합 내에서 연속적인 이미지 간의 상관계수를 계산하였다. 그 결과는 그림 4. 에 정리하였다. 초점 가변 렌즈와 움직임 복원 알고리즘을 통해 움직임을 복원해준 이미지에서는 상관계수가 0.1293의 표준편차를 가지며 분포하고 있다. 반면, 샘플의 움직임을

보정해주지 않고 얻은 이미지 간에는 상관계수의 표준편차가 0.5707이었다. 따라서 초점 가변 렌즈를 사용하면 움직임을 보정해줄 수 있다는 것을 정량적으로 확인하였다.

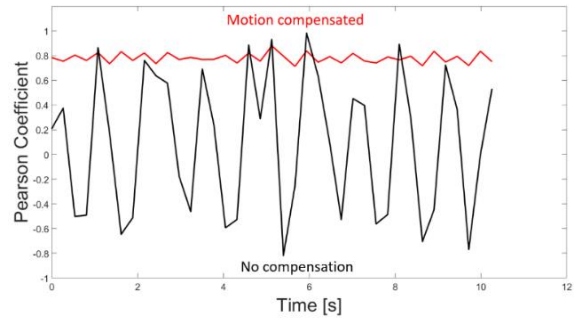


그림 4. 움직임 보정 전후 이미지 집합 내의 상관계수

생체 내 형광성 현미경으로 획득한 장골동맥에서는 호흡에 의해 횡방향 움직임이 존재하여 이를 보정해주었다. 움직임을 보정해주지 않았을 때는 호흡이 있을 때마다 상관계수가 1에서 크게 벗어나지만 횡방향 보정을 해준 이미지는 호흡이 있더라도 이미지 간의 상관계수가 1에 가깝게 유지되어 횡방향 움직임을 보정해줄 수 있다는 것을 확인하였다(그림 5).

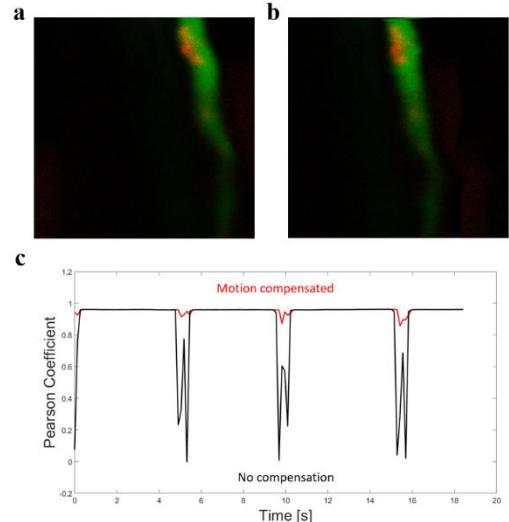


그림 5. (a) 횡방향 움직임이 보정되지 않은 장골동맥, (b) 횡방향 움직임이 보정된 장골동맥, (c) 움직임 보정 전후 이미지 집합 내의 상관계수. 512 X 512, FOV 875um, 10배율

### 4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제 (2020R1A2C300674513 & 2019M3A9E206688021)의 지원으로 진행되었음.

### 5.참고 문헌

- [1] M. J. Pittet, and R. Weissleder, "Intravital Imaging", *Cell*, Vol 147, No. 5, p.983-991, 2011
- [2] S. G. Lee, T. Ozaki, and Y. Nakamura, "In vivo microscope image stabilization through 3-D motion compensation using a contact-type sensor", *IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*, 2008
- [3] A. D. Aguirre, C. Vinegoni, M. Sebas, and R. Weissleder, "Intravital imaging of cardiac function at the single-cell level", *PNAS*, Vol 111, No. 31, p.11257-11262, 2014