

비선형 이미지 콘트라스트 강화를
위한 광 결맞음 현미경 개발

연세대학교 대학원

의 공 학 과

김 창 근

비선형 이미지 콘트라스트 강화를
위한 광 결맞음 현미경 개발

지도 김 범 민 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 월 일

연세대학교 대학원

의 공 학 과

김 창 근

김창근의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 월 일

감사의 글

10년이면 강산이 변하듯 제가 처음 신입생으로 학문에 대한 설렘과 두려움으로 의공학도로 시작하여 학사와 석사를 마치며 학문에 대한 즐거움과 성취감을 배웠습니다. 또한 스스로 어떤 일이든 할 수 있다는 자신감과 열정을 얻었습니다. 이제 새로운 곳에서 그동안 배운것들을 바탕으로 세상의 큰 일꾼이 되고자 합니다. 부족한 제가 학문과 삶의 진리를 배우도록 옆에서 지켜보고 격려해 주신 많은 주위 분들께 감사의 마음을 전합니다.

먼저 부족한 제자를 본 논문이 나오기까지 믿고 지도해 주시고 저의 미래에 관해 많은 관심을 가져주시고 이끌어주신 지도 교수 김법민 교수님께 감사드립니다. 학부 때부터 대학원 마지막 논문까지 지도해주시고 진심어린 조언으로 가르쳐 주신 김동윤 교수님께 감사드립니다. 또한 그동안 많은 지식과 지도 편달해 주신 윤형로 교수님, 이운선 교수님, 이경중 교수님, 윤영로 교수님, 김영호 교수님, 신태민 교수님, 김한성 교수님, 김경환 교수님, 정병조 교수님, 김지현 교수님, 이상우 교수님, 임창환 교수님, 윤대성 교수님, 서종범 교수님, 이용흠 교수님, 권기운 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

의광학을 전공하면서도 광학에 대한 전반적인 이론 지식이 매우 부족했던 저에게 하나하나 자세히 가르쳐 주시고 참된 연구자의 마음가짐과 삶의 성실성을 가르쳐 주신 저의 멘토이셨던 한국표준과학연구원 이은성 박사님과 이재용 박사님께 정말로 감사드립니다.

힘든 연구실 생활에서 항상 웃으면서 따뜻하게 위로해 주셨던 동수형, 연구실 만형으로 묵묵히 자기 일해주면서 많은 조언을 주신 상원이형, 대학원에서 함께하지 못했지만 존경하는 강빈이형과 오정택 박사님, 앞서 졸업하여 학문의 선배·인생의 선배로서 모범을 보여주고 계신 수민이형, 화준이형, 상륜이형, 용희형, 현이형, 속을 알 수 없지만 모든 것을 알고 있는 문식이형, 너무 착해 고통 속에서 살고 있는 성빈이형, 자기만의 정신 속에서 정말 열심히 하는 승덕이형, 정을 많이 때론 너무 터프한 승환이형, 앞으로 대학원뿐 아니라 사회에서 자주 자주 만날 재

영이형과 지영이, 4차원 세계에서 또 다른 공간을 만들어가는 기윤이형, 동기 진호 현우, 앞으로 연구실에 미래를 이끌어갈 후배 달권이와 진우에게 매우 감사드립니다.

태어날 때부터 친구의 운명을 가지고 지금까지 변함없는 우정을 보여준 친구 병렬이, 때론 스승으로 때론 친구로 서로 가족같이 아끼고 힘이 되어주는 승수, 순철이에게도 감사와 영원한 우정을 약속합니다.

힘들고 지쳐 피곤해 있을 때 나의 모든 것을 이해해주고 항상 편안하게 마음의 안식처가 되어준 나의 인생의 동반자, 사랑하는 선혜에게 정말 깊이 감사드립니다.

지금까지 가족이라는 울타리 안에서 제 모든 힘의 원천이며 살아가는 원동력이 되어준 우리 큰형, 큰형수, 매형, 누나, 작은형, 작은형수, 동근이형에게 감사드리며 조카 휴림이, 현도, 대언이, 대이, 형준이에게도 감사드립니다.

마지막으로 누구보다도 저를 이 자리에 있게 해준 부모님께 감사드립니다. 두분의 헤아릴 수 없이 가득한 사랑과 관심, 인내가 없었다면 지금의 저는 결코 있을 수 없었을 것입니다. 그 무엇으로도 다 표현할 수 없는 헌신적인 두분의 믿음과 사랑에 감사드립니다.

2008년 6월

김 창 근 올림

차 례

그림 차례	iii
표 차례	v
국문 요약	vi
제 1장 서론	1
제 2 장 비선형 광학 현미경	4
2.1 비선형 광학 소개	4
2.2 비선형 광학 이론	6
2.2.1 이차 하모닉 발생 (second harmonic generation: SHG)	6
2.2.2 간섭성 반스톡스 라만 산란 (CARS)	10
제 3 장 광결맞음 현미경	13
3.1 광 결맞음 현미경 소개	13
3.2 저 결맞음 광원을 사용한 간섭계	14
3.2.1 간섭(Interference)과 종축 해상도(Axial resolution)	15
3.2.2 Doppler shift modulation	18
3.2.3 횡방향 해상도 (lateral resolution)	19
제 4 장 비선형 광결맞음 현미경 구성	21
4.1 이차 하모닉 광결맞음 현미경 구성	21
4.1.1 시스템 구성	21
4.1.2 광원 선택	23
4.1.3 Reference delay arm	26
4.1.4 Sample arm	30
4.1.5 신호 검출	33
4.2 CARS 광결맞음 현미경 구성	36

제 5 장 광결맞음 현미경을 이용해 획득한 영상	39
5.1 이차 하모닉 광결맞음 현미경 영상	39
5.1.1 BBO crystal 표면 영상 및 비선형 결정체 덩어리	39
5.1.2 쥐꼬리 근(rat tendon) 영상	41
5.1.3 이차 하모닉 현미경과 광결맞음 현미경 깊이정보 획득 비교	42
5.2 CARS 광결맞음 현미경 영상	44
5.2.1 영상 구현 프로그램 및 시스템 테스트	44
5.2.2 Pure Epi-CARS 간섭 영상	45
제 6 장 결 론	47
참고 문헌	49
영문 요약	52

그 립 차 례

그림 1. 1 Laser에 의한 초점 형상	2
그림 2. 1 빛과 상호작용하는 시료에서 발생하는 광학신호의 유도 분극식	5
그림 2. 2 이차 하모닉 발생 개략도	7
그림 2. 3 콜라겐 섬유의 단면 구조	8
그림 2. 4 라만 신호 모식도	10
그림 2. 5 Energy level diagram showing CARS process	10
그림 2. 6 CARS 광신호 생성의 원리를 나타내는 모식도.	11
그림 3. 1 OCT와 OCM의 샘플 부분	14
그림 3. 2 마이켈슨 간섭계 (Michelson Interferometer)	15
그림 3. 3 에어리어 원판	20
그림 4. 1 광 결맞음 현미경 구조도	21
그림 4. 2 광원 및 이차 하모닉 신호에 대한 스펙트럼	24
그림 4. 3 광원 및 이차 하모닉 신호에 의해 측정된 간섭 신호	25
그림 4. 4 Piezo를 이용한 reference delay arm 설계	26
그림 4. 5 Piezo 전압값에 따른 간섭 신호의 베셀 함수의 제곱값	29
그림 4. 6 sample arm에서의 광선 확장기	31
그림 4. 7 광 결맞음 현미경 시스템 실측 모습	32
그림 4. 8 SH-OCM 시스템의 간섭신호 (1 fringe)	35

그림 4. 9 SH-OCM 시스템의 도플러 중심 주파수	35
그림 4. 10 CARS 광 결맞음 현미경 구조도	36
그림 5. 1 BBO 크리스탈의 현미경 영상(a),(c) 및 광결맞음 현미경 영상(b),(d)	39
그림 5. 2 비선형 결정체 덩어리 현미경 영상(a) 및 광결맞음 현미경 영상(b)	40
그림 5. 3 쥐꼬리(rat tendon) 현미경 영상(a) 및 광결맞음 현미경 영상(b)	41
그림 5. 4 SH microscopy(a)와 SH OCM(b)의 En-face 영상 획득을 통한 깊이 비교	43
그림 5. 5 단면 영상을 통한 SH microscopy(a)와 SH OCM(b)의 깊이 비교	43
그림 5. 6 LabVIEW를 이용한 영상 구성 프로그램 및 CARS 간섭 신호	44
그림 5. 7 polystyrene bead 현미경 영상(a) 및 간섭 영상(b)	45
그림 5. 8 CARS OCM을 통한 이미지 구현 과정	46

표 차 례

표 4.1 Mira 900 (Verdi-V8) 특성표	· · · · ·
표 4.2 Piezo-Electric Actuator 특성표	· · · · ·
표 4.3 PMT 특성표	· · · · ·

국 문 요 약

비선형 이미지 콘트라스트 강화를 위한 광 결맞음 현미경 개발

본 연구는 입사된 광이 생체 조직과 반응하여 시료의 구조 선택적 또는 분자 선택적인 신호를 발생시키는 비선형광학 현상을 이해하고, 이를 광결맞음 단층촬영법의 신호 획득 기술에 결합하여 두 가지의 새로운 비선형 광결맞음 현미경을 설계·제작 하였다.

첫번째, 중심 대칭성이 없는 시료 또는 환경 제약 조건을 만족하는 복굴절 매질, 규칙적 배열 구조 등에서 높은 침투 출력을 가진 레이저에 의해 발생하는 이차 하모닉 신호를 이용해 이차 하모닉 광결맞음 현미경(Second harmonic Optical coherence microscopy: SH OCM)을 구성하였다. 제작된 현미경은 약 $0.53\mu\text{m}$ 의 횡축 해상도를 가지고 있으며, 깊이 방향에 대한 영상 정보를 일반 현미경보다 약 40% 이상 더 획득할 수 있다. 본 시스템을 이용하여 BBO 크리스탈의 표면 영상 및 결정체 모양을 영상화하였고, 마지막으로 생물학적 시료인 쥐 꼬리 근(rat tendon)에 존재하는 콜라겐 섬유에서 발생하는 이차 하모닉 신호를 이용하여 영상화 하였다.

두 번째, 관찰 시료에 대한 확실한 분자 선택성 또는 물리화학적 구조 특성을 제공해 주는 간섭성 반스톡스 라만 산란 신호를 이용하여 광결맞음 현미경(Coherent anti-Stokes Raman Scattering Optical coherent microscopy: CARS OCM)을 구성하였다. 제작된 시스템을 이용하여 시료에서 발생된 간섭성 반스톡스 라만 산란 신호 중 뒤로 나오는 신호를 가지고 영상화 하였다.

핵심되는 말 : 비선형 광학, 이차 하모닉, 간섭성 반스톡스 라만 산란, 광결맞음 현미경, 쥐 꼬리 근(rat tendon)

제 1 장 서 론

우리가 접하는 이론은 보통 선형성에서 출발한다. 선형성이란 어떤 물체에 나타나는 반응이 외부에서 가한 변화에 선형적으로 비례하여 반응함을 뜻한다. 즉, 중첩의 원리 (superposition principle)가 적용됨을 말한다. 그러나 자연계에 존재하는 많은 현상들이 선형성만으로 설명하기에는 부족하며 광학 현상도 예외는 아니다.

비선형 광학 현상은 레이저가 발견된 이후에 새롭게 관찰된 현상으로 1961년 미시건 대학의 Peter A. Franken이 이차 하모닉 (second harmonic generation: SHG)의 발견으로 시작되었다. Franken은 Ruby laser(694.3nm)의 적색 빛을 수정에 입사시켰을 때 원래의 파장(694.3nm)뿐만 아니라 원 파장의 절반인 347.15nm의 빛 또한 관찰 되는 것을 발견하였다. 일반적인 현상은 선형 현상을 따르지만 매질의 원자핵의 쿨롱 포텐셜에 버금가는 전기장이 외부의 빛에 의해 가해질 때 (laser와 같이 고 출력의 광원) 비선형적 현상이 발생하게 된다.[1] 이러한 현상은 기술적 응용 가능성과 흥미 있는 물리적 성질 때문에 최근 들어 많은 관심과 연구 대상이 되어 왔으며 빠르게 성장하고 있는 분야이다. 특히 생물학, 의학 분야에서 현미경 영상획득의 기술적 진보와 함께 비선형 신호의 영상화를 통해 세포의 식균작용의 미세한 관찰, 질병 발생의 원인 규명 등에 활용되고 있다.

비선형 광학 레이저 영상화 기술이란, 생체 세포나 조직을 대상으로 한 현미경적 미세영상을 취득함에 있어 시료에 조사한 빛과 시료 내부물질 간의 비선형 광학적 상호작용으로 발생된 산란광으로부터 이미지 콘트라스트(contrast)를 획득해 시료의 분자 화학적 및 물리 광학적 특성을 비침습적으로 3차원 공간상에 매핑하는 기술이다.

일반 광학현미경은 일반적으로 넓은 범위의 생체 세포 또는 조직을 관찰하는데 유리하며 범용으로 사용되고 있지만, image deconvolution과 같은 특별한 후처리 과정 (post-processing)을 거치지 않고서는 낮은 공간 분해능과 깊이 방향 단면측정 (depth sectioning)의 한계를 벗어날 수 없었다. 하지만, 레이저 공초점 현미경 (laser scanning confocal microscope: LSCM)의 탄생으로 이러한 기술적 문제가

해결되었고, 다양한 형광 염색법과 결합되면서 생체 세포 및 조직에 대한 고해상도 3차원 이미징이 가능해졌다.

생체를 대상으로 하는 바이오 메디칼 이미징에 있어서, 광학적인 접근법에 주목하는 이유는 대상물을 살아있는 상태로 유지할 수 있는 비침습적으로 가능한 3차원 측정, 분자 화학적 정보수집 능력, 높은 감도의 광 신호 검출을 통한 실시간 모니터링 구현을 가능하게 할 잠재적 요소를 갖추고 있기 때문이다.

하지만 현재까지 널리 쓰이는 바이오 현미경으로서 유일한 대안이라 할 수 있는 레이저 공초점 형광 이미징은 혁신적인 장점에도 불구하고 중대한 제한 요소가 존재한다.[2] 첫째, 조영용 형광체의 광 탈색(photobleaching) 발생으로 장시간 이미징이 불가능하다. 둘째, 형광체의 광화학 반응으로부터 유도된 세포 독성(toxicity)이 발생하여 정확한 이미징이 어렵다. 셋째, 형광체 투입 과정에 이용되는 세포 고정법(fixation) 등이 있다. 즉, 형광 이미징이 용이하도록 세포를 고정하는 경우 세포의 생활성이 근본적으로 차단되며, 그렇지 않더라도 투입된 외부 물질인 형광체의 독성이 세포의 자연적인 물질 거동을 심각하게 교란하여 측정결과를 신뢰하기 어려운 경우가 많다. 또한 광 탈색 효과는 형광 관찰 중 신호 세기의 저하를 일으켜 연속적인 세포 관찰 뿐 아니라 3차원 이미지 획득 자체가 불가능하게 한다.

레이저 공초점 형광 현미경의 이러한 단점은 안정화된 pulsed laser light의 발달로 생물학적 시료에 비선형 관계로 신호를 유도해 이미징 함으로써 해결할 수 있었다. 즉, 높은 침투 출력을 지닌 pulsed laser를 시료에 흡수시키면 관찰의 초점이 되는 부위만 비선형적으로 선택적인 신호를 발생시킨다. 이 방법은 낮은 에너지의 광자를 사용할 수 있기에 상대적으로 긴 파장의 빛을 사용할 수 있기 때문에 적은 레일리 산란(Rayleigh scattering) 손실 즉, 두꺼운 생체 조직을 보다 깊은 곳까지 관찰할 수 있도록 만들었다. 또한, 비선형적으로 신호를 발생시키기 때문에 그림 1.1과 같이 초점이 형

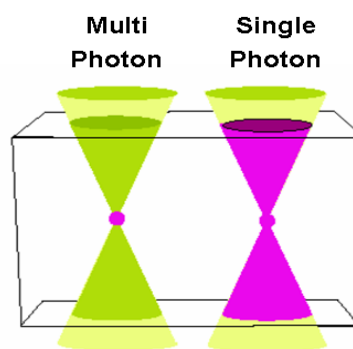


그림 1. 1 Laser에 의한 초점 형상

성된 부위만 선택적으로 관찰되는 공초점 현상이 일어난다. 따라서 초점 이외의 간섭을 피할 수 있어 효율적으로 고해상도 영상 획득뿐 아니라 단층 이미징을 구현할 수 있게 해주었다.[3,4]

하지만, 비선형 광학 레이저 이미징 발달로 인해 높은 횡축 분해능을 가지고 있음에도 불구하고 생체 조직을 *in-vivo* 상태에서 이미징 하기에는 깊이 방향에 대한 스캐닝 범위가 매우 한정적이다.

따라서 본 연구에서는 여러 가지 광학적 이미징 방법 중 파괴나 절개없이 가장 깊이까지 이미징 할 수 있는 광결맞음 단층 촬영 기술(Optical Coherence Tomography: OCT)과 비선형 광학 이미징 방법을 결합하여 시료의 구조 또는 분자 선택적 신호를 높은 공간 분해능을 가지고 일반 비선형 광학 이미징 보다 더 깊은 영역에서 정보를 얻고자 한다. 이를 위해 새로운 이미징 기술인 이차 하모닉 광결맞음 현미경(Second Harmonic Optical Coherence Microscopy, SH OCM)과 간섭성 반스톡스 라만 산란 광결맞음 현미경(Coherent anti-Stokes Raman Scattering Optical Coherence Microscopy, CARS OCM)을 설계·제작 하였다.

제 2 장 비선형 광학 현미경

이번 장에서는 비선형 광학 현미경의 원리와 종류에 대해서 알아보고 일반 광학 현미경에 비하여 특징적인 비선형 광학 현미경의 장점에 대해 조사해 보았다.

2.1 비선형 광학 소개

일반적으로 비선형 광학(nonlinear optics) 분야는 전기장과 자기장의 1차 보다 높은 거듭제곱 항들이 주도적인 역할을 하는 현상들을 포함한다. 굴절률이 인가전압 즉, 전기장의 제곱에 비례하는 커(Kerr) 효과는 잘 알려진 비선형 효과이다. 증착, 반사, 굴절 등과 같은 빛은 전파를 고전적으로 취급할 때, 일반적으로 전자기장과 매질을 구성하는 반응 원자계 사이에 선형적인 관계를 가정한다. 그러나 진동하는 역학 장치가 충분히 큰 힘의 작용으로 무리가 가서 비선형 반응을 보이는 것과 같이, 매우 강한 광속은 상당한 비선형 광학적 효과들을 발생시킬 수 있다는 것을 예측할 수 있다. 보통 또는 전통적인 광원들의 공속과 관련된 전기장은 너무 미약하여 그와 같은 효과를 쉽게 관찰할 수 없다. 이런 이유가 초기의 기술적인 역량 부족과 결부되어, 이 분야는 가시광선 영역에서 충분한 세기를 얻을 수 있는 레이저의 출현을 기다려야 했다. 현재 레이저 기술의 급격한 발달로 인해 더욱 강한 전기장이 사용 가능하기 때문에, 많은 중요하고 새로운 비선형 현상과 장치들이 가능해졌다.

매질을 통해 전파되는 광파의 전자기장은 느슨하게 결합된 바깥쪽 전자 혹은 원자가 전자들에 힘을 가한다. 보통 이 힘들은 아주 약하며, 등방성 선형매질에서는 결과적인 전기 분극이 가해진 전기장과 평행하고 그것에 직접적으로 비례한다. 사실상, 분극은 전기장을 따른다. 만약 전기장이 조화파라면, 분극도 또한 조화파일 것이다. 결과적으로 $P = \epsilon_0 \chi E$ 로 쓸 수 있는데 여기서 χ 는 전기감수율로 알려진 차원이 없는 상수이며, E 대 P 의 그래프는 일직선이다. 대단히 강한 전기장과 같은 극단적인 경우에는 명백하게 P 가 포화될 것을 예상할 수 있다. 달리 말하면, P 는 단순히 E 에 따라 무한정 선형적으로 증가할 수 없다. 그러므로 E 가 증가함

에 따라, 항상 존재하지만 보통 무시할 수 있는 비선형성이 완만하게 증가할 것을 예측할 수 있다.[5]

$$P_i = \chi_{ij}^{(1)} E_j + \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \chi_{ijkl}^{(3)} E_j E_k E_l + \dots$$

$\chi_{ij}^{(1)}$ Refraction Absorption Rayleigh Scattering Raman Scattering ⋮ ⋮	$\chi_{ijk}^{(2)}$ Rectification SHG SFG DFG ⋮ ⋮	$\chi_{ijkl}^{(3)}$ FWM CARS THG Kerr Effect ⋮ ⋮
--	--	--

그림 2. 1 빛과 상호작용하는 시료에서 발생하는 광학신호의 유도 분극식

그림 2.1는 빛과 상호작용하는 시료에서 발생하는 광학신호의 유도 분극식을 나타낸 식으로, 임의의 물질은 고유의 감수율 텐서 (susceptibility tensor) $\chi^{(n)}$ 을 가지며, 조사 레이저 광의 전기장 벡터 E 의 크기, 방향, 주파수, 상호작용 방식 등에 따라서 분극 P 가 유도된다. $\chi^{(1)}$ 을 포함한 첫째항으로 인해 유도된 분극을 선형 분극 P_L 이라고 하며, 빛의 흡수, 굴절, 레일레이 산란 (Rayleigh Scattering), 라만 산란 (Raman scattering) 등과 같은 통상의 선형광학 현상을 일으키는 원인이 된다. 두 개 이상의 전기장 벡터 E 와 상호작용하여 발생하는 유도 분극을 비선형 분극 P_{NL} 이라하며, 비선형 감수율 텐서 $\chi^{(n)}$ ($n \geq 2$)와 전기장 벡터의 구성 방식에 따라 비선형 광학 신호를 발생시킨다.[6]

대표적인 2차 비선형 광학 현상으로는 2차 조화파 발생 (second harmonic generation: SHG), 합주파수 발생 (sum frequency generation: SFG), 차주파수 발생 (difference frequency generation: DFG), 초라만 산란 (hyper-Raman scattering)을 들 수 있다. 3차 비선형 감수율 $\chi^{(3)}$ 을 가진 물질에서는 일반적으로 사광파혼합 (four-wave mixing) 현상이 일어나게 되는데, 다광자 흡수 (multiphoton absorption), 3차 조화파 발생 (third harmonic generation: THG), 간섭성 반스톡스 라만 산란 (coherent anti-Stokes Raman scattering: CARS), 광 커르 효과 (optical Kerr effect: OKE) 등이 포함된다.

2.2 비선형 광학 이론

2.2.1 이차 하모닉 발생 (second harmonic generation: SHG)

2차 조화파 발생 (SHG)은 2개의 입력 광파가 상호작용한다는 점에서는 2광자 여기 형광 (TPEF: two photon excitation fluorescence)과 유사하지만 비선형 광학적 특성에 근본적인 차이점이 존재한다. 분극 유도식을 다시 정리하면 다음과 같다.

$$P = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} EE) \quad (2.1)$$

전기장이 z 방향으로 진행 할 경우 다음의 식으로 표현할 수 있다.

$$E(z, t) = E_0 \cos(\omega t - kz) \quad (2.2)$$

여기서, E_0 은 전기장의 크기이며 ω 는 각 주파수(angular frequency), t 는 시간, k 는 전달 상수(propagation number)이다. 이를 수식 2.1에 대입하여 전개하면 다음과 같다.

$$P = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E_0 \cos(\omega t - kz) + \chi^{(2)} E_0^2 \cos^2(\omega t - kz)) \quad (2.3)$$

이 수식을 다시 삼각함수 관계식 $\cos^2 \theta = \frac{(1 + \cos 2\theta)}{2}$ 을 이용하여 정리 하면 다음과 같다.

$$P = \epsilon_0 \left[\chi^{(1)} E_0 \cos(\omega t - kz) + \frac{1}{2} \chi^{(2)} E_0^2 (1 + \cos(2(\omega t - kz))) \right] \quad (2.4)$$

2차 비선형 현상은 수식 2.4에 나타난다. 이 수식에서 보면 2ω 의 새로운 진동 성분을 볼 수 있고, 2차 항에서 진동성분과 무관한 성분도 있음을 볼 수 있다. 진동 성분과 무관한 이 성분에서 나타나는 현상을 광정류 (optical rectification: 입사 광의 진동수를 상쇄 시킨다.)라고 부른다. 다음의 두 전기장에 대하여 살펴보자.

단, 전기장의 크기는 같다고 가정한다.

$$E_1(z, t) = E_0 \cos(\omega_1 t - kz), \quad E_2(z, t) = E_0 \cos(\omega_2 t - kz) \quad (2.5)$$

위의 두 전기장을 각각 수식 2.3에 대입한 후 그 두 식을 더하면 다음의 수식을 얻을 수 있다.

$$P = \epsilon_0 [X^{(1)} E_0 \cos((\omega_1 + \omega_2)t - kz) + X^{(2)} E_0^2 \cos^2((\omega_1 + \omega_2)t - kz)] \quad (2.6)$$

이 수식을 삼각함수 공식 중 $\cos^2 \theta = \frac{1}{2}(1 + \cos(2\theta))$ 을 이용하여 다시 정리하면 다음의 식과 같다.

$$P = \epsilon_0 [X^{(1)} E_0 \cos((\omega_1 + \omega_2)t - kz) + \frac{1}{2} X^{(2)} E_0^2 (1 + \cos 2(\omega_1 + \omega_2)t - 2kz)] \quad (2.7)$$

위에서 두 전기장이 서로 같은 진동수를 가지면 ($\omega_1 = \omega_2$) $2\omega_1$ 에서 진동수가 발생하고 이것을 SHG(second harmonic generation)이라 부른다.[7,8]

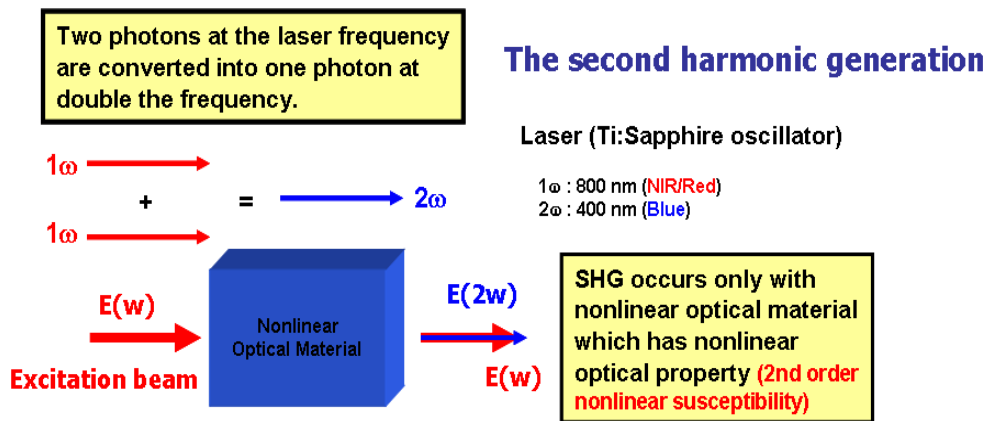


그림 2. 2 이차 하모닉 발생 개략도

SHG 현상은 강한 전기장의 빛 에너지가 매질에 입사될 때 분극 현상에 의해 주파수는 2배 즉, 파장은 반으로 줄어드는 빛에너지로 나타나는 비선형적 현상이다. 그림 2. 2에서 보는 바와 같이 같은 주파수 (또는 진동수)의 전기장은 비선형 현상을 일으킬 수 있는 매질을 지날 때 2w의 주파수를 가진 성분 또한 내보낸다는 것을 알 수 있다.

SHG는 시료의 2차 비선형 감수율 $\chi^{(2)}$ 에 기인한 것인데, 반전 대칭성 (inversion symmetry) 또는 중심 대칭성 (centrosymmetry)이 있는 물질 구조에서는 2차 비선형 감수율 자체가 존재하지 않으므로, 분자나 결정의 비대칭성이나 국소적인 구조상 비대칭성이 유발되는 표면에서 주로 강하게 일어난다. 즉, 중심 대칭성 (centrosymmetry)이 없는 물질 또는 환경 제약 조건을 만족하는 복굴절 (birefringence) 매질, 규칙적 배열 구조 (ordered array), 물질 경계면 (interface)에서 관찰이 가능한 것으로 알려져 있다.[9]

생체 대상물의 경우에는 세포막이나 구조 단백질 배열 등이 해당되는데, 콜라겐 섬유 (collagen fiber) 같은 몇몇 구조 단백질에 대해서는 형광 표지 없이도 강한 SHG 신호가 발생된다. 따라서 형광 표지 사용에 따른 광 탈색이나 독성 문제에서 자유로울 뿐 아니라, 보다 상세한 물질 정보를 밝혀낼 수 있게 된다. 형광 표지법이 분자 수준의 단백질 위치 정보만을 주는 것에 비해, SHG는 마이크로미터 스케일의 분자 집합체 위치와 형태, 대칭성, 배향, 구조적 특성 등을 직접적으로 보여줄 수 있다.

SHG는 TPEF처럼 3차원 단층 이미징을 구현할 수 있는 여기 광 강도의 제곱에 비례하는 비선형광학 현상이지만, TPEF가 공명 흡수와 형광 재방출에 기인한 비간섭성 현상인 것에 비하여, SHG는 비공명 조건에서의 간섭성 산란을 이용하기 때문에 시료의 광 에너지 흡수에 의한 열 발생이 작을 뿐 아니라 간섭성 광신호가 갖는 지향성을 이용하여 신호 수집 효율을 높일 수 있는 장점이 있다.

활용성 면에서는 TPEF가 레이저 공초점 현미경 (LSCM) 기법과 더불어 실험실 범용 현미경 기술로 자리 잡은 반면, SHG 현미경 기술은 비교적 최근에 와서야 생체막 포텐셜 측정용 분자 탐측자를 비롯한 유기·무기 재료 비선형 감수율 가

시화 도구로 이용되고 있다. 고분해능 SHG 이미징을 적용할 수 있는 유력한 구조 단백질 후보로는 콜라겐 (collagen), 액토미오신 (actomyosin) 복합체, 튜블린 (tubulin) 등을 꼽을 수 있다.

콜라겐은 자연 상태에 약 20 여종의 형태가 존재하며 피부, 뼈, 인대, 혈관 조직 등에 집중적으로 분포하여 구조적 강도를 유지하는 대표적인 단백질이다. 노화나 각종 병리학적인 원인에 의해 구조에 손상이 발생하면 비선형 광학 특성이 변화하게 되어,

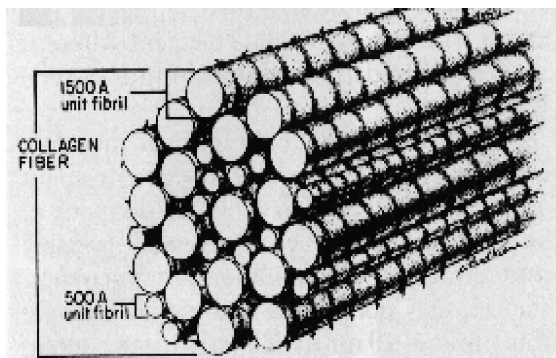


그림 2. 3 콜라겐 섬유 단면 구조

SHG 광 신호의 양상이 다르게 나타난다. 액토미오신은 매끄럽고 (smooth) 줄이 난 (striated) 근육 조직을 구성하며, 튜블린은 세포 분할이나 물질 수송 등 많은 세포 동력학에 관계된 세포 미소관 (microtubule)으로 중합되는 단백질이다. 이들 단백질은 mM 이상의 높은 농도도 생체 조직에 분포하기 때문에, 분자 밀도의 제곱에 발생 강도가 비례하는 SHG의 특성상 측정이 상대적으로 용이한 편이다.[10]

2.2.2 간섭성 반스톡스 라만 산란 (CARS)

라만 산란을 기반으로 한 분광 측정은 비선형 광학 영상 기법의 일반적인 장점에 더해, 관찰 시료에 대한 확실한 분자 선택성 또는 물리 화학적 특성을 제공할 수 있다. 상온의 자연 환경에서 적용이 가능하고, 지금까지 수많은 분자 중 에 대해 광범위한 연구가 이루어졌기 때문에, 정확하고 풍부한 분광자료를 이용할 수 있다는 장점이 있다.

하지만, 종래의 라만 분광법은 생체 시료에 그대로 적용되기 어려운데, 이는 라만 산란 단면적이 너무 작아서 라만 산란 광신호가 매우 미약하고 시료로부터 발생하는 자연 발광 (luminescence)에 의해 가려질 수 있는 심각한 문제가 있기 때문이다.[11]

이에 반하여, 간섭성 반스톡스 라만 산란 (coherent anti-Stokes Raman scattering)은 분자의 진동 분광선 구조에 의해 선택적 영상 능력을 제공할 수 있는 라만산란 기법의 현실적 대안이 될 수 있다. 간섭성 반스톡스 라만 산란은 비선형 광학 현상의 하나로 3개의 입사광 레이저 빔

이 시료 내에서 상호작용하여 하나의 신호광을 형성하는 사광파혼합법 (four wave mixing)이다. 이 과정을 에너지 도표로 표현하면 그림 2.5와 같다. 우선 주파수 차가 시료내 특정 분자의 라만천이 (Raman shift) 만큼 떨어진 두 레이저광

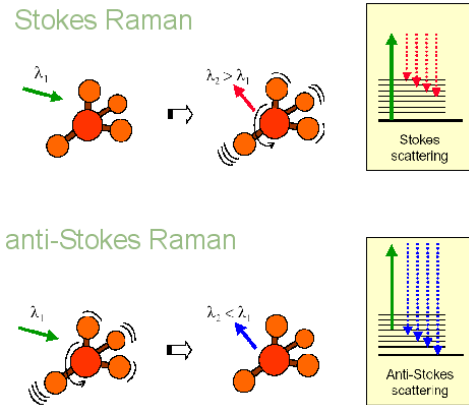


그림 2. 4 라만 신호 모식도

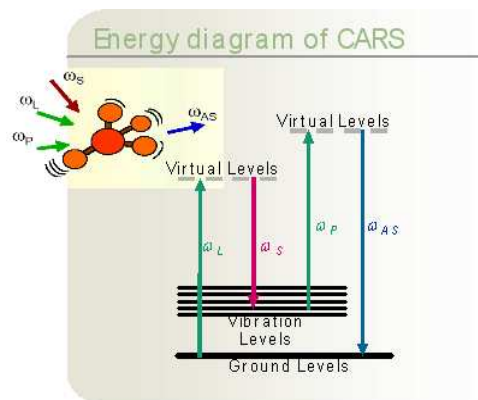


그림 2. 5 Energy level diagram showing CARS process

이 입사하면 그 분자들은 두 레이저광의 맥놀이 파형에 걸맞는 (coherently) 강제진동운동 (forced harmonic oscillation)을 하게 된다. 즉, 그 특정분자들 모두가 위상이 일치하는 진동운동을 하는 것이다. 여기에 세 번째 레이저광이 입사하여 각 분자들에 의해 반스톡스 라만 산란되면 산란광들은 모두 같은 위상을 갖고 특정한 진행방향을 갖는 레이저 같은 빛이 된다. 이러한 빛과 분자의 상호작용을 시료 내 각각의 점에서 일으키고 각 점에서 얻은 신호를 검출하여 래스터 주사 (Raster scan) 방식처럼 맵핑(mapping)하면 시료에 대한 간섭성 반스톡스 라만산란 (CARS) 영상을 얻게 된다.

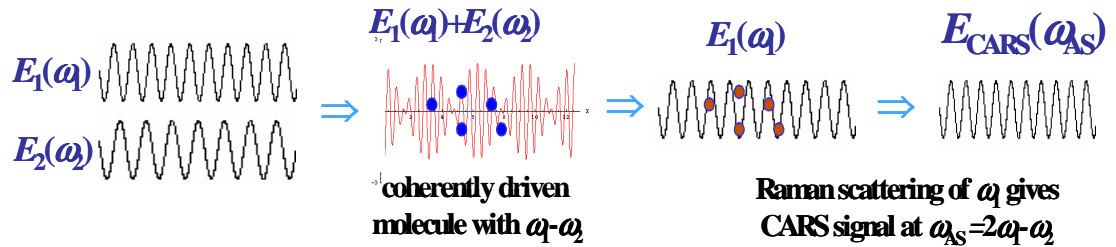


그림 2. 6 CARS 광신호 생성의 원리를 나타내는 모식도.

신호광의 세기를 결정하는 비선형 분극 (nonlinear polarization)은 다음 수식 2.8과 같이 표현되는데, 세 개의 빛, 즉 세 개의 전기장이 동시에 작용하여 형성하는 분극이기 때문에 3차 비선형광학적 분극이라 한다. 여기서 비례 계수인 $\chi_{CARS}^{(3)}$ 를 3차 비선형 감수율이라 부른다. 이 계수는 분자마다 파장 혹은 주파수의 함수로서 특정한 진동 주파수들에서 매우 큰 값을 갖는 공명 특성을 보인다. 간섭성 반스톡스 라만 현미경이 분자 선택적 이미징이 가능한 이유는 바로 분자들마다 이 3차 비선형 감수율이 다르기 때문이다. 비선형 광신호는 이 비선형분극이 진동하는 이중극자 (dipole)로 작용하여 방출하는 빛이므로 그 세기인 I_{CARS} 는 $P_{CARS}^{(3)}$ 의 제곱에 비례하는 값으로 표현된다. 사중극자 (quadrupole)를 포함한 모든 다중극자 (multi-pole) 모드에 의해서도 빛 방출이 가능하지만 이중극자 모드에 비해 너무 약하므로 일반적으로 무시된다.

$$P_{CARS}^{(3)} = \chi_{CARS}^{(3)} E_{pump}^2 E_{Stokes} \quad (2.8)$$

$$\chi_{CARS}^{(3)} = \frac{\epsilon_0 N}{8m[\omega_0^2 - (\omega_{pump} - \omega_{Stokes})^2 + i(\omega_{pump} - \omega_{Stokes})\Gamma]} \left(\frac{\partial a}{\partial q}\right)_0^2 \quad (2.9)$$

일반적인 간섭성 반스톡스 라만 현미경에서는 편의상 두 개의 펌핑광을 같은 주파수의 레이저로 사용하므로 실제 측정을 위해 사용하는 레이저는 둘이다. 이 경우 반스톡스 라만 산란광의 주파수는 앞의 그림에서도 표현되었듯이 $\omega_{AS} = 2\omega_{pump} - \omega_{Stokes}$ 로 나타낼 수 있다. 이는 입사된 광자 에너지 ($2h\omega_{pump} + h\omega_{Stokes}$)와 상호작용 후 방출된 광자 에너지 ($h\omega_{AS} + 2h\omega_{Stokes}$)가 같아 광자의 에너지가 보존됨을 나타내고 있다. 즉, 상호작용이 완료된 후에도 매질에는 어떠한 양의 에너지도 남아 있지 않는 광매개 변환 프로세스이므로 간섭성 반스톡스 라만 산란은 진정한 의미의 비침습적 측정법이라 말할 수 있겠다.[1,6]

형광 표지자 없이 분자 선택적 이미징이 가능한 현미경 기술로서 자발적 라만 산란법 (spontaneous Raman scattering)이 있지만 간섭성 반스톡스 라만산란과 같은 간섭성 프로세스가 아니기 때문에 신호의 세기가 매우 약하다. 간섭성 반스톡스 라만산란의 경우는 입사광 출력의 3 제곱에 비례하는 신호의 세기가 얻어지고 자발적 라만산란의 경우는 선형적으로 비례하므로 입사광 출력이 커질수록 두 라만산란법의 신호세기 차이는 점점 더 커진다. 시료에 손상우 주지 않는 비교적 약한 출력한계 아래에서도 간섭성 반스톡스 라만산란은 자발적 라만산란법에 비해 대략 10,000배 정도의 높은 신호세기와 감지도를 보여준다. 따라서 빠른 이미징을 통해 움직이는 생체세포의 관찰이 가능하다.[12]

제 3 장 광결맞음 현미경

3.1 광 결맞음 현미경 소개

광 결맞음 단층촬영 (Optical coherence tomography: OCT)은 저가간섭의 빛을 사용하여 생체 조직을 비침습적 방법으로 고해상도의 단면 영상을 획득하는 새로운 기술이다. OCT 시스템은 1987년에 개발된 optical coherence domain reflectometry (OCDR)를 확장 응용한 것으로, 1991년 M.I.T의 David Huang에 의해서 처음 개발되었다. OCDR은 마이켈슨 저 간섭계를 이용하여 샘플의 깊이에 따라 역산란 (backscattering)되는 빛의 세기를 일차원적으로 얻는 시스템이다.[13] OCT는 이런 OCDR 시스템에서 횡방향 스캐닝 (transverse scanning)을 추가함으로써 이차원 영상을 획득할 수 있도록 설계됐다.[14] OCT 시스템은 넓은 대역의 광원과 마이켈슨 간섭계를 기반으로 구성되어 있으며 현재 기술의 발달로 인해 안과학, 피부학, 소화기학, 치과학 등 임상학적으로 응용 범위가 확장되고 있는 기술이다. 일반적으로 OCT의 횡축·종축 해상도는 약 10~15 μm 로 임상 진단 장비로 사용되고 있는 Computed tomography, magnetic resonance imaging, ultrasound 보다 우수한 해상도를 가지고 있어 조직의 형태학적 변화를 영상화 할 수 있다. 하지만, 질병 원인의 조기 진단을 위해 살아있는 세포의 변화를 영상화하기에는 OCT의 해상도로는 충분하지가 않다. 따라서 최근 OCT의 공간 해상도 향상을 위해 높은 개구수를 사용해 *en-face* 영상을 얻는 광 결맞음 현미경 (Optical coherence microscopy : OCM) 개발 등 많은 연구가 진행되고 있다.

광 결맞음 현미경은 OCT 기술의 한 분야로써 높은 산란 조직 또는 물질 등에서 깊이 방향에 대한 정보를 높은 해상도를 가지고 *en-face*의 영상 정보를 파괴나 절개 없이 영상화 할 수 있는 기술이다. 일반적으로 비침습적으로 시료 이미지를 얻기 위해서는 그동안 공초점 현미경 또는 광학단층촬영술을 많이 사용하여 왔다. 공초점 현미경은 높은 대물렌즈의 NA(numerical aperture)를 사용하여 세포단위의 높은 해상도 성능을 가지고 있으며 핀홀을 이용하여 초점 밖에서 나오는 신호

를 제거하여 초점면에 있는 신호만을 이용하여 영상을 획득하므로써 높은 횡축 해상도를 가지고 깊이 방향에 대한 광절편 이미지 획득이 가능하나 깊이 방향에 대한 스캐닝 범위가 매우 한정적이어서 조직과 같은 불투명 대상을 비침습적으로 영상화하기가 힘들다.

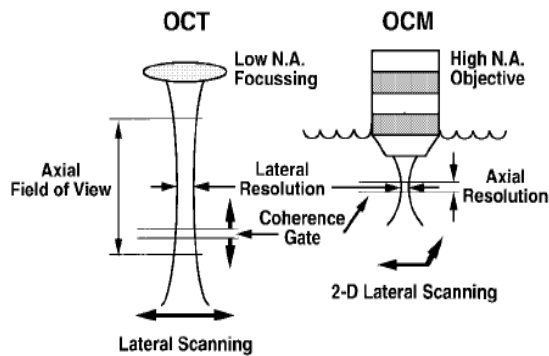


그림 3.1 OCT와 OCM의 샘플 부분

반면, 광학단층영상술은 낮은 개구수를 가진 대물렌즈를 이용하기 때문에 넓은 대역의 광원을 이용하여 긴 초점 심도 내에서 공초점 현미경 보다 훨씬 깊은 단면 영상을 획득 할 수 있다. 광 결맞음 현미경은 높은 개구수의 대물렌즈를 이용하여 최소한의 깊이만을 스캔하여 x-y 평면상에 높은 횡축 해상도의 en-face 이미지를 획득 할 수 있으며 간섭 거리 내에 있지 않는 신호는 제거함으로써 종축 해상도를 향상시킬 수 있는 기술이다. 따라서 산란 특성을 가진 물질을 높은 횡축·종축 해상도를 유지하며 500 μm 이상의 깊은 영역의 정보까지 비침습적으로 측정 할 수 있어 질병의 조기 진단을 위해 매우 유용한 기술이다.

3.2 저 결맞음 광원을 사용한 간섭계

저 결맞음 간섭계는 일반적인 마이켈슨 간섭계 (Michelson interferometry)와 같은 원리이다. 광원에서 나온 빛은 광분배기 (Beam splitter)를 통해 각각 샘플 (Sample) 경로와 광지연선 (Delay line)으로 분배되어 진행되고 샘플과 광지연선에서 반사되어 나온 빛은 다시 광분배기에서 합쳐져 두 단의 광경로가 일치할 때 간섭을 일으키며 검출된다.[13,14] 기본 개략도는 그림 3.2와 같다.

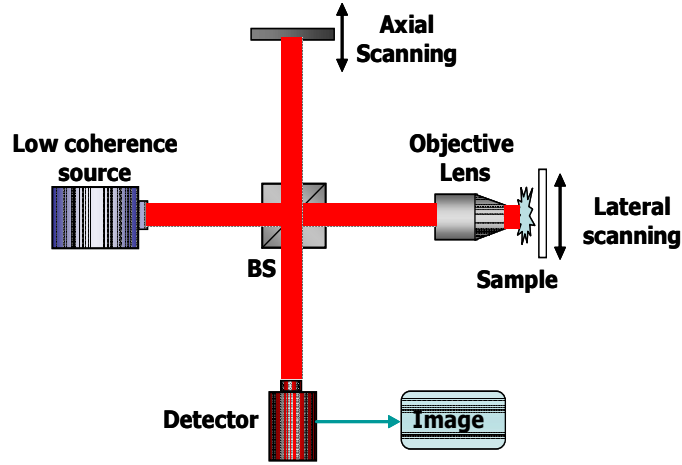


그림 3.2 마이켈슨 간섭계 (Michelson Interferometer)

3.2.1 간섭(Interference)과 종축 해상도(Axial resolution)

광파를 복사함수로 표현하면 아래와 같다.

$$\tilde{E} = E_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t + \phi)} \quad (3.1)$$

한 광원에서 두 개의 광파 즉, 샘플에서 나오는 빛 $\tilde{E}_s(r, t)$ 와 reference delay arm의 거울에서 나오는 빛 $\tilde{E}_r(r, t)$ 가 다른 경로를 가지고 진행한다고 하자. 만약 이 두 광파가 P점에서 만나 하나의 광파로 진행한다고 하면, P점에서 합성 필드는 중첩의 원리에 의해서

$$\tilde{E}_p(t) = \tilde{E}_s(t) + \tilde{E}_r(t + \tau) \quad (3.2)$$

로 표현할 수 있으며, 합성 복사조도는 아래와 같다.

$$\begin{aligned}
 I_p &= \langle (\widetilde{E}_s + \widetilde{E}_r) \cdot (\widetilde{E}_s^* + \widetilde{E}_r^*) \rangle \\
 &= \langle |\widetilde{E}_s|^2 + |\widetilde{E}_r|^2 + (\widetilde{E}_s \cdot \widetilde{E}_r^* + \widetilde{E}_s^* \cdot \widetilde{E}_r) \rangle
 \end{aligned} \tag{3.3}$$

각각의 광파에 대한 복사조도는

$$I_s = \langle |\widetilde{E}_s|^2 \rangle, \quad I_r = \langle |\widetilde{E}_r|^2 \rangle$$

이므로, 수식 3.3은

$$I_p = I_s + I_r + 2Re \langle \widetilde{E}_s \cdot \widetilde{E}_r^*(t + \tau) \rangle \tag{3.4}$$

으로 바꿀 수 있다.[5,13,15]

만약 두 빛이 같은 편광 성분을 가지고 있다면 내적은 최대가 된다.

$$\langle \widetilde{E}_s(t) \cdot \widetilde{E}_r^*(t + \tau) \rangle = \langle E_s(t) E_r^*(t + \tau) \rangle \tag{3.5}$$

이때, correlation function을 $\Gamma_{sr}(\tau) \equiv \langle E_s(t) E_r^*(t + \tau) \rangle$ 으로 정의하고, 규격화된(normalized) 상호가간섭 함수 즉, 복수 가간섭도(complex degree of coherence)를

$$\widetilde{\gamma}_{sr} = \frac{\Gamma_{sr}(\tau)}{\sqrt{\Gamma_s \Gamma_r}} = \frac{\langle E_s(t) E_r^*(t + \tau) \rangle}{\sqrt{I_s I_r}} \tag{3.6}$$

로 정의한다면, 수식 3.6에 의해서 수식 3.4를

$$I_p = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \operatorname{Re}[\widetilde{\gamma}_{sr}] \quad (3.7)$$

로 쓸 수 있다. 이를 부분 가간섭광의 일반적인 간섭법칙(general interference law for partially coherent light)이라 한다.[5]

일반적으로 $S(\nu)$ 가 광원의 power spectral density를 규격화한 값이라고 정의할 때, 복소 가간섭도 $\widetilde{\gamma}_{sr}$ 는 파워 스펙트럼의 푸리에 변환으로 표현될 수 있다.

$$\widetilde{\gamma}_{sr} = \int_0^{\infty} S(\nu) e^{-i2\pi\nu\tau} d\nu$$

이 때 power spectral density가 $(\nu - \nu_0)$ 의 우함수(even function)이면 복소 가간섭은 복소 가간섭도의 실수부와 $e^{-i2\pi\nu_0\tau}$ 의 곱으로 표현할 수 있다. 따라서,

$$\operatorname{re}[\widetilde{\gamma}_{sr}] = \gamma_{sr} e^{-i2\pi\nu_0\tau} = \gamma_{sr} \cos(2\pi\nu_0\tau)$$

이므로, 수식 (3.7)은

$$I_p = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \gamma_{sr} \cos(2\pi\nu_0\tau) \quad (3.8)$$

가 된다. 이 수식을 보게 되면 광 강도(intensity)는 빛이 지나간 시간 τ 에 의해 사인 곡선의 형태로 변화하며, 스펙트럼의 푸리에 변환으로 정의되어지는 포락선 함수(envelope function) γ_{sr} 에 의해 변조됨을 알 수 있다.[13,15]

Δl 를 빛의 광경로 길이라고 할 때, 광경로를 지나는데 걸리는 시간 $\tau = \Delta l/c$ 이고, $c = \nu\lambda_0$ 이므로 수식 3.8은 다음과 같이 거리에 대한 함수로 바꿔 쓸 수 있다.

$$I_p = I_s + I_r + 2\sqrt{I_s I_r} \gamma_{sr} \cos(k_0 \Delta l) \quad (k_0 = 2\pi/\lambda_0) \quad (3.9)$$

만약 광원의 스펙트럼이 가우시안이라면,

$$\gamma_{sr}(\tau) = \exp\left[-\left(\frac{\pi\Delta\nu\tau}{2\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right] \quad (3.10)$$

이 되고, 수식 3.9와 3.10에 의해서 아래와 같은 상관관계를 가지게 된다.

$$I_p \propto 2\sqrt{I_s I_r} \exp\left[-\left(\frac{\pi\Delta\nu\tau}{2\sqrt{\ln 2}}\right)^2\right] \cos(2\pi\nu_0\tau) \quad (3.11)$$

또한, $\gamma_{sr}(\tau_0) = \frac{1}{2}$ 일 때 coherence $l_c = \tau_0 c$ 가 된다. 따라서,

$$l_c = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{c}{\Delta\nu} = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda_{FWHM}} \approx 0.44 \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda_{FWHM}} \quad (3.12)$$

이며, 나중에 신호처리를 통하여 복조(demodulation)를 거친다면 coherence length(l_c)가 광 결맞음 간섭계의 깊이 방향에 대한 해상도 (axial spatial resolution)가 된다.

3.2.2 Doppler shift modulation

Reference delay arm과 sample arm의 두 빛에 대한 광 경로차를 만들어 주기 위해서 reference delay arm의 거울을 정해진 거리 구간 (Δl)에 대하여 일정한 속도로(v)로 움직이게 해준다. 이때 빛의 파장과 거울의 속도에 의해서 주파수 변

이가 발생하게 된다.

수식 3.9에서 신호는 $\cos(k_0\Delta l)$ 에 의해서 변화됨을 볼 수 있다. 그런데, 여기서 Δl 을 거울이 움직이는 속도와 진행한 시간의 곱($\Delta l = 2\nu t$)으로 나타내므로,

$$\cos(k_0\Delta l) = \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda_0}2\nu t\right) \quad (3.13)$$

가 성립하게 된다. 일반적으로 코사인 함수를 주파수 변조 f 에 대해서 $\cos(2\pi ft)$ 로 나타내므로,

$$f_D = 2\nu/\lambda_0 \quad (3.14)$$

가 된다.[13,15]

따라서, 실제로 reference delay arm에서의 빛과 sample arm에서의 빛이 재결하면서 생기는 간섭 신호는 거울의 움직임에 의해 발생하는 도플러 주파수 변이에 의해 변조되는 신호로 나타나는 것이다.

3.2.3 횡방향 해상도 (lateral resolution)

일반적으로 현미경의 분해능을 정의할 때 레일리 기준(Rayleigh's criterion)에 따른다. 무한히 먼 물체에서 출발한 광선이 렌즈를 통과하고 결상이 될 때 렌즈가 완벽하다 하더라도 광선의 회절에 의해서 밝은 부분과 어두운 부분이 주기적으로 나타나는 에어리 원판(Airy pattern)이 나타나게 된다. 레일리 기준이란 두 개의 밝기가 같고 비가간섭성(incoherent)인 점이 분리가 되기 위해서는 한 개의 에어리 원판의 중심이 다른 점의 에어리 무늬의 첫 번째 어두운 부분에 위치해야 한다는 것이다. 입사되는 광선의 파장을 λ 라 하고 대물렌즈의 개구수(numerical aperture)

를 NA라 할 때, 분해 가능한 최소의 분리 각 또는 분해 한계각(angular limit of resolution)은

$$(\varphi)_{min} = \Delta\theta = \frac{1.22\lambda}{D} \quad (3.15)$$

가 되며, 그림 3.3에 나타나 있다. 두 상의 중심 사이의 거리를 Δl 이라 하면 분해한계(limit of resolution)는

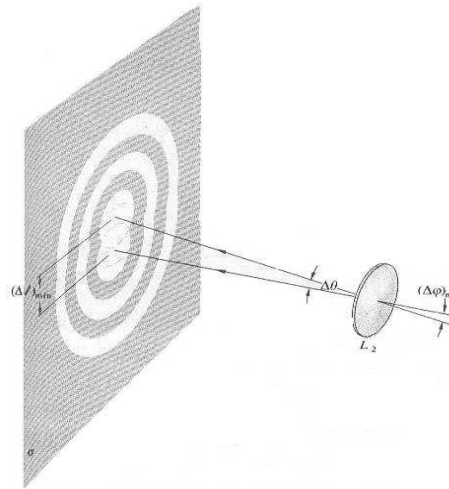


그림 3.3 에어리어 원판

$$(\Delta l)_{min} = \Delta x = 1.22f\lambda/D = \frac{1.22 \cdot \lambda}{2NA} \quad (3.16)$$

식에서도 알 수 있듯이 입사되는 광선의 파장이 짧을수록 대물렌즈의 개구수가 커질수록 분해능은 점점 커진다.[5] 또한 개구수의 증가로 초점 심도(depth of focus)가 감소하고 이는 광 결맞음 현미경에서 *en-face* 이미지 획득 시 종축 해상도 향상에 영향을 미친다.

제 4 장 비선형 광결맞음 현미경 구성

4.1 이차 하모닉 광결맞음 현미경 구성

4.1.1 시스템 구성

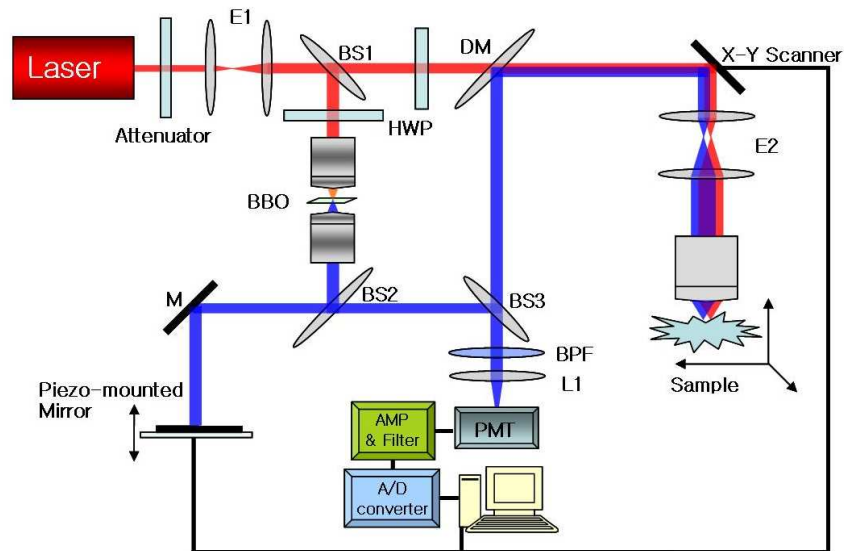


그림 4.1 광 결맞음 현미경 구조도

BS1 : Beam splitter (50:50), BS2 : Beam splitter (10:90), BPF : Band pass filter
 DM : Dichroic mirror, PMT : Photomultiplier tube, HWP : Half wave plate

위 그림 4.1은 본 연구에서 구성한 전체 시스템의 도식도로 먼저 전체적인 시스템 구성에 대하여 아래와 같이 설명한다.

먼저 광원으로 시료에 손상을 주지 않는 평균 출력 이하이면서 비선형 광신호를 주기에 충분한 세기의 첨두 출력을 가지고 있는 모드 잠금 펄스 레이저를

사용하였다. 이 광원은 횡축 해상도의 최적화를 위해 대물렌즈의 후개구를 최대한 채울 수 있도록 확대시켜야 하는데 이 시스템에서 두 쌍의 볼록 렌즈 (L1, L2)를 사용하였다. 이렇게 확대된 빔은 빔 분할기에 의해 한쪽은 reference delay arm으로 다른 쪽은 sample arm으로 나뉘어 진행하게 된다. reference delay arm으로 간 빛은 대물렌즈 (NA: 0.2, 5X)의해 이차 하모닉 신호를 발생시키는 BBO crystal에 집속된다. BBO crystal에 의해 원래 광원(800nm)과 이차 하모닉 신호(400nm)가 생성되고 이는 다시 똑같은 대물렌즈 (NA: 0.2, 5X)에 의해 다시 원래의 크기로 평행하게 진행된다. 이때 대물렌즈 앞에 Half wave plate를 놓아 수평 편광된 광원의 편광을 변화시켜 이차 하모닉 신호의 세기를 조절 할 수 있도록 하였다. 이렇게 만들어진 이차 하모닉 신호는 Piezo Electric Actuator에 부착된 거울에서 반사되어 delay line를 형성하여 검출기로 향하게 된다. Sample arm으로 간 빛은 *en-face* 영상 구현을 위해 Galvano scanner에 의해 x-y scan이 되고 expander 2에 의해 확대되어 회절된 광선을 손실 없이 대물렌즈에 전달된다. 이때, 비선형 물질 특성을 가진 시편과 입사된 빛은 상호작용하여 이차 하모닉 신호가 발생된다. 시료에서 반사되어 발생된 이차 하모닉 빛과 원래 파장의 빛은 다시 expander 2와 Galvano Scanner를 지나 Descan이 된다. 여기서 400nm 파장만 반사되는 Dichroic Mirror를 사용하여 원래의 파장은 그대로 통과시키고 이차 하모닉 신호만을 반사시켜 검출기로 보낸다. 각각 Reference arm과 sample arm에서 생성된 이차 하모닉 신호는 투과가 90이고 반사가 10인 빔 분할기에 의해 다시 합쳐진다. 공간적, 시간적으로 중첩된 이차 하모닉 신호는 400nm 파장만을 통과하는 Band pass filter를 통과한 후 볼록 렌즈에 의해 집속되어 검출기에 의해 검출된다. 이때, reference delay arm에 의해서 두 빛의 경로차가 같아지면 간섭현상을 일으키게 된다.[16,17] 이렇게 발생된 간섭신호는 Lock-in amplifier에 의해 간섭 신호에 해당되는 주파수만을 통과시켜 주고 RMS Detector를 거쳐 DAQ 보드를 통해 LabVIEW 프로그램에 의해 만들어진 이미지 구현 프로그램에서 2D 이미지가 구현된다.

4.1.2 광원 선택

중첩, 반사, 굴절 등과 같은 빛의 전파를 고전적으로 취급할 때, 일반적으로 전자 기장과 매질을 구성하는 반응 원자계 사이에 선형적인 관계를 가정한다. 그러나 진동하는 역학 장치가 충분히 큰 힘의 작용으로 무리가 가서 비선형 반응을 보이는 것과 같이, 매우 강한 광속은 상당한 비선형 광학적 효과들을 발생시킬 수 있다는 것을 예측할 수 있다. 보통 또는 전통적인 광원들의 광속과 관련된 전기장은 너무 미약하여 그와 같은 효과를 쉽게 관찰할 수 없다. 하지만 피코 또는 펨토 레이저의 개발로 인해 충분한 세기의 전기장을 만들어 줄 수 있어 비선형에 대한 연구가 가능하게 됐다. 따라서 본 논문에서 광원으로 시료에 손상을 주지 않는 평균 출력이하이면서 비선형광 신호를 주기에 충분한 세기의 침투 출력을 가지는 Modelocked Ti:Sapphire Laser (Coherent, Mira 800 Verdi-V8 pumping)를 사용하였다. 다음 표 4.1은 실험에 사용한 레이저 Mira 900에 대한 특성 표이다.

표 4.1 Mira 900 (Verdi-V8) 특성표

Specification	Mirra 900 (Verdi-V8)	Typical Power Tuning Curve
Out power	1.0 W	
Tuning Range	700nm ~ 980nm	
Autocorrelation	<200 fs	
Repetition Rate	76 MHz nominal	
Noise	<0.1%	
Stability	<3%	
Beam Diameter	0.8 mm	
Beam Divergence	1.7 mrad	
Spatial Mode	TEM ₀₀	
Polarization	Horizontal	

또한 광원 선택에 있어서 고려해야 할 것은 인체에 대한 무해성과 투과 깊이이다. 너무 짧은 파장이면 선형산란효과가 커져 시료의 표면 근처만 관찰이 가능하고, 너무 긴 파장이면 물 분자에 의한 레이저 광의 흡수 때문에 시료 내부로 빛이 전달되지 못하기 때문에 근적외선 영역의 파장인 중심파장 800nm를 사용하였다. 펄스초 레이저 펄스와 같이 매우 높은 순간 파워를 지닌 펄스 광원이 콜라겐, 마이오신, 미소관과 같은 이차 비선형 성질 (2nd order nonlinear susceptibility)을 가진 매질을 통과하면, 광원에서 나온 두 개의 광자가 비선형 물질에 의하여 하나의 광자로 합쳐지면서 광원 (800nm)이 가지고 있는 광자 고유 주파수보다 2배의 주파수를 가지는 이차 하모닉 빛(400nm)이 발생하게 된다. 아래 그림 4. 2는 본 연구에서 사용한 800nm 파장 빛과 이 파장이 비선형 매질인 0.05mm 두께의 β -barium borate (BBO; type I phase matching) 크리스탈을 통과한 후 발생한 이차 하모닉 신호인 400nm 파장에 대한 스펙트럼을 fiber optics 스펙트로미터 (Ocean Optics)로 측정 그래프이다. 각 파장에 대한 FWHM 대역폭은 800nm에 대해서는 7.45nm, 400nm 파장에 대해서는 2.98 nm값이 측정되었다.

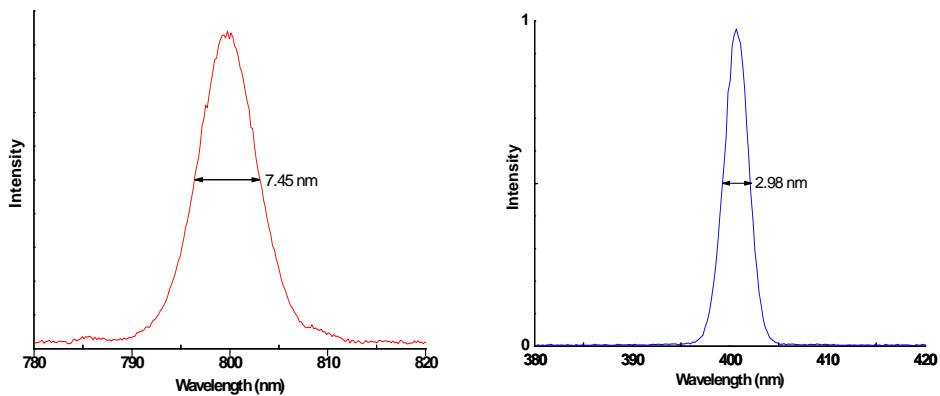


그림 4. 2 광원 및 이차 하모닉 신호에 대한 스펙트럼

광원의 중심파장과 대역폭에 대한 시스템의 종축 해상도(axial resolution)를 수식 3.12에 대입하면

$$l_{c(800nm)} = 0.44 \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda_{FWHM}} = 0.44 \frac{(800nm)^2}{7.45nm} \approx 37.9\mu m$$

$$l_{c(400nm)} = 0.44 \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda_{FWHM}} = 0.44 \frac{(400nm)^2}{2.98nm} \approx 23.7\mu m$$

가 된다. 즉, 이 광원을 사용하면 이론적으로 800nm에 대해 37.8 μ m, 400nm에 대해 23.7 μ m의 깊이 방향에 대한 해상도를 갖게 된다.

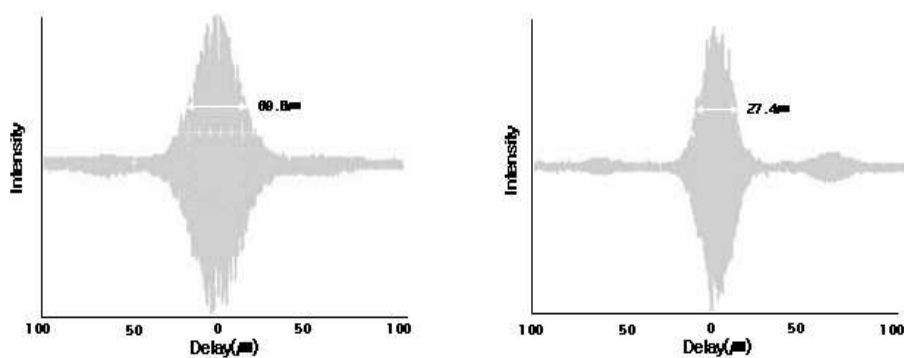


그림 4. 3 광원 및 이차 하모닉 신호에 의해 측정된 간섭 신호

위 그림 4. 3은 본 시스템 평가를 위해 직접 측정한 간섭 신호이다. 광원의 파장에 최대 효율을 가질 수 있도록 각각 거울 및 BBO 크리스탈을 이용하여 간섭 신호를 측정하였다. 각각의 가간섭 거리가 각각 39.8 μ m와 27.4 μ m로 측정되었고 이론값과 실제 측정값 사이에 오차는 각각 2.57%, 7.24%이다. 이론값과 측정값의 오차 발생은 본 시스템에서 확인할 수 있듯이 대물렌즈를 비롯해 시스템에 사용된 렌즈들에 의한 분산 때문에 발생하고 특히, 짧은 파장인 400nm에 심하게 발생됨을 확인할 수 있다.[18-20] 렌즈에 의한 분산을 보상하기 위해 한쪽 단에 두 개의 프리즘을 이용하면 이 문제를 해결 할 수 있을 것이다. 본 시스템은 비선형 신호에

대한 광결맞음 현미경 구성이기 때문에 여기서 800nm 신호를 배제한 이차 하모닉 신호 400nm 파장만을 이용해 현미경을 구성하였고 결국 본 시스템의 종축 해상도는 앞에서 언급한 $27.4\mu\text{m}$ 가 된다.

4.1.3 Reference delay arm

OCT 또는 OCM에서 Reference delay arm은 sample에서 오는 신호와의 간섭 거리의 차를 만들어 주면서 깊이 정보를 간섭 신호를 제공해 준다. 본 시스템 개략도를 통해 알 수 있듯이 reference arm에서 이차 하모닉 신호는 대물렌즈를 사용해 BBO crystal에 집속시켜 생성되고 이는 또 다른 대물렌즈에 의해 평행광이 되어 일정한 거리에 고정되어 있는 Piezo Electric Actuator에 부착된 거울에 의해 반사되어 sample 단에서 형성된 이차 하모닉 신호와 결합하여 modulation된 간섭신호를 만들어 준다. 이때 거울이 부착된 piezo의 속도와 움직임 거리에 따라 일정한 doppler shift frequency에 실린 간섭 신호를 얻을 수 있다. 현재 piezo를 사용한 기술 외에도 galvanometric, polygonal, stepper motor stage 등의 방법으로 reference arm의 delay line을 형성 해 줄 수 있다.

본 시스템에서는 앞에서 언급한 바와 같이 piezo를 이용하여 간섭신호를 modulation 하였고 아래 그림 4. 4는 구성한 reference arm 구조도이다.

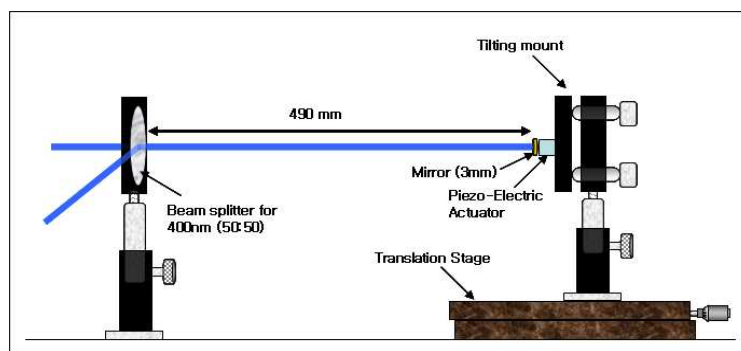


그림 4. 4 Piezo를 이용한 reference delay arm 설계

먼저 tilting 가능한 mount 위에 Piezo-Electric Actuator (AE0203D04F, Thorlabs)를 접착제를 이용하여 고정시킨 다음 그 위에 400nm 파장에 최적화로 코팅된 직경 3mm, 무게 약 0.01gram 거울을 소량의 접착제를 이용하여 고정시켰다. 여기에서 거울은 Piezo-Electric Actuator의 무게에 대한 성능 저하를 막기 위해 최소화 하였고, 크기 또한 reference arm에서 이동되는 빛의 크기에 맞게 주문 제작하였다. 따라서 본 시스템에서 사용한 Piezo-Electric Actuator는 아래 표 4.2에서 제시되는 것 안에서 구동될 것으로 생각된다.

표 4. 2 Piezo-Electric Actuator 특성표

AE0203D04F	
Drive Voltage Limit for Continuous Operation	100 Volts
Displacement at Recommended Drive Voltage Limit	3.0 ± 1.5µm
Resonant Frequency (no mechanical load)	261kHz
Capacitance @ 1KHZ, 1V RMS	0.09µF ± 20%
Clamping Force	45lb (200N)
Maximum Recommended Preload	22.5lb (100N)
Actuator End Face Area	3.5mm x 4.5mm
Length Along Actuating Axis	5mm

Piezo-Electric Actuator의 속도와 움직이는 거리는 깊이 방향에 대한 정보 및 image 획득에 큰 영향을 준다. 광결맞음 현미경은 깊이 방향에 대해 스캔을 하지만 궁극적으로 *en-face* image 획득을 목표로 하기 때문에 간접 측정을 위해 최소한의 깊이 스캔을 하면 그 만큼 Piezo-Electric Actuator의 속도를 빠르게 구동할 수 있고 궁극적으로 OCM *en-face* image를 빨리 획득할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 궁극적으로 Piezo-Electric Actuator를 100kHz 이상의 높은 주파수

로 구동시키고 약 170nm만큼의 거리차를 줄 수 있는 AC 전압을 Piezo-Electric Actuator에 인가하였다. 하나의 fringe 정도 생성시키는 간섭거리로 움직이다 보면 온도 변화, 진동 등 외부 환경 등에 의해 발생하는 phase에 매우 민감하게 반응하고 이는 측정하고자 하는 간섭신호의 RMS값을 변화시킨다.[21] 따라서 본 연구에서 phase 변화에 영향을 받지 않고 항상 일정하게 유지되는 간섭 신호의 RMS 값을 얻기 위해 최적의 Piezo-Electric Actuator의 전압값 선택이 중요하다.[22-23]

사인 함수가 Piezo-Electric Actuator에 인가될 때 광 결맞음 현미경의 간섭신호의 power는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$P_{out} = P_{ref} + P_{sample} + 2\sqrt{P_{ref}P_{sample}} \cos[\alpha \sin \omega t + \phi] \quad (4.1)$$

여기서 P_{ref} 와 P_{sample} 는 각각 reference 와 sample 단의 광 power값이다. 또한 α 는 $4\pi d_o/\lambda$ 값으로 정의할 수 있고, d_o 는 Piezo-Electric Actuator에 인가되는 peak-to-peak 전압에 따른 이동거리이고, λ 는 빛의 파장, ω 는 Piezo-Electric Actuator의 주파수이다. 위 수식 4.1에서 간섭신호의 첫 번째 부분 $\alpha \sin \omega t$ 는 piezo mirror에 속도에 영향을 받고 두 번째 부분인 ϕ 는 외부 환경에 의해 바꾸는 phase 변이 값이다. 우리는 간섭신호의 안정화를 위해 궁극적으로 두 번째 부분인 ϕ 를 고정시키고자 한다.

위의 간섭 신호에서 이미지 구성에 사용되는 실질적 신호인 ac 전압 값을 수식 4.2와 같이 표현할 수 있다.

$$V_{interference}(t) = V_0 \cos[\alpha \sin \omega t + \phi] \quad (4.2)$$

여기서, $V_0 \propto 2\sqrt{P_{ref}P_{sample}}$ 이다.

이는 다시 간섭 신호의 ac power로 식 4.3과 같이 표현될 수 있다.

$$\begin{aligned} \text{ac power in } V_{\text{interference}} = & 2V_o^2 [J_1^2(\alpha) + J_3^2(\alpha) + J_5^2(\alpha) + \dots] \sin^2\phi \\ & + 2V_o^2 [J_2^2(\alpha) + J_4^2(\alpha) + J_6^2(\alpha) + \dots] \cos^2\phi \end{aligned} \quad (4.3)$$

여기서 $J_n^2(\alpha)$ 은 베셀 함수의 제곱값이고, 만약 n 이 홀수(또는 짝수) 이면 $2V_o^2 J_n^2(\alpha) \sin^2\phi$ (또는 $2V_o^2 J_n^2(\alpha) \cos^2\phi$)는 n 번째 하모닉 주파수에서의 power 값이다. 여기서 설명한 베셀 함수를 J_1 부터 J_4 까지 그래프로 나타내면 그림 4. 6과 같다.

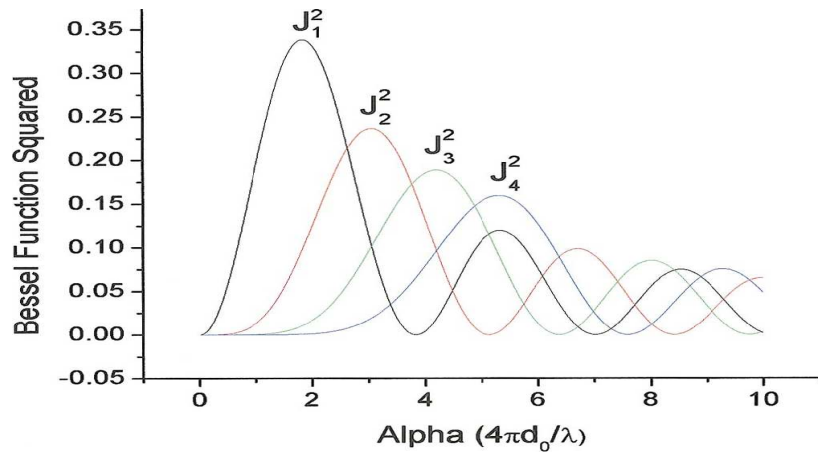


그림 4. 5 Piezo 전압값에 따른 간섭 신호의 베셀 함수의 제곱값

위 그림 4. 5를 보면 $J_1^2(\alpha)$ 과 $J_2^2(\alpha)$ 값이 같은 $\alpha=2.63$ ($2d_0 = 0.418\lambda$)에서 phase 변위 ϕ 값이 0이 됨을 알 수 있다. 즉, ω 와 ω_2 안에서 power의 합은 특정 piezo 구동 전압 값에서 phase 변이 ϕ 값이 상관없이 항상 일정하다.[22] 본 연구에서는 phase 변이에 민감하지 않는 $\alpha=2.63$ ($2d_0 = 0.418\lambda$), 즉, Piezo-Electric Actuator가 약 170nm 변위만큼 움직일 수 있도록 8.6 V_{pp} 전압을 결정하여 인가하였다.

4.1.4 Sample arm

광 결맞음 현미경에서 sample 단은 현미경과 똑같이 구성한다. 먼저 *en-face* image 획득을 위해 원하는 물체에 x-y 주사가 필요하다. 가장 간단한 방법으로 시편 이동 방식이 있는데 이는 현미경의 광학계는 고정 되어 있고 시료를 측정하고자 하는 범위만큼 움직여서 영상화 한다. 이 방법은 초점이 항상 고정되어 있기 때문에 광학적 수차가 적게 발생하지만 시료를 움직일 때 기계적인 진동이 생기고 움직임이 일정치 않으면 상의 왜곡이 생기게 되고, 특히 영상을 얻는데 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.[24] 또 다른 방법으로 광선 편향 방식이 있는데 이는 측정하고자 하는 시료는 고정시키고 광학 편향기를 사용해서 대물렌즈에 입사되는 광선의 각도 변화를 통해 시료를 주사하는 방법이다. 이 방법은 광학 편향기의 종류에 따라 영상 획득 속도가 다르나 시편 이동 방식보다 매우 빠른 영상 획득이 가능하다. 광학 편향기로는 갈바노 미러(galvano mirror), 레조넌트 스캐너(resonant scanner), 다각 거울(polygon mirror), 음향광학 편향기(acousto-optic deflector) 등이 있다.[25]

본 연구에서는 두 개의 x-y 갈바노 미러(6210H, Cambridge)를 사용하여 시편에 광원을 주사하는 방법을 사용하였다. 갈바노 미러는 좋은 반사 효율을 가지고 있고 선형적인 주사 속도 특성이 있다. 하지만, 일반적으로 타 광학 편향기보다 주사 속도가 느리다는 단점이 있다. 하지만, 이차 하모닉 신호를 얻기 위해 시료에 충분히 광원을 입사시켜야 하기 때문에 굳이 빠른 주사가 필요 없으므로 주사시 매우 안정적인 갈바노 미러를 주사 방법으로 선택하였다. 광원의 빔 크기가 약 1.6mm이므로 갈바노 미러의 개구를 3mm로 최소화하여 미러 무게에 따른 작동 오류를 최소화 하였다. 갈바노 미러 구동을 위해 cambridge사에서 제공하는 67121H-1 servo driver를 사용하였고 입력 function 함수에 따라 0.5 volt 당 1도의 광학 각도를 가지고 주사할 수 있도록 설정하여 측정시 시료의 주사 영역(field of view, FOV)을 쉽게 조절할 수 있도록 구성하였다.

갈바노 미러에 의해 주사된 광원은 주사렌즈와 전달렌즈에 의해 대물렌즈에 입

사하게 된다. 이때 볼록렌즈 두 개를 사용하여 광선 확장기를 구성하였다. 이는 분해능 저하 없이 주사되는 광선의 대부분을 시료면에 전달하고 되돌아오는 광선의 세기도 가장 크게 하여 신호대 잡음비를 좋게 하기 위해서 광원의 크기를 대물렌즈의 개구의 크기에 맞게 확장시켰다. 광선 확장기로 입사되는 레이저의 지름을 x , 광선 확장기를 통과해 나오는 레이저의 지름을 y 라 할 때 x, y 는 기하 광학적으로 아래의 수식과 같은 관계를 만족한다.[5]

$$y = \frac{x \times f_2}{f_1} \quad (4.4)$$

본 연구에서는 입사광이 800nm이고 신호 광이 400nm이므로 광학적 수차 보정을 위해 두 개의 렌즈를 겹쳐 만든 볼록렌즈 2개 ($f_1=30\text{mm}$, $f_2=150\text{mm}$)를 이용하여 아래 그림 4.6과 같이 1.6mm 크기의 레이저 광원을 약 8mm로 확장시켜 대물렌즈(UMPlanFI 20X, NA=0.46, Olympus)의 개구에 입사시켰다.

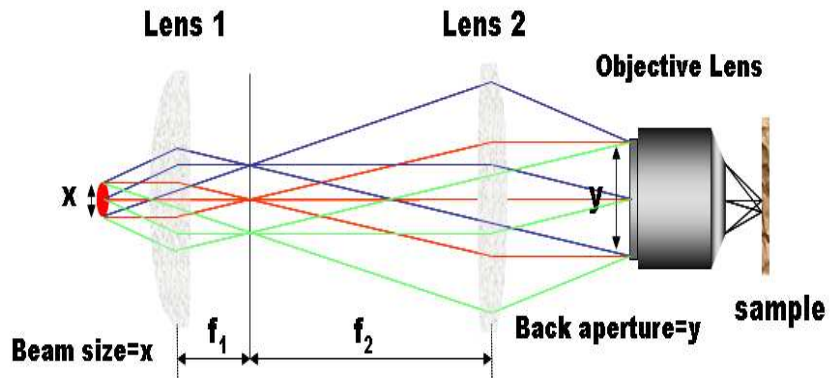


그림 4. 6 sample arm에서의 광선 확장기

위에서 설명한 바와 같이 시스템을 구성하면 OCM의 횡축 해상도를 수식 3. 16에 의해 약 $0.53\mu\text{m}$ 가 된다.

$$(\Delta l)_{\min} = \Delta x = 1.22f\lambda/D = \frac{1.22 \cdot \lambda}{2NA} = \frac{1.22 \cdot 400nm}{2 \times 0.46} = 0.53\mu m$$

하지만 측정하고자 하는 샘플의 굴절율이 공기보다 더 크고 신호의 파장이 400nm이고 이차 하모닉이 광원이 집속된 특정 지역 내에서만 발생하기 때문에 횡축 해상도는 이보다 더 좋을 것으로 생각된다.

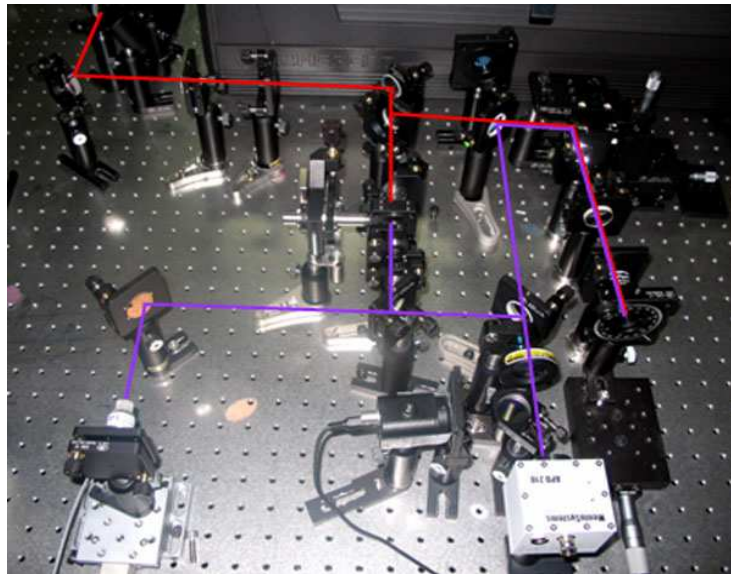


그림 4. 7 광 결맞음 현미경 시스템 실측 모습

4.1.5 신호 검출

reference delay arm에서 BBO 크리스탈에 의해 생성된 이차 하모닉 신호와 sample arm에서 시료에 의해 발생된 이차 하모닉 신호는 400nm에 최적화로 코팅된 Beam splitter에 의해 시간적 공간적으로 중첩된다. 이때 reference에서 나온 신호에 비해 sample에서 오는 신호의 세기가 너무 미약하기 때문에 Beam splitter는 10 : 90 의 비율의 특성을 가진 것을 사용하였다. 이렇게 중첩된 이차 하모닉 신호는 Band-pass filter (CWL: 400nm, FWHM: 40nm)를 통과시켜 이차 하모닉 신호 이외의 불필요한 모든 신호를 제거했고 스펙트로미터(USB4000 Spectrometer, Ocean Optics)를 이용하여 이차 하모닉 신호만 통과됨을 확인했다. 또한 볼록렌즈(f=100mm)와 일반 CCD 카메라를 이용하여 두 빔의 공간적 중첩을 확인하여 간섭 신호의 visibility를 높였다. 검출기로는 이차 하모닉 신호 검출을 위해 감도가 매우 좋은 PMT(Photomultiplier tube, HAMAMATSU H9305-03)을 사용하였다. 표 4. 3은 실험에 사용한 PMT의 특성표이다.

표 4. 3 PMT 특성표

Parameter		H9305-03	Characteristics
Input voltage		+11.5 to +15.5 V	
Max. Input Current		7 mA	
Max. Input Signal Current		10 uA	
Max. Control Voltage		+1.2 V	
Effective Area		3.7×13.0 mm	
Sensitivity Adjustment Range		1:10 ⁴	
Dark Current	Typ.	2 nA	
	Max.	10 nA	
Rise Time		1.4 ns	
Ripple Noise	Max.	0.5 mV	

PMT를 통해 획득된 이차 하모닉 간섭 신호는 전류 형태로 변환된다. 이는 저잡음 전류 전치증폭기(Stanford Research System, INC., SR 570)를 통해 10k 주파수 high pass 필터를 통해 간섭 신호만 받아 증폭하여 전압 형태로 바꿔준다. 이 신호는 DAQ 보드(National Instruments Corporation, NI-6115)와 LabVIEW 프로그램을 통하여 A/D 변화시켜 준다. 이렇게 얻은 신호를 가지고 200X200 픽셀 크기의 이차 하모닉 광결맞음 현미경 2-D 영상을 0.4 frames/s 속도로 획득하고자 한다. 먼저 LabVIEW 프로그램을 사용하여 sample에 있는 x-y 갈바노 미러를 구동시켜 줄 수 있는 function 2개 출력을 만들고 획득된 신호를 받을 수 있는 입력 하나를 생성한 다음 Piezo-Electric Actuator를 구동시켜 주는 외부 function으로 LabVIEW 입·출력 단의 동기를 맞췄다. 깊이 방향에 대한 정보를 스캔하는 Piezo-Electric Actuator는 16kHz 이상으로 구동시키고, x galvano mirror는 80Hz, y galvano mirror는 image 획득 속도인 0.4 Hz로 각각 구동시켰다. 이때, 깊이 방향에 대한 정보가 약 하나의 fringe로 나타나는데 이값을 RMS값으로 변환시키면 한 픽셀에 대한 신호 세기 값을 얻을 수 있다. 우리는 한 픽셀에서 10개의 데이터 값을 취해 이를 RMS 값으로 변환했다. 많은 데이터를 취하면 더 정확한 fringe의 RMS 값을 얻을 수 있지만 그 만큼 데이터의 양이 증가하여 이미지 획득 속도가 상당히 느려진다. 따라서 한 픽셀에서 10개의 데이터를 얻어 이를 통해 RMS값을 얻고 이 과정을 200X200 픽셀에 대해 취해 이차 하모닉 간섭 신호를 2-D 영상화할 수 있다. RMS 값을 얻기 전에 좁은 대역폭의 대역 통과 필터를 이용하여 노이즈 성분을 완전히 제거해야만 한다. 대역 통과 필터를 사용하기 위해서는 간섭 신호에 대한 중심 주파수와 대역폭을 알아야 하는데, 가장 좋은 방법은 BBO 크리스탈을 이용하여 한 포인트에서 나온 이차 하모닉 간섭 신호를 받아서 FFT(Fast Fourier Transform) 취해 확인 할 수 있다. 그림 4. 8는 reference arm를 16kHz로 변조하여 얻은 한 포인트에 대한 간섭신호를 나타낸 것이다. 이렇게 얻어진 간섭 신호를 FFT한 그래프(그림 4. 9)를 보면 중심 주파수가 약 31kHz임을 확인 할 수 있다. 이는 수식 3. 14에 의해 얻은 이론값 32kHz보다 약간 낮음을 알 수 있다.

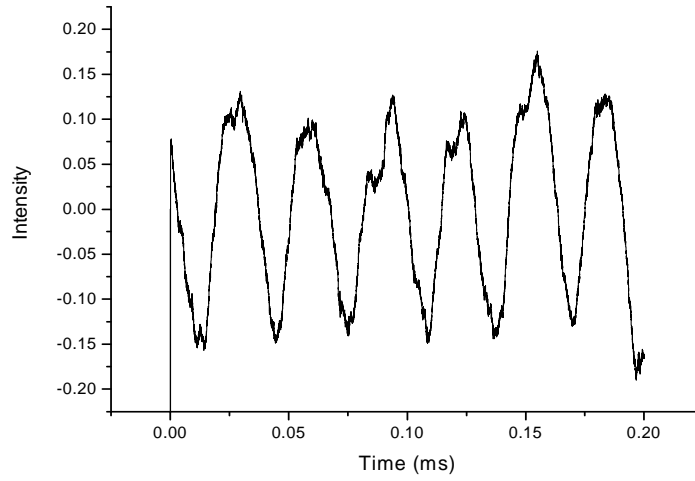


그림 4. 8 SH-OCM 시스템의 간섭신호 (약 1 fringe)

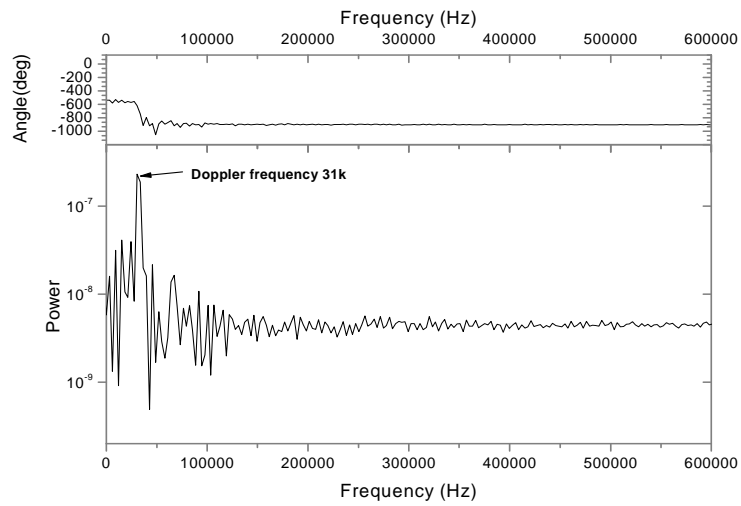


그림 4. 9 SH-OCM 시스템의 도플러 중심 주파수

4.2 CARS 광결맞음 현미경 구성

간섭성 반스톡스 라만 현미경은 형광 표지자 없이 시료 내부의 화학종을 분석, 영상화 할 수 있는 광학 이미징 기술이다. 하지만 CARS 현미경도 조직과 같은 불투명한 물체를 대상으로 영상화 하기에는 뒤쪽으로 되반사되어 오는 신호가 적기 때문에 표면 근처에서의 정보만이 영상화되고 있다. 따라서 조금 더 깊은 곳의 정보를 얻기 위해 많은 연구가 이뤄지고 있다. 본 연구에서는 빛의 간섭성을 이용하여 영상화하는 광결맞음 단층촬영장치의 기술을 이용하여 수백 μm 깊이에서 오는 신호를 영상화하여 비침습적으로 영상 가능한 기술을 개발하고자 한다.

간섭성 반스톡스 라만 광 결맞음 현미경은 앞에서 설계한 이차 하모닉 광 결맞음 현미경에 매우 유사하다. 다만 간섭성 반스톡스 라만 신호는 3개의 입사광 레이저빔이 시료 내에서 상호작용하여 하나의 신호광을 형성하는 사광파혼합법(four wave mixing)이기 때문에 동기화된 Pump 빔과 Stokes빔을 입사시켜준다.

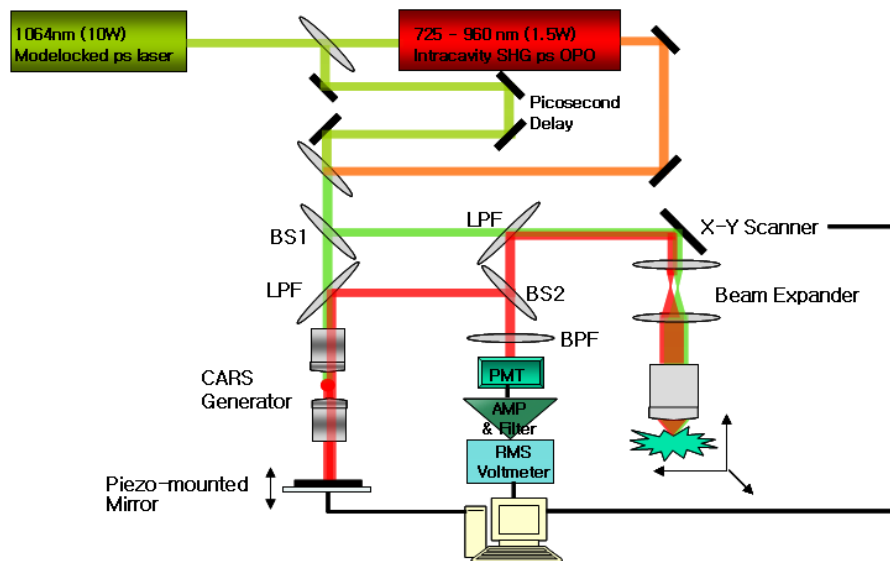


그림 4.10 CARS 광 결맞음 현미경 구조도

BS1 : Beam splitter (50:50), BS2 : Beam splitter (50:50), BPF : Band pass filter
DM : Dichroic mirror, PMT : Photomultiplier, HWP : Half wave plate

위 그림 4. 10은 본 연구에서 구성한 간섭성 반스톡스 라만 광결맞음 현미경의 시스템 구조이다.

먼저 광원으로 한국표준과학연구원 나노 바이오 융합단에서 자체 제작한 CARS 현미경에서 사용한 광원을 사용하였다. 광원을 살펴보면, 피코초 레이저 광원으로 파장 1064nm에서 발진하여 76MHz로 모드 잠금으로 동작하는 10W 네오뎀-바나데이트 (Nd:VAN) 레이저 (picoTrain, HiQ Laser)와 이 레이저로 펌핑되는 OPO 장치 (Levante OPO, APE)가 사용되었다. 채택된 레이저 시스템은 고정 파장의 피코초 레이저 펄스에 의해 동기화 펌핑된 OPO (optical parametric oscillator)로부터 생성된 파장가변 피코초 펄스를 이용하므로, 원리상 별도의 펄스 동기용 고속 전자장비 없이도 두 펄스 간의 시간 요동을 제거할 수 있다. 따라서 1064nm의 스톡스 빔과 이로 인해 발생하는 펌프빔을 817.2nm로 설정하여 CARS 발생 광원으로 사용하였다. 이 광원들은 CARS 신호 발생에 필요한 충분한 침투 출력을 가지고 있고 바이오 시료내에 분포하는 분자종의 분광선을 구분해 낼 수 있는 약 10cm^{-1} 의 레이저 선폭을 가지면서 76MHz로 동작하는 수 피코초 모드락킹 레이저이다.

이렇게 구성된 광원은 빔 분할기(Beam splitter)를 통해 한쪽은 reference delay arm으로 다른 쪽은 sample arm으로 나뉘어 진행하게 된다. reference delay arm으로 간 빔은 LPF(long pass filter)를 통과해 초점거리 10mm인 볼록렌즈에 의해 볼렌즈(유리 결정체)에 집속된다. 이때 볼렌즈에 의해 CARS 신호가 발생되며 이를 다시 초점 거리 10mm인 볼록렌즈에 의해 평행광이 되어 PZT위에 부착된 거울면에 입사된다. 거울에 의해 반사된 reference CARS 신호는 똑같은 경로를 거쳐 LPF에 의해 반사되어 원래의 광원과 분리된다. sample arm으로 간 빔은 이차 하모닉 광결맞음 현미경과 똑같이 Galvano scanner에 의해 x-y 주사가 되고 expander에 의해 확대되어 회절된 광선을 손실 없이 대물렌즈에 전달된다. 스톡스 빔의 파장이 1064nm이고 펌프 빔의 파장이 817.2nm이므로 663.41nm의 CARS 신호가 샘플에서 발생된다. 이는 분자종의 라만 변위가 약 2838.41cm^{-1} 에 해당된다. 샘플에서 발생된 CARS 신호는 같은 경로를 거쳐 descanned되어 LPF에서 반사되어 원래 파장과 분리되어 빔 분할기에 의해 reference arm에서 생성된 CARS 신호와

공간적 중첩을 형성한다. Reference delay arm에 의해서 두 빛의 경로차가 같아지면 시간적 중첩이 되어 CARS 신호의 간섭현상을 일으키게 된다.[20,26] 공간적 · 시간적으로 중첩이 된 CARS 신호는 Band pass filter를 통과한 후 볼록 렌즈에 의해 Focusing되고 이를 PMT에 의해 검출된다. 이렇게 발생된 간섭신호는 앞에서 언급한 이차 하모닉 광결맞음 현미경에서 사용한 신호 처리 과정을 거쳐 간섭형 반스톡스 라만 현미경의 2-D 영상을 얻을 수 있다.

제 5 장 광결맞음 현미경을 이용해 획득한 영상

5.1 이차 하모닉 광결맞음 현미경 영상

5.1.1 BBO crystal 표면 영상 및 비선형 결정체 덩어리

본 연구에서는 시스템 구성 후 신호 획득 및 영상 구현을 위해 먼저 생물학적 시료 대신 reference단에서 이차 하모닉 신호를 만들어 줄때 사용했던 것과 같은 0.05mm 두께의 BBO 크리스탈을 가지고 시스템 최적화 및 영상 구현을 시도하였다.

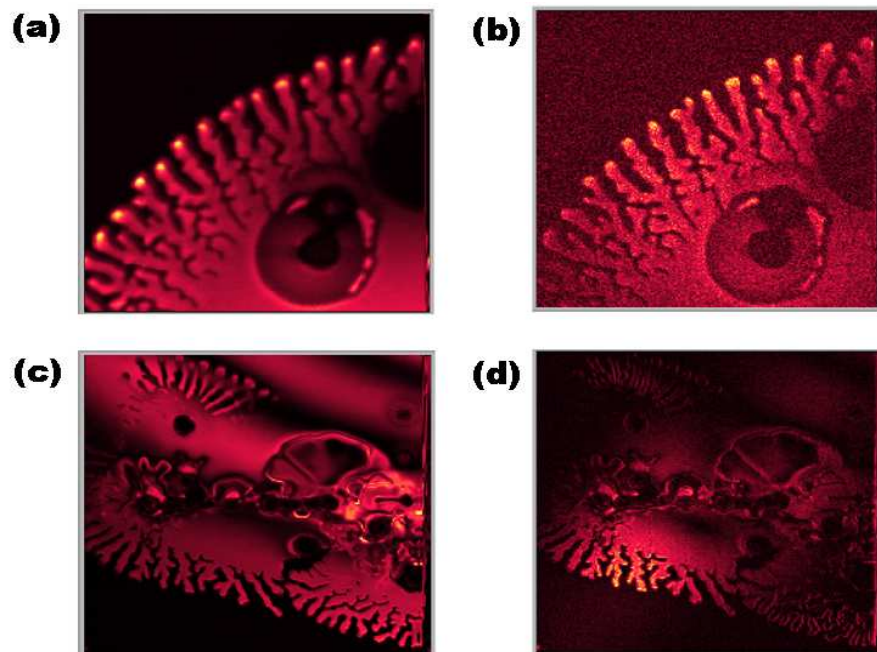


그림 5. 1 BBO 크리스탈의 현미경 영상(a),(c) 및 광결맞음 현미경 영상(b),(d)
주사 영역 : 100 μm ((a),(b)), 200 μm ((c),(d))

위 그림 5. 1에 보는바와 같이 (a), (c)는 이차 하모닉 현미경 영상이고 (c), (d)는 이차 하모닉 광결맞음 현미경 영상이다. 위 영상을 통해 확인 할 수 있듯이 이차 하모닉 현미경에서 얻은 영상을 광결맞음 현미경에서 동일하게 얻을 수 있고 광결맞음 현미경으로 얻은 영상의 대조도가 일반 이차 하모닉 현미경 영상보다 더 좋음을 확인할 수 있다.

다음으로 두 현미경의 해상도 측정을 위해 이차 하모닉 신호를 발생시키는 유리 결정체를 기계로 매우 잘게 빻아서 알약 모양의 결정체 덩어리를 만들어 이를 영상화 해보았다. 그림 5. 2는 이차 하모닉 현미경과 이차 하모닉 광결맞음 현미경을 이용해 비선형 결정체의 영상을 보여주고 있다. 정확한 영상의 해상도는 구할 수 없었지만 영상을 통해 매우 작은 알갱이까지 구별해 낼 수 있다고 본다.

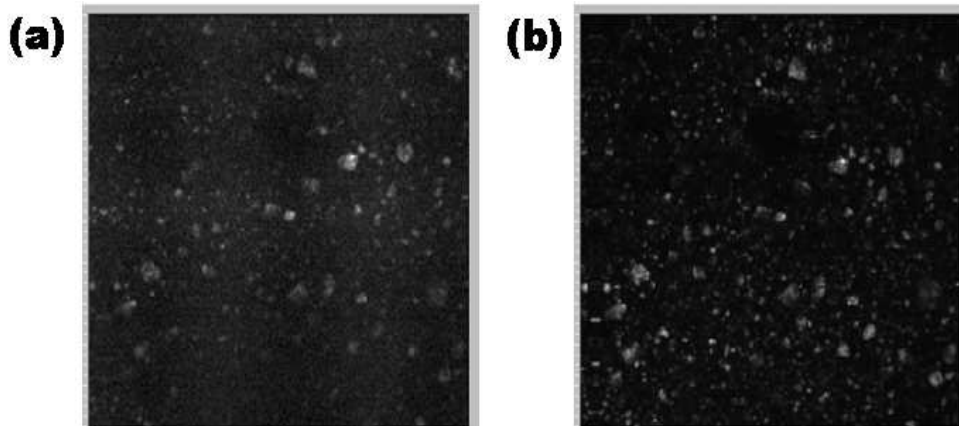


그림 5. 2 비선형 결정체 덩어리 현미경 영상(a) 및 광결맞음 현미경 영상(b)
주사 영역 : 각각 100 μ m

5.1.2 쥐꼬리 근(rat tendon) 영상

콜라겐이라는 것은 원래 피부와 힘줄, 뼈, 연골에서 연결조직을 구성하는 단백질을 지칭하는 용어이다. 콜라겐은 인간을 비롯한 동물의 체내에서 세포와 세포사이를 메우고 있는 아주 중요한 섬유상태의 경단백질(Albuminoid)이다. 세포가 다수 집합되어 있는 부위에는 반드시 콜라겐이 존재하고 있으며 특히 피부, 뼈, 연골, 혈관벽, 치아, 근육 등에는 콜라겐이 다량으로 존재하고 있다. 콜라겐들로 구성된 조직에 비정상적인 손상이 가해지면 비선형 성질이 변화하게 되고 이는 곧 이차 하모닉 신호의 변화로 반영된다. 따라서 이차 하모닉 신호의 변화를 추적하면 이와 같은 병적인 손상에 대한 추적 및 정량화가 가능해지며, 콜라겐이 풍부한 조직에 생기는 병변으로는 피부암(malignant skin cancer), 당뇨병 (diabetes), 동맥경화 등 혈관 병변, 비정상적 상처 복구 (abnormal wound healing), 연골 병변 등이 있다.

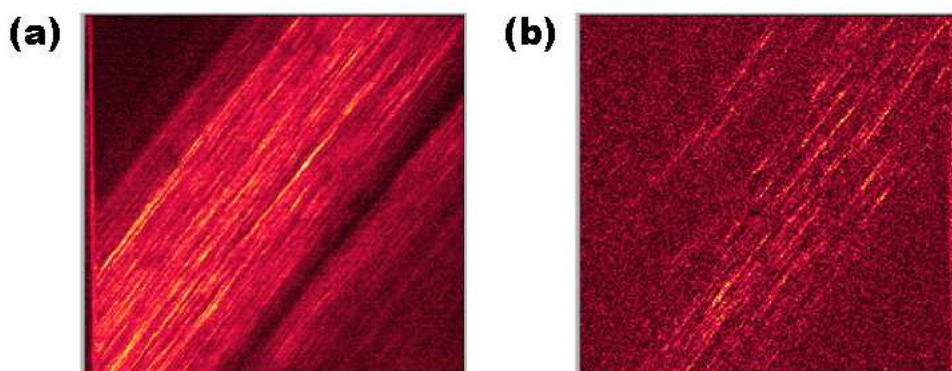


그림 5. 3 쥐꼬리(rat tendon) 현미경 영상(a) 및 광결맞음 현미경 영상(b)
주사 영역 : 각각 200 μ m

따라서 본 연구에서는 생체 조직에서 구조 선택적으로 발생하는 이차 하모닉 신호를 측정하기 위해 위 그림 5. 3과 같이 콜라겐이 풍부하게 존재하는 쥐꼬리 근(rat tendon) 영상화를 시도하였다. (a)는 이차 하모닉 현미경에서 얻은 영상으

로 쥐꼬리에 존재하는 콜라겐의 모양을 선명하게 확인할 수 있다. 하지만, 광 결맞음 현미경 영상(b)는 정확한 광경로차에 의해 생성되는 간섭신호가 매우 작아 이미지 구성에 있어 그 신호가 미약함을 볼 수가 있다. 이는 이차 하모닉 신호가 coherent process이므로 신호의 대부분이 앞으로 진행하고 순수 뒤로 되돌아오는 이차 하모닉 신호가 매우 미약하기 때문에 간섭 신호가 상대적으로 매우 작다. 반면 BBO 크리스탈에서도 비록 앞으로 진행하는 이차 하모닉 신호가 대부분이지만 표면에서 충분한 세기의 이차하모닉 신호가 발생하여 되돌아오므로 간섭에 의한 우수한 영상이 획득할 수 있었다.

5.1.3 이차 하모닉 현미경과 광결맞음 현미경 깊이정보 획득 비교

생체 시료에서의 이차 하모닉 신호를 비침습적으로 영상화함에 있어 일반 이차 하모닉 현미경은 깊이 방향에 대한 정보 획득에 있어 한계를 가지고 있다. 이를 극복하기 위해 본 연구에서 이차하모닉 광결맞음 현미경을 구성하였지만, 생체 신호에서 발생하는 이차 하모닉 신호가 매우 적어 간섭에 의해 생성되는 생체 시료의 신호만으로 영상화하기에는 위 그림 5. 3과 같이 무리가 있었다. 따라서 본 연구에서는 이차 하모닉 현미경에서 얻은 신호와 간섭에 의해 얻은 신호를 중첩시켜 광결맞음 현미경 신호를 구성한 후 영상을 얻고 이를 일반 이차 하모닉 현미경으로 얻은 영상과 깊이 별로 비교하여 깊이에 따른 이차 하모닉 신호 획득 능력을 비교하였다. 아래 그림 5. 4는 이차 하모닉 현미경(a)과 이차 하모닉 광결맞음 현미경(b)을 이용하여 쥐꼬리 근 표면에 시작하여 10 μ m씩 깊이 방향으로 이동하면서 250 μ m 두께를 영상화 하였다. 이차 하모닉 현미경을 통해 얻은 영상은 네 번째 영상을 시작으로 약 120 μ m 깊이까지의 쥐꼬리 근에 존재하는 콜라겐 섬유영상을 획득할 수 있었다. 반면에, 광결맞음 현미경을 통해 얻은 영상은 그 보다 약 50 μ m 깊은 약 170 μ m 깊이에 존재하는 콜라겐 섬유까지 영상획득이 가능했다.

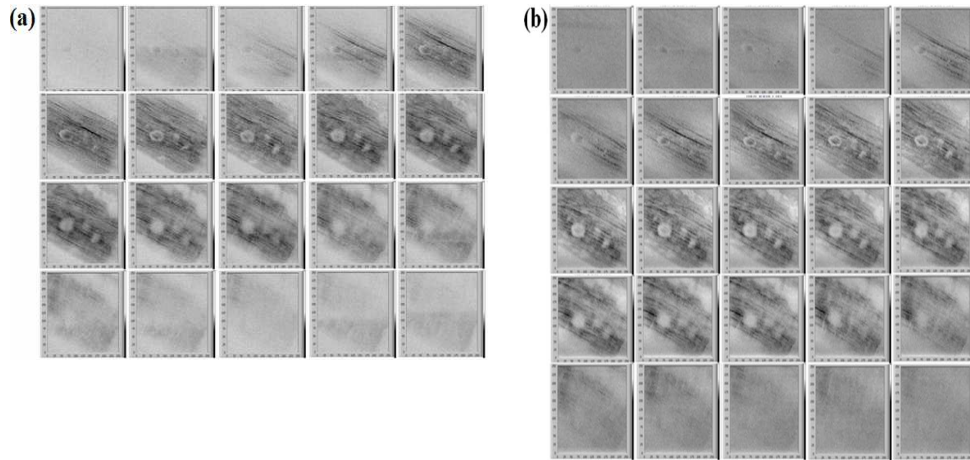


그림 5. 4 SH microscopy(a)와 SH OCM(b)의 En-face 영상 획득을 통한 깊이 비교

그림 5. 5는 깊이방향에 대한 정보 획득 능력을 좀 더 정확히 확인하기 위해 그림 5. 4에서 얻은 2D 영상을 3차원 영상을 쌓은 후 단면 영상을 나타낸 것이다. 결과적으로 이차 하모닉 광결맞음 현미경이 일반 이차 하모닉 현미경보다 깊이 방향에 대한 영상 정보가 약 42% 향상되었음을 알 수가 있다.

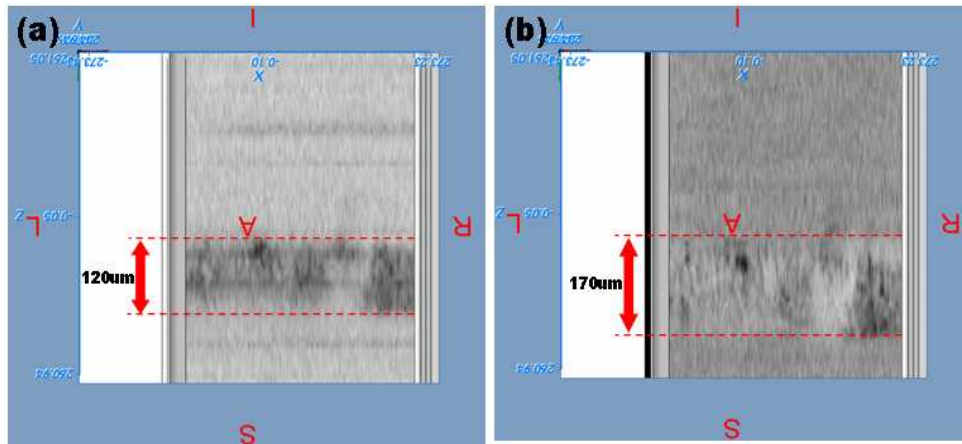


그림 5. 5 단면 영상을 통한 SH microscopy(a)와 SH OCM(b)의 깊이 비교

5.2 CARS 광결맞음 현미경 영상

5.2.1 영상 구현 프로그램 및 시스템 테스트

본 연구에서 제작한 시스템으로 CARS 영상을 얻기 위해 먼저 신호의 세기를 증가시키기 위해 거울위에 얇게 오일을 바른 다음 그 속에 수 μm 크기의 미세한 polystyrene bead를 넣고 CARS 신호를 측정하고 간섭 영상을 획득하다.

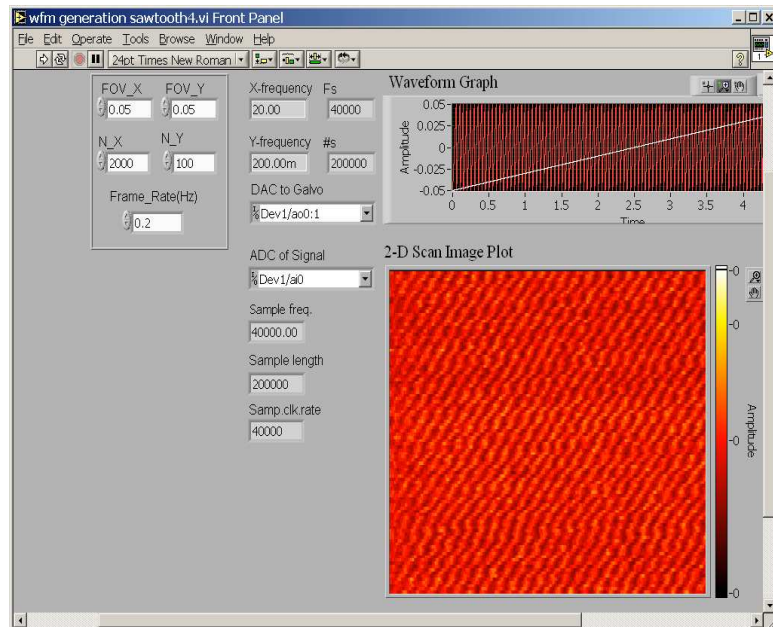


그림 5. 6 LabVIEW를 이용한 영상 구성 프로그램 및 CARS 간섭 신호

그림 5. 6는 본 연구에서 만든 LabVIEW를 이용한 영상 구현 장치이다. 이 프로그램은 2-D 영상을 측정을 위해 각각 x-y galvano mirror의 속도 및 스캔 각을 조절할 수 있도록 구성하였고 이를 영상화 하는 부분으로 나뉜다. 위 그림 5.6의 2-D Scan Image plot은 reference arm에서 phase modulation을 했을 때 한 포인트에서 나타난 간섭 신호에 대한 영상이다.

다음 그림 5. 7는 2-D scan을 통해 200X200 픽셀 크기의 영상이다. 먼저 (a)는 reference 신호가 없는 상태에서 polystyrene bead 영상을 얻고 이를 reference 신호에 의해 간섭 신호를 얻은 후 간섭 신호만을 필터링 하여 그림 5. 5 (b)와 같이 간섭 신호를 얻었다. polystyrene bead에서만 CARS 신호가 발생하기 때문에 reference의 CARS 신호에 의해 polystyrene bead에서만 간섭무늬가 확인된다.

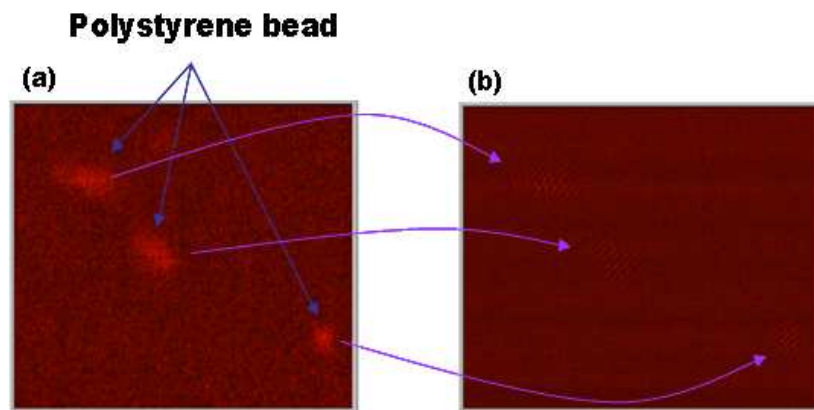


그림 5. 7 polystyrene bead 현미경 영상(a) 및 간섭 영상(b)

5.2.2 Pure Epi-CARS 간섭 영상

앞에서는 CARS 간섭 측정을 위해 거울을 사용하였다. 이는 CARS 신호가 수 μm 크기의 샘플에서는 대부분 앞으로 진행하기 때문에 거울을 사용하여 되돌아오는 신호를 키우기 위해서였다. 하지만, 근본적으로 OCM 기술을 이용하여 얻고자 하는 것은 조직과 같은 불투명 물체에서 되돌아오는 분자종의 신호의 영상화이기 때문에 일반 CARS 현미경에서 얻을 수 없는 수백 μm 깊이에서의 분자 정보를 OCM 기술을 접목하여 영상화를 시도하였다. 따라서 거울대신 cover glass 두 장을 겹쳐 그 속에 오일과 이전에 사용하였던 polystyrene bead를 넣어 이를 영상 구현하였다.

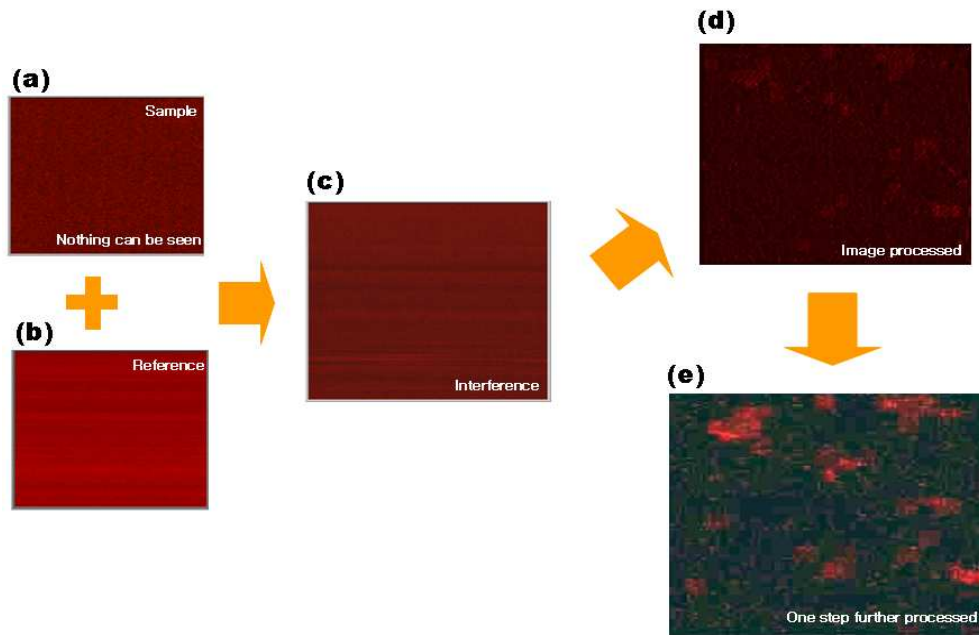


그림 5. 8 CARS OCM을 통한 이미지 구현 과정

그림 5. 8은 CARS OCM에서 영상을 구현하는 과정을 나타낸 과정이다. 그림 (a)는 간섭 신호가 없는 상태에서 x-y 스캔만으로 현미경 영상을 본 것이다. 보는 바와 같이 신호가 너무 약해 아무것도 없는 것처럼 보인다. 그림 (b)는 reference arm에서 오는 CARS 신호만을 영상화 한 것이다. 그림 (c)는 (a), (b)에서 오는 신호를 공간적 시간적으로 중첩시켜 간섭을 일으켜 잡은 신호이다. 순수 뒤로 나오는 신호이므로 신호의 세기가 매우 약해 잘 확인할 수는 없으나 polystyrene bead 위치에 간섭 모양이 생성됨을 확인할 수가 있다. 이 영상을 가지고 phase를 변화시켜 서로 빼주었더니 그림 (d)와 같이 확연히 bead 영상이 구현되었다. 이를 보기 쉽게 하기 위해 한번 더 신호처리를 통해 그림 (e)를 얻었다. CARS 신호 또한 신호 발생 방향이 거의 모두가 전방으로 진행하기 때문에 일반 현미경에서는 되돌아오는 신호를 통해 영상 구현하기가 힘들었는데 신호의 간섭 현상을 이용하였더니 pure epi CARS 신호를 확실히 얻을 수가 있었다. 이는 완벽한 CARS OCM 시스템을 만들기 위한 사전 실험으로 불투명한 물체에서 나오는 CARS 영상을 얻을 수 있다는 가능성을 확인할 수 있는 실험이었다.

제 6 장 결 론

본 논문에서는 매우 높은 침투 출력의 레이저를 이용해 생체 세포나 조직을 대상으로 한 현미경적 미세영상을 취득하고자 시료에 조사한 빛과 시료 내부 물질 간의 비선형 광학적 상호작용으로 발생된 산란광을 검출해 영상화 할 수 있는 비선형 현미경에 대한 연구를 하였다. 먼저 이차 하모닉 현미경 및 간섭성 반스톡스 라만 현미경을 자체 개발하고, 이를 광결맞음 단층촬영 기술(optical coherence tomography)과 결합하여 샘플에서 오는 산란 신호와 임의로 만들어진 reference에서 오는 비선형 신호를 시간적·공간적으로 중첩시켜 발생된 비선형 간섭신호를 영상화 하는 새로운 영상 기술인 비선형 광결맞음 현미경을 개발하였다. 저 비용으로 구성된 reference 단은 비선형 크리스탈을 이용하여 신호를 만들어 주고 이를 Piezo Electric Actuator를 이용하여 time domain 기반으로 한 광경로 차를 생성시켜 원하는 간섭 신호를 획득하였다. 하지만 time domain으로 구성된 시스템은 온도변화나 진동 등 환경요인에 의해 phase 변화에 매우 취약하여 영상 왜곡을 야기하기 때문에 기존에 연구된 방법을 응용하여 약 0.84λ 만큼의 광경로차 생성을 통해 phase 변화에 민감하지 않고 생성되는 간섭신호를 획득하였다. 얻은 신호는 컴퓨터를 통해 demodulation을 한 후 2-D 영상으로 바로 화면으로 볼 수 있도록 프로그래밍을 하였다. 이렇게 구축된 이차 하모닉 광결맞음 현미경 시스템은 20배 대물렌즈를 사용하여 약 $0.53\mu\text{m}$ 의 횡축 해상도를 얻을 수 있었다. 본 연구에서 개발된 이차 하모닉 현미경과 이차 하모닉 광결맞음 현미경으로 BBO 크리스탈 및 이차 하모닉 생성 결정 덩어리의 영상을 각각 획득하였고 이를 비교·분석 하였더니 광결맞음 현미경을 통해 얻은 영상의 대조도가 더욱 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 콜라겐이 풍부한 생물학적 시료인 쥐꼬리 근을 본 시스템을 이용하여 영상화하였고 이를 깊이별로 영상화 하여 일반 비선형 현미경과 깊이 정보 획득에 대한 영상 비교를 통해 비선형 광결맞음 현미경이 깊이에 대한 영상획득 능력이 우수함을 보였다.

또한 간섭성 반스톡스 라만 광결맞음 현미경을 통해 polystyrene bead의

pure-epi 신호를 영상화하여 샘플에서 되돌아오는 신호를 가지고 영상화가 가능하다는 것을 보였다.

하지만 아직까지 생체 세포나 조직을 대상으로 비선형 광결맞음 현미경을 이용하여 순수 간섭신호로만 영상화함에 있어 비선형 신호 발생 방향이 거의 모두가 전방으로 진행하여 뒤로 발생되어 오는 신호만으로 간섭신호를 얻기에는 신호의 세기가 매우 약해 영상화가 어려움이 있었고, 이차 하모닉 신호가 coherent process인데 높은 NA를 가진 대물렌즈를 사용하여 신호의 phase matching이 어려워 신호의 세기가 매우 작았다. 또한 샘플 단과 reference 단에서 사용된 광학 부품이 다르기 때문에 이로 인해 발생하는 광원의 분산 현상으로 공간적 중첩에서 신호의 간섭되는 부분이 극히 적어 신호의 visibility가 매우 떨어져 생체 신호에 대한 간섭 이미지가 매우 약하게 되었다고 생각한다.

차후, 비선형 신호의 발생 원리에 대한 이해를 높여 발생된 신호의 phase matching이 되도록 조절하고 검출기 앞에 핀홀을 설치하여 간섭에 영향을 주지 않는 신호를 모두 제거한 다음 정확히 중첩된 신호만을 검출하여 영상화한다면 생체 세포나 조직의 영상화가 가능할 것으로 본다.

참 고 문 헌

- [1] R. L. Sutherland, "Handbook of Nonlinear Optics", CRC 2 edition, 2003
- [2] P. Campagnola and W. A. Mohler, "Nonlinear optical spectroscopy and imaging of structural proteins in living tissues", Optics & Photonics News, 40-45, 2003
- [3] V. E. Centonze and J. G. White, "Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging", Biophys. J. **75**, 2015-2024, 1998
- [4] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", Science **248**, 73-76, 1990
- [5] Eugene Hecht, "Optics, Fourth edition," Addison Wesley, 2002
- [6] R. W. Boyd, "Nonlinear Optics", Academic Press, 1992
- [7] G.L. Richmond, "Second Harmonic Generation/Sum Frequency Generation at Surfaces", Elsevier, 1995
- [8] M. Wegener, "Extreme Nonlinear Optics: An Introduction", Springer, 2004
- [9] P. J. Campagnola et al., Biophys. J. **81**, 493-508, 2002
- [10] R. M. Williams, W. R. Zipfel and W. W. Webb, "Interpreting Second Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils", Biophys J BioFAST, 2004
- [11] Choo-Smith *et al.*, Biopolymers **67**, 1-9, 2002
- [12] E. O. Potma and X. S. Xie, "CARS Microscopy for Biology and Medicine", Optics & Photonics News, 40-45, 2004
- [13] D. Hwang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Shuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto "Optical Coherence Tomography", science **254**, pp.1178-1181, 1991
- [14] Brett E. Bouma and G. J. Tearney, "Handbook of Optical coherence tomography", Marcel Dekker, Inc., 2002

- [15] M. H. Frosz, M. Juhl, and M. H. Lang, "Optical Coherence Tomography: System Design and Noise Analysis", Ri0 National Laboratory, 2001
- [16] S. Yazdanfar, L. H. Laiho, and P. T. C. So, "Interferometric second generation microscopy", *Optics Express* **12**, 2739-2745, 2004
- [17] S. Yazdanfar, Y. Y. Chen, P. T. C. So, and L. H. Laiho, "Multifunctional Imaging of Endogenous Contrast by Simultaneous Nonlinear and Optical Coherence Microscopy of Thick Tissues", *Microscopy and Technique* **70**, 628-633, 2007
- [18] J. Su, I. V. Tomov, Y. Jiang, and Z. Chen, "High-resolution frequency-domain second-harmonic optical coherence tomography", *Applied Optics* **46**, 1770-1774, 2007
- [19] Y. Jiang, I. V. Tomov, Y. Wang, and Z. Chen, "High-resolution second-harmonic optical coherence tomography of collagen in rat-tail tendon", *Applied Physics Letters* **86**, 133901, 2005
- [20] C. Vinegoni, J. S. Bredfeldt, D. L. Marks, and S. A. Boppart, "Nonlinear optical contrast enhancement for optical coherence tomography", *Optics Express* **12**, 331-341, 2004
- [21] B. M. Hoeling, A. D. Fernandez, R. C. Haskell, E. Huang, W. R. Myers, D. C. Petersen, S. E. Ungersma, R. Wang, and Mary E. Williams, " An optical coherence microscope for 3-dimensional imaging in developmental biology", *Optics Express* **6**, 136-146, 2000
- [22] B. M. Hoeling, M. E. peter, D. C. Petersen, and R. C. Haskell, "Improved phase modulation for and *en-face* scanning three-dimensional optical coherence microscope", *Review of Scientific Instruments* **75**, 3348-3350, 2004
- [23] B. M. Hoeling, A. D. Fernandez, R. C. Haskell, and D. C. Petersen, "Phase modulation at 125kHz in a Michelson interferometer using an inexpensive piezoelectric stack driven at resonance", *Review of Scientific Instruments*

72, 1630-1633, 2001

[24] M. Minsky, "Microscopy apparatus," U.S patent 3, 013, 467, 1961

[25] C. J. R. Sheppard and D. M. Shotton, "Confocal Laser Scanning Microscopy", Springer, 1997

[26] J. S. Bredfeldt, C. Vinegoni, D. L. Marks, and S. A. Boppart, "Molecularly sensitive optical coherence tomography", Optics Letters **30**, 495-497, 2005

ABSTRACT

Development of Optical Coherence Microscopy for Nonlinear optical contrast enhancement

The objective of this study is to understand mechanism in nonlinear optical signal such as SHG and CARS while interacting between laser light and biological specimen. In this study, we propose and present new methods to achieve enhanced OCM which combines nonlinear microscopy with a low-coherence interferometry to achieve a good lateral and axial resolution.

First, SHG signals provide unique information regarding sample structure symmetry because signals strongly depend on the orientation, polarization and local symmetry properties of molecules. The lateral resolution of developed SH OCM is about $0.53\mu\text{m}$. SH OCM can not only render a 3D imaging without a pin hole but also obtain considerably deeper penetration than a conventional confocal microscopy. We obtained SH-OCM images of rat tendons and then showed that the penetration depth of the SH-OCM is significantly deep as compared to that of the SH microscope. The SH-OCM provides a powerful contrast mechanism in nonlinear optical microscopy and is a highly potential imaging tool for studying tissue physiology and monitoring collagen modification.

Second, CARS is a vibrational spectroscopy technique that has found recent application in nonlinear microscopy. The molecular selectivity of CARS has motivated its use as a molecular contrast mechanism for microscopy. Using CARS OCM, we tried to take images of polystyrene beads with pure back scattered CARS signals.