

광 산란 감소 물질을 이용한 레이저  
스펙클 영상의 대조도 개선에 관한  
연구

연세대학교 대학원

의공학과

손 태 윤

광 산란 감소 물질을 이용한 레이저  
스펙클 영상의 대조도 개선에 관한  
연구

지도 정 병 조 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의공학과

손 태 윤

손태윤의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 정 병 조 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 김 동 윤 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 신 현 출 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2008년 12월

## 감 사 의 글

드디어 오랜 석사 생활이 졸업 논문을 마지막으로 끝이 보이네요. 여러 가지 사정에 의해 졸업이 연기되면서 석사과정을 빨리 끝내야 한다는 생각과 졸업에 대한 압박감을 늘 갖고 있었는데, 막상 졸업을 하려니 조금 아쉬운 생각이 듭니다. 저에게 석사과정은 항상 배움의 연속이었던 것 같습니다. 아직 가야할 길이 멀지만 졸업을 통해 석사과정을 마무리하며 잠시 제 대학원 생활을 돌아볼까 합니다.

우선 석사과정 동안 저에게 진심어린 마음으로 많은 지도편달을 해주신 지도 교수님이신 정병조 교수님께 정말 가슴 깊이 감사의 마음을 전해 드리고 싶습니다. 또한, 바쁘신 와중에도 논문 심사에 응해주셔서 논문에 대해 많은 조언을 해주신 김동윤 교수님과 저의 연구에 부족한 부분에 대해 아낌없는 충고와 조언을 해주신 신현출 교수님께도 감사의 마음을 전해 드리고 싶습니다.

차세대 과제를 통해 항상 아낌없는 격려를 해주시는 이경중 교수님, 우리 연구실과 많은 일을 같이 하시면서 항상 웃는 얼굴로 대해주시는 이용흠 교수님, 여러 분야에서 저의 부족한 연구에 도움을 주신 권기운 교수님께도 감사의 마음을 전해 드리고 싶습니다.

학부에서 석사과정까지 수업을 지도해주신 의공학부의 윤형로 교수님, 이운선 교수님, 윤영로 교수님, 신태민 교수님, 김영호 교수님, 김법민 교수님, 김한성 교수님, 김경환 교수님, 김지현 교수님, 이상우 교수님, 임창환 교수님, 서종범 교수님, 윤대성 교수님, 임도형 교수님, 백주열 교수님께도 감사드립니다.

지난 석사과정동안 대부분의 시간을 같이 생활하며 저를 물심양면으로 도와준 의료분광시스템연구실 식구들... 광학에 대한 지식이 해박하신 용진이형, 랩 장으로 열심히 일하시는 영우형, My lovely brother 동연(희성)이형, 우리 연구실의 영원한 오락부장 진희형, 연구실 유일의 같은 원주민이자 졸업 동기(?) 연향이형, 그리고 우리 연구실 1호 졸업생 병관이형, 아직 많은 시간을 함께 하지 못했지만 이제 많은 시간을 같이 하게 될 멋진 예일이형(친하게 지내요~), 드디어 연구실에 들어

은 동기 창민이, 항상 날 괴롭히는 은지 그리고 그냥 대규(^;;)에게도 정말 정말 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

같은 연구실은 아니지만 실험실을 같이 쓰며 항상 얼굴을 보고 사는 의광학 연구실의 상원이형, 승덕이형, 현우형, 달권이형, 진우형에게도 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 특히 승덕이형..^;:

동물실험에 대해 아무것도 모르는 저에게 실험에 대해 하나 하나 알려주시고 같이 실험하면서 문제에 대해 같이 고민하고 해결해 주셔서 실험을 완성할 수 있게 해주신... 그래서 졸업이 가능하게 해주신 창용이형 정말 감사드립니다. 지루한 대학원 생활에서 가끔 저에게 일용할 양식(?)과 많은 재미거리를 주신 대곤이형에게도 진심으로 감사드립니다. 차세대 과제를 통해 지난 2년간 저에게 많은 도움을 주신 성필이 형에게도 진심으로 감사의 인사를 전하고 싶습니다. 그리고 많은 시간을 동기 없이 지낸 대학원 생활에서 유일한 나의 동기 태우... 태우야~ 고맙다!!!

마지막으로 제일 중요한... 지금까지 저를 있게 해준 아버님, 어머님 그리고 우리 형제들... 형, 누나, 동생... 사랑하는 우리 가족들에게도 정말 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 5년 동안 저의 옆을 지켜준 지희... 고마워~

앞으로 가야할 길이 많이 남아있기에 졸업이 end가 아닌 and라고 생각하며 항상 새로운 마음으로 열심히 연구하는 연구자가 되고 싶습니다.

2008년 12월  
손 태 윤 올림

# 차 례

|                                           |     |
|-------------------------------------------|-----|
| 차 례                                       | i   |
| 그림 차례                                     | ii  |
| 국문 요약                                     | iii |
| 제 1장 서 론                                  | 1   |
| 제 2장 스페클 배경 이론                            | 3   |
| 2.1. 도플러 효과(Doppler effect)               | 3   |
| 2.2. 레이저 스페클(Laser speckle)               | 5   |
| 2.3. 시변 스페클(Time-varying speckle)         | 9   |
| 2.4. 통계적 스페클 영상 분석                        | 10  |
| 2.4.1. 1차 통계(First-order statistics)      | 10  |
| 2.4.2. 2차 통계(Second-order statistics)     | 14  |
| 제 3장 시스템 및 실험                             | 18  |
| 3.1. 인공 혈류 장치                             | 18  |
| 3.2. 레이저 스페클 영상 장치                        | 19  |
| 3.3. 물리·화학적 방법                            | 20  |
| 3.3.1. 광 산란 감소 물질(Optical clearing agent) | 20  |
| 3.3.2. 미세 바늘 방법(Micro-needling method)    | 21  |
| 3.4. 실험                                   | 23  |
| 3.4.1. 광원 균일 분포 실험                        | 23  |
| 3.4.2. <i>In-vitro</i> 실험                 | 24  |
| 3.4.3. <i>In-vivo</i> 실험                  | 24  |
| 3.5. 영상 분석                                | 26  |
| 제 4장 결 과                                  | 29  |
| 4.1. 광원 균일 분포 실험                          | 29  |
| 4.2. <i>In-vitro</i> 실험                   | 31  |
| 4.3. <i>In-vivo</i> 실험                    | 35  |
| 제 5장 고 찰                                  | 41  |
| 제 6장 결 론                                  | 44  |
| 부 록                                       | 45  |
| 참고 문헌                                     | 47  |
| 영문 요약                                     | 53  |

## 그림 차례

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 그림 1. 레이저 스펙클 무늬 . . . . .                                                                                                                                                       | 5  |
| 그림 2. 원거리 스펙클 . . . . .                                                                                                                                                          | 6  |
| 그림 3. 영상 스펙클 . . . . .                                                                                                                                                           | 7  |
| 그림 4. 연동 펌프 . . . . .                                                                                                                                                            | 18 |
| 그림 5. 레이저 스펙클 영상 장치 . . . . .                                                                                                                                                    | 19 |
| 그림 6. 미세바늘 롤러 . . . . .                                                                                                                                                          | 22 |
| 그림 7. 홀로그래피 확산기 . . . . .                                                                                                                                                        | 24 |
| 그림 8. 스펙클 대조도와 상관시간·노출시간의 비에 따른 그래프 . . . . .                                                                                                                                    | 28 |
| 그림 9. 광원 분포 비교 영상. (a) 광원, (b) 확산기 통과 광원 . . . . .                                                                                                                               | 29 |
| 그림 10. 광원 분포 비교 그래프. (a) 광원, (b) 확산기 통과 광원 . . . . .                                                                                                                             | 30 |
| 그림 11. <i>In-vitro</i> 레이저 스펙클 원 영상. (a) 튜빙 영상,<br>(b) 튜빙+샘플 영상, (c) 글리세롤 도포 60분 후 영상 . . . . .                                                                                  | 31 |
| 그림 12. <i>In-vitro</i> color 영상. (a) 튜빙 영상, (b) 튜빙+샘플 영상,<br>(c) 글리세롤 도포 60분 후 영상 . . . . .                                                                                      | 32 |
| 그림 13. <i>In-vitro</i> 레이저 스펙클 대조도 영상. (a)와(b) 튜빙 영상, (c)와(d)<br>튜빙+샘플 영상, (e)와 (f) 글리세롤 도포 60분 후 영상.<br>영상 (a),(c),(e): 식염수 속도 0RPM,<br>영상 (b),(d),(e): 식염수 속도 150RPM . . . . . | 34 |
| 그림 14. <i>In-vivo</i> 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 1. 글리세롤<br>도포 전(a) 과 도포 후(b) 원 영상, 글리세롤 도포 전(c) 과 도포<br>후 (d) 대조도 영상 . . . . .                                                       | 35 |
| 그림 15. <i>In-vivo</i> 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 2. 글리세롤<br>도포 전(a) 과 도포 후(b) 원 영상, 글리세롤 도포 전(c) 과 도포<br>후 (d) 대조도 영상 . . . . .                                                       | 36 |
| 그림 16. <i>In-vivo</i> 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 3. 글리세롤<br>도포 전(a) 과 도포 후(b) 원 영상, 글리세롤 도포 전(c) 과 도포<br>후 (d) 대조도 영상, 글리세롤 도포 전(e) 과 도포 후(f) 대조도<br>향상 영상 . . . . .                  | 38 |
| 그림 17. <i>In-vivo</i> 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 4. 글리세롤<br>도포 전(a) 과 도포 후 (c, e) 원 영상, 글리세롤 도포 전(b) 과<br>도포 후(d, f) 대조도 영상 . . . . .                                                 | 40 |

## 국 문 요 약

### 광 산란 감소 물질을 이용한 레이저 스펙클 영상의 대조도 개선에 관한 연구

레이저 스펙클 영상 기법은 전 영역, 실시간, 비접촉, 비침습적, 사용의 용이성으로 인해 혈류를 측정하는데 많이 사용되고 있다. 그러나 레이저 스펙클 영상은 낮은 관류 영상 대조도로 인해 피하 심부의 혈류 측정에 제약이 있다. 그동안 많은 연구에서 관류 영상 대조를 향상시키기 위해 많은 방법들이 제시되었다. 이러한 방법들은 영상의 대조도 향상에 어느 정도 효과를 보였지만 근본적인 해결책이 되지 못했다. 레이저 스펙클 영상의 관류 영상 대조도가 낮은 근본적인 원인은 생체 조직에서 발생하는 산란효과로 인한 레이저의 낮은 투과 깊이에서 기인하기 때문이다. 본 연구는 생체 조직에서 일어나는 산란을 최소화하여 레이저의 투과 깊이를 증가시킴으로써 레이저 스펙클 영상 장치의 관류 영상 대조도를 향상시키는 방법을 제시하였다. 레이저의 투과 깊이를 증가시키기 위하여 물리·화학적 방법이 사용되었다. 생체 조직의 산란을 최소화하기 위하여 광 산란 감소 물질이 피부에 국소적으로 적용되었고, 피부에 대한 광 산란 감소 물질의 경피 침투 시간을 단축시키기 위하여 미세바늘 방법이 함께 사용되었다. 광 산란 감소 물질과 미세바늘 방법의 사용으로 인한 레이저 스펙클 피부 영상의 관류 대조도 향상 효과를 확인하기 위하여 *in-vitro*와 *in-vivo* 실험을 진행하였고, 실험 결과 레이저 스펙클 영상의 관류 대조도가 향상되는 것을 확인하였다.

---

핵심되는 말 : 레이저 스펙클 영상, 대조도 향상, 관류 영상, 광 산란 감소, 미세바늘



# 제 1 장 서 론

레이저 스페클은 결 맞은 빛(coherent light)이 물체의 거친 표면(레이저의 파장과 비교하여 충분히 거친)으로 인해 산란될 때 발생하는 임의간섭무늬(random interference pattern)이다. 스페클이 처음 발견되었을 때, 레이저를 사용하는 장비의 분해능(resolution)을 제한하기 때문에 스페클을 제거하거나 개선하기 위한 기술들이 연구 되었다. 하지만, 오래 지나지 않아 레이저 스페클을 응용한 기술들이 연구되기 시작하였다. 레이저 스페클을 응용한 기술은 입자의 움직임을 관측하기 위한 시변 스페클 무늬(time-varying speckle pattern)응용 기법으로 발전 하였다.[1,2] 인체에서 적혈구와 같은 움직이는 입자들에 레이저가 조사되면, 간섭무늬가 시간에 따라 변하게 되고, 스페클이라는 빛 세기의 변동(light intensity fluctuation)을 야기 한다. 스페클 현상은 임의 현상이므로, 이를 이용하여 움직이는 적혈구 입자들의 속도를 알아내기 위해 스페클 무늬는 통계적으로 분석될 수 있다. Stern이 피하의 혈류를 측정하기 위해 스페클 현상을 이용한 이래, 레이저 도플러 속도 측정(Laser Doppler flowmetry), 레이저 도플러 영상(Laser Doppler imaging), 레이저 스페클 영상(Laser speckle imaging)과 같은 많은 방법들이 조직 내 혈관에서 혈류를 측정하기 위해 연구 되어왔다.[1,2] 레이저 도플러 속도 측정과 레이저 도플러 영상 기법은 점 측정(point measurement)과 2차원 영상 획득을 위한 주사(scan)방식으로 인해 낮은 영상 대조도의 단점을 갖고 있다. 레이저 스페클 영상은 이런 단점을 보완하며, 전 영역 측정(full field measurement), 실시간(real time), 비접촉(non-contact), 비침습적(non-invasive), 사용의 용이성(easy to use)의 장점이 있다. 지금까지 레이저 스페클 영상은 망막, 쥐의 뇌, 사람 손의 모세혈관에서 혈류량 등과 같은 생물학적 조직에서 혈류의 2차원 혈관 지도를 제시하는데 사용되어 왔다.[5-7]

하지만 레이저 스페클 영상은 관류 영상(perfusion image) 획득 시 영상의 낮은 대조도(low contrast)로 인해, 피하 심부의 혈류를 측정하는데 많은 제약을 갖고 있다. 그동안 많은 연구를 통하여 관류 영상 대조도 향상을 위해 광학적, 영상

처리적 방법들이 시도되어 왔다.[8-12] 이러한 방법들은 영상 대조도 향상에 어느 정도 효과를 보였으나 레이저 스펙클 영상은 여전히 피하 혈류 측정에 낮은 영상 대조도의 문제를 나타내었다. 스펙클 영상의 낮은 대조도의 근본적인 문제는 레이저의 생체 조사 시에 조직을 구성하는 여러 물질에 의한 산란효과로 인해 레이저가 조직의 심부까지 도달하지 못하는 낮은 투과 깊이에서 기인하기 때문이다.

본 연구는 생체 조직의 광학 계수를 최소화 하여 레이저 스펙클 영상의 관류 영상 대조도를 향상하는 방법을 제시하였다. 광 산란 감소 물질 (Optical Clearing agent - 본 연구에 사용된 광 산란 감소 물질은 글리세롤)이 조직의 광 산란 계수를 최소화하여 레이저의 투과 깊이를 증가 시키는데 사용 되었다. 또한, 국소 적용된 글리세롤의 생체 조직에 대한 경피 침투 시간을 최소화하고 투과율을 증가시키기 위해 미세바늘(micro-needle) 방법이 함께 사용되었다.

## 제 2 장 스펙클 배경 이론

### 2.1 도플러 효과(Doppler effect)

도플러 효과는 19세기 중반에 알려졌다. 도플러 효과란 “파동의 근원과 관찰자 사이에 상대적인 움직임이 있다면 파동의 파장이 변한다”는 이론이다. 이 파장의 변화가 근원과 관찰자의 상대 속도에 의해 결정됨에 따라 도플러 효과를 이용하여 근원과 관찰자 사이의 속도 측정이 가능하다. 도플러 효과는 파동의 근원과 검출기 사이에 상호 움직임이 있을 때 발생하는 주파수의 변화를 뜻한다. 도플러 효과는 근원으로부터 방출된 파동이 압축되거나(근원과 검출기가 같은 방향으로 움직일 때) 혹은, 퍼질 때(근원과 검출기가 다른 방향으로 움직일 때) 발생한다. 일상에서 쉽게 접할 수 있는 예로 앰블런스의 사이렌 소리가 있다.

도플러 효과는 빛에서도 발생한다. 빛 광원이나 물체에 반사나 산란된 빛의 운동은 도플러 효과에 의해 빛 주파수 변화를 야기한다. 이 주파수 변화의 측정은 물체의 속도를 측정할 수 있는 방법을 제공한다. 그러나 빛에서 발생하는 도플러 효과를 사용하는 데는 문제가 있다. 빛 파동의 주파수는 매우 높고, 직접 측정이 매우 어렵다. 이 문제는 ‘맥놀이 현상’(beat phenomenon)을 이용하여 해결 가능하다. 맥놀이 현상은 주파수가 서로 다른 두 파장의 파동이 중첩될 때 발생하는 효과로, 두 파동의 위상이 같거나 달라짐에 따라 파동이 가해지거나 감해지는 것을 뜻한다. 이 현상을 이용하여 두 파동의 주파수 차이를 검출할 수 있다.

도플러 편이된 파동(Doppler-shifted wave)과 초기 주파수의 참조 파동(reference wave of the original frequency)을 혼성시키면 맥놀이 주파수를 발생시킬 수 있다. 맥놀이 주파수가 두 주파수(참조 파동과 편이된 파동의 주파수) 사이의 차이와 같으므로 맥놀이 주파수는 도플러 효과에 의해 야기된 주파수 편이와 정확히 일치하게 된다.

주파수 변화와 근원과 검출기 사이의 상대 속도 변화의 관계는 다음과 같은 식으로 정리할 수 있다.

$$f' - f = \frac{v}{c-v}f \quad \text{식. 1}$$

$f$ 는 빛의 초기 주파수,  $f'$ 은 편이된 주파수,  $v$ 는 근원과 검출기 사이의 상대 속도,  $c$ 는 파동의 속도이다. 빛의 파동 경우에는 빛의 속도  $c$ 가 항상 식. 1에서 측정된 속도 보다 크다. 따라서 식. 1은 다음과 같이 정리 될 수 있다.

$$f' - f = \frac{v}{c}f \quad \text{식. 2}$$

그러므로 주파수 편이와 그에 따라 도플러 편이된 빛이 초기 주파수의 참조 빛과 혼성되었을 때, 발생하는 맥놀이 주파수는 측정된 속도와 비례하게 된다. 따라서, 속도 측정은 초기 주파수와 빛의 속도를 알고 있으면 가능하다.

위 이론을 바탕으로 레이저는 발명되어 오래 지나지 않아 도플러 기술이 적용되었다. 레이저 도플러를 이용하여 혈류를 측정하는 기법은 1970년대부터 연구되어왔고, 현재 병원에서 혈류 측정을 위해 많이 쓰이는 진단 도구이다. 레이저 도플러 기법이 다른 기법에 비해 갖는 장점은 비접촉 그리고 비침습적 방식이라는 것이다.[1]

## 2.2 레이저 스페클(Laser speckle)

1960년대 초 레이저가 발명된 후로, 레이저는 많은 분야에 걸쳐 사용되어 왔다. 레이저 빛이 종이나 가공되지 않은 금속 혹은 유리의 표면과 같이 거친 표면에 조사되었을 때, 표면에서 높은 대조도의 초점을 맞추기 어려운 난알모양의 무늬를 관찰할 수 있다. 처음에 이 현상을 난알 모양(granularity)이라 하였다.[13] 오래 지나지 않아, 이 난알 모양은 스페클이라는 이름으로 널리 알려지게 되었다. 그림 1은 전형적인 레이저 스페클 무늬를 잘 보여주고 있다.

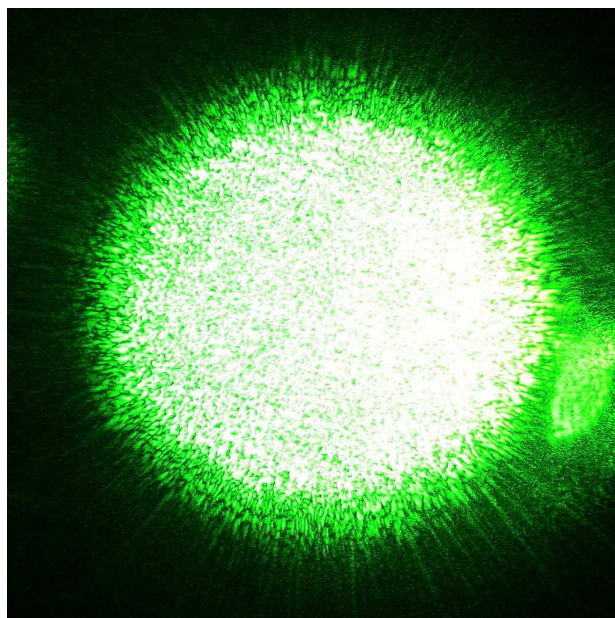


그림 1. 레이저 스페클 무늬

(출처, '[http://en.wikipedia.org/wiki/Speckle\\_pattern](http://en.wikipedia.org/wiki/Speckle_pattern)')

레이저 사용 초기에 스페클은 쓸모없는 것으로 여겨졌다. 영상분야 같은 경우 스페클은(예를 들어 홀로그래피) 분해능에 상당한 영향을 미쳤다. 그렇기 때문에 영상에서 레이저에 의해 파생된 스페클을 제거하기 위해 많은 연구들이 진행되었

다. 하지만 오래지 않아 스페클은 실제 응용을 위해 연구되고 발전되었다.[2]

레이저 광선을 어떤 물체의 표면에 조사하고, 조금 떨어진 거리에서 스크린에 비치는 산란된 빛을 보면 스페클 무늬를 관찰 할 수 있다. 이런 형태의 스페클 무늬를 원거리 스페클(far-field speckle)이라고 한다.(그림 2)[1] 또한, 레이저를 어떤 물체의 표면에 조사하였을 때 조사 표면에서 관찰되는 스페클을 영상 스페클(image speckle)이라 한다.(그림 3)[1]

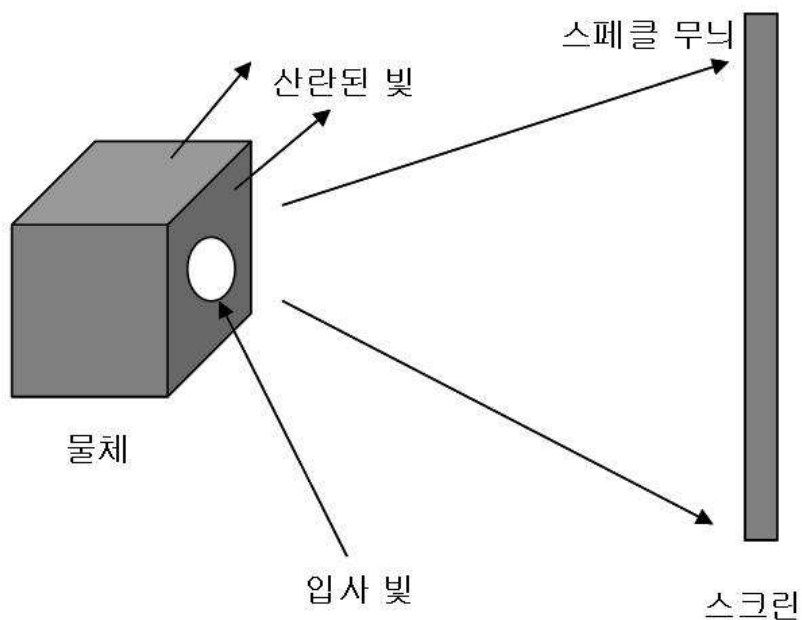


그림 2. 원거리 스페클

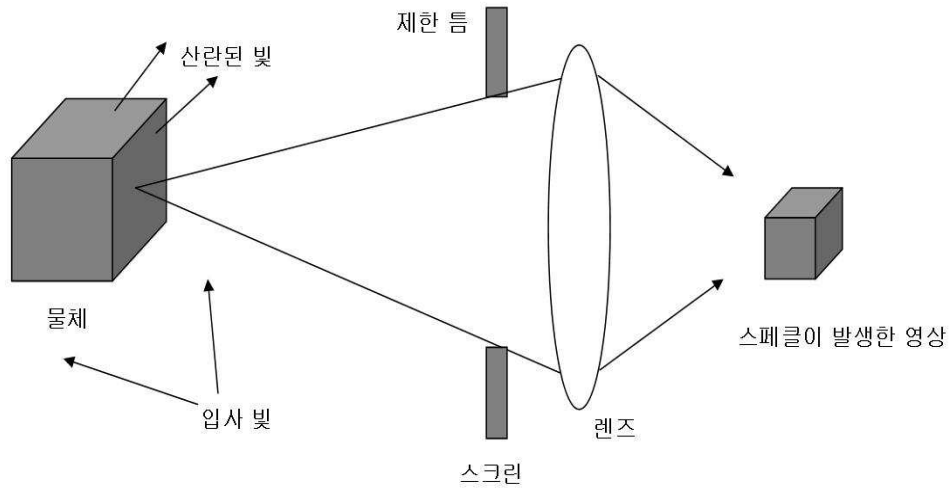


그림 3. 영상 스펙클

먼저 영상 스펙클에 대한 설명이다. 만약 조사된 표면이 거칠다면(표면 높이의 변화가 빛 주파수보다 크다), 해상도 셀(광학 장비에 의해 영상화되어 해상되는 영역) 범위 안에서 표면의 다른 부분으로부터 도달한 빛은 각기 다른 광학 경로거리(optical pathlength)를 가로질러 영상면에 도달하게 된다. 관찰자가 레이저가 조사된 표면을 관찰하는 경우 해상도 셀은 눈의 해상도 제한이 되고, 영상면은 망막이 된다. 영상에서 한 지점의 결과 세기(resulting intensity)는 그 지점에 도착하는 파동 진폭의 대수적인 합에 의해 결정된다. 만약, 한 지점에서 모든 파동이 상쇄되어 결과 세기가 영이면 어두운 스펙클(dark speckle)이 보이고, 위상이 같은 파동들이 스크린에 도착을 하면 세기는 최대값을 나타내게 된다. 원거리 스펙클의 경우 조사 영역의 모든 지점으로 부터 온 빛이 관찰 스크린의 모든 지점에서 발생한 스펙클 세기에 영향을 미치게 된다.

레이저 스펙클은 임의 현상(random phenomenon)이고, 통계적으로만 기술이 가능하다.[14] 레이저 스펙클을 분석하기 위한 통계적 방법은 크게 1차 통계, 2차 통계로 나뉘고, 측정 및 분석영역 방식에 따라 시간적(temporal-점 측정 및 시간영역 분석), 공간적(spatial-전 영역 측정 및 공간영역 분석)방법으로 나뉘고, 분석

대상에 따라 시간 적분(time-integrated-빛의 세기 분석), 시간 미분(time-differentiated-빛의 주파수 분석)방법이 있다. 이중 가장 많이 사용되는 방법은 1차 시간 적분(first order time-integrated) 방법이다. 이 방법은 스페클 무늬를 빛의 대조도(contrast)로 나타낸다. 스페클 무늬를 발생시키기 위한 이상적인 조건을 가정해보자. 단일 주파수 레이저 빛과 표면 높이의 변화가 가우스 분포(gaussian distribution)를 갖는 완전 확산 표면이다. 이것은 스페클 무늬 세기 변화의 표준편차 (standard deviation of intensity variation)와 평균 세기 (mean intensity)가 같다는 것을 의미한다. 일반적으로 스페클 무늬는 평균 세기보다 낮은 표준 편차 값을 갖고, 이것은 스페클 무늬 대조도의 감소로 관찰된다. 스페클 대조도(speckle contrast)는 표준 편차와 평균 세기의 비율로 정의된다.

$$\text{스페클 대조도, } C = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} \leq 1 \quad \text{식. 3}$$

스페클 무늬 한 개의 크기는 스페클 무늬를 발생시키는 거친 표면의 구조와 아무 관련이 없다. 스페클 무늬 한 개의 크기는 스페클 무늬를 관찰하기 위해 사용되는 광학계의 구경(aperture-영상 스페클)이나 조사 영역(원거리 스페클)에 의해 결정된다. 스페클 무늬 영상화를 위해 카메라가 사용된다면, 구경조리개(aperture stop)가 스페클 크기를 결정하게 된다. 만약 구경조리개를 통해 영상의 노출을 조정하고 싶다면 위의 사실은 중요한 의미를 갖게 된다.

레이저 스페클 기법은 거리(displacement), 뒤틀림(distortion), 변형(strain)의 측정 및 표면 거칠기 평가(surface roughness assessment) 그리고 속도 측정(velocity measurement)과 같은 광학 계측 기술의 다양한 분야에 사용된다. 이런 적용은 의공학 분야에 있어서도 해당된다.[1]



## 2.3 시변 스페클(Time-varying speckle)

레이저가 조사된 물체가 움직이게 되면 스페클 무늬도 움직이게 된다. 레이저가 조사된 물체의 움직임이 작으면 움직이는 스페클 무늬와 서로 상관관계에 있게 된다. 또한, 큰 움직임에서는 서로 비상관관계에 있게 되고, 스페클 무늬는 변하게 된다. 비상관관계 역시 빛이 많은 수의 각각 움직이는 산란 물질(예를 들어 유체에서 입자)로부터 산란될 때 발생한다. 레이저가 조사된 물체가 움직이면서 스페클 무늬가 시간에 따라 임의로 변하게 되는 현상은 물체의 점과 눈의 망막사이 경로가 끊임없이 변하기 때문이다. 그리고 스페클 무늬가 변하는 것은 그 점에서 보여 지는 결과 세기이다. 이것으로 미루어 볼 때 스페클 무늬 변동의 1차 시간적 통계가 공간적 통계와 같아야한다는 것을 생각할 수 있다. 이 현상은 이상적인 환경에서 발생 가능하다. 그러나 스페클 무늬가 움직이거나 정지하고 있는 산란물질의 혼합에 의해 발생되거나 혹은, 속도가 변하는 산란물질에 의해 발생되면 더 이상 이상적인 상황이 아니다. 사실, 스페클 세기 변동의 변조도(depth of modulation)는 얼마나 많은 빛이 움직이는 산란자로부터 혹은 정지되어 있는 산란자로부터 산란되었는지 대한 어떠한 지표를 제시 할 수 있다. 이것은 어떠한 경우에서 움직임 내에 산란자들의 비율이 어떻게 되는지 알 수 있는데 사용 된다. 또한, 이것은 2차 통계(변동의 주파수 스펙트럼)가 움직임의 속도에 의존한다는 것을 가정할 수 있게 한다. 그러므로 스페클 변동의 시간적 통계를 연구함으로써 물체의 움직임에 대한 정보를 획득하는 것은 가능한 것으로 보인다. 이것은 시변 스페클 분석의 기본이다.[1]

시변 스페클은 레이저 빛이 생물학적 샘플에 조사될 때 흔히 관찰 된다. 기존 문헌에 보고된 샘플의 종류로는 다양한 식물들이 있고, 이 현상은 식물 내 유체의 흐름이나 혹은 식물의 세포안의 입자의 움직임에 기인한 것이다.[15-18] 시변 스페클 기법(1975년 Stern에 의해 처음으로 인식된)의 가장 중요한 적용 가능 분야 중 하나는 혈액의 흐름에 의해 스페클 변동이 발생될 때이다.[3]

## 2.4 통계적 스페클 영상 분석

위에서 언급했듯이 레이저 스페클은 임의 현상이고, 오로지 통계적으로만 기술이 가능하다. 스페클 무늬의 통계는 크게 1차 통계와 2차 통계로 나누어진다. 1차 통계는 스페클 무늬에서 점의 특성을 기술한다. 1차 통계에서는 스페클 무늬의 각기 다른 점에서 점으로 빛 세기 사이의 관계에 대하여 고려하지 않는다. 또한, 1차 통계는 빛의 세기를 스페클 대조로 나타내 기술한다.

2차 통계는 스페클 무늬에서 점에서 점으로 빛 세기의 변화가 얼마나 빠르게 이루어지는가를 기술한다. 그러므로 2차 통계에서는 무늬에서 스페클의 크기나 스페클 분포에 대한 지표를 제공한다. 스페클 무늬의 2차 통계를 나타내기 위해 흔히 사용되는 함수는 세기의 자기상관 함수(autocorrelation function of intensity)와 이것의 푸리에 변환(Fourier transform)인 파워 스펙트럼(power spectrum)이다.

### 2.4.1 1차 통계(First-order statistics)

스페클 변동의 1차 통계는 시변 신호의 변조도(표준편차)로 나타낼 수 있다. 이것은 움직이거나 정지하고 있는 산란자의 상대적 수에 대한 정보를 제공하는데 사용된다.[19] 그러나 이 기법은 많은 다른 요소들의 영향으로 인해 절대값 측정보다는 상대값 측정에 더욱 유용하다.

Fercher는 움직이는 물체의 속도 측정을 위해 처음으로 시간 미분 스페클의 1차 통계(first-order statistics of time-differentiated speckle)사용의 장점을 인식하였다.[20] 후에 이와 비슷한 접근이 Fujii에 의해 이루어졌다. Fujii는 변동하는 스페클의 완전한 자기상관 함수의 측정을 위한 대안으로 연속적인 주사(scanning)를 통해 개별 스페클 세기의 차이를 측정하였다.[21] Fujii et al에서 인체의 특정 영역에 혈류를 관찰할 목적으로, 선형 CCD 배열을 사용하여 스페클 선을 동시에 측정하였다. 그리고 2차원 영역 정보 획득을 위해 주사 거울을 사용하였다. 후

에 이 기법을 망막의 혈류를 관찰하는데 적용하였다. 다이오드 레이저로부터 발생한 빛을 망막에 조사하고, 이를 주사하여 스펙클 영상을 저장한다. 저장한 연속적인 영상들 사이의 빛 세기 차이를 계산하여 망막의 미세순환 지도를 제시하였다. 실험에서 평균 세기와 세기 차이의 비율(평균화된 흐림(normalized blur))이 속도 측정의 지표로 사용되었다. 토끼 눈에 실시된 실험 결과는 침습적인 방법으로 얻은 결과와 좋은 상관관계를 나타내었다. 이로 미루어 볼 때, 자기상관 함수(autocorrelation function)의 계산 없이 연속적인 시간에 개별 스펙클 세기의 차이를 측정하는 것으로 스펙클의 비상관관계 측정이 가능한 것으로 보인다. 이것은 효과적으로 세기 변동의 2차 통계(Second-order statistics of the intensity fluctuations) 측정을 시간 미분된 스펙클의 1차 통계(First-order statistics of time-differentiated speckle)로 대체 할 수 있다는 것을 뜻한다.

또한, 시간 미분된 스펙클은 Ruth에 의해 피부의 혈류를 측정하기 위해 사용되었다. Ruth는 속도가 변동의 평균 주파수와 비례하고, 이것은 결국 시간 미분된 빛 세기의 제곱평균(root mean square)에 비례한다는 결과를 도출하였다.[22,23] Ruth는 모세혈관의 평균 혈류가 빛 세기의 미분과 관련된 어떤 값과 비례한다는 오래된 이론과 검출된 신호는 두 개의 변동하는 스펙클 무늬( 그 자체로 강제 움직임(involuntary movements)에 종속될 수 있고, 하나는 움직이는 혈액에서 발생한 것이고 다른 하나는 피부로부터 발생한 것)의 중첩이라는 두 가지 생각을 결합하여 연구하였다.[24] 이 이론을 바탕으로 인체의 많은 부위에서 피부 혈류 측정을 하였다. 최근에 Ruth는 피부 혈류의 역학(Dynamics)에 대해 연구를 확장하였고, 말초 동맥 폐색 질병(peripheral arterial occlusive disease, PAOD), 당뇨를 앓고 있는 환자 그리고 흡연자를 대상으로 연구를 진행하고 있다.[25,26]

또한, 미생물 배양의 운동성을 관찰하기 위해 Zheng et al에서 시간 미분된 스펙클이 사용되었다. 이 연구에서 필요로 하는 결과를 얻기 위해 스펙클 영상의 연속적인 프레임을 빼는(subtract) 방법으로 배양의 차이를 확인하였다.[27]

시간 적분된 스펙클의 시간적 통계(temporal statistics of time-integrated speckle)에서 만약 검출기의 적분 시간이 대부분의 빠른 세기 변동을 분석하기에 충분히 길다고 한다면, 어떠한 시간의 평균이 발생하고 이때 측정된 것을 “시간

적분(time-integrated) 스펙클 무늬”라고 한다. 적분 시간은 추가적인 자유도(degree of freedom)로 사용될 수 있다. 예를 들어, 표준 편차와 평균 세기의 비율을 나타내는 시간 적분된 스펙클의 1차 시간적 통계(first-order temporal statistics)는 적분 시간과 산란자의 속도에 의존한다. 이런 통계는 확산 물체의 속도를 측정하는데 사용될 수 있다.[28]

시변 스펙클의 시간적 통계(temporal statistics)방법 사용의 문제점은 스펙클 무늬를 오로지 한 점에서만(단일 스펙클) 측정하는 것이다. 영역의 정보를 획득하기 위해 속도 분포의 지도가 필요하다면 검출기로 해당 영역을 주사(scanning)해야만 한다. 주사 방법은 레이저 도플러 기법과 현재 출시된 인체의 넓은 부위에 걸쳐 모세혈관 혈류의 전 영역 모니터링을 제공하는 상업적 주사 도플러 장치에도 적용되었다.

속도의 분포를 지도화하기 위해 시변 영역 스펙클 기법에 필요한 주사방식은 많은 양의 데이터를 수집하고, 보통 상당한 시간이 소요된다. 이상적으로 전 영역 기법을 사용하게 되면 관심 영역을 주사할 필요가 없다. 이런 기법 중 하나가 “글로벌 도플러(global Doppler)”이다. 이 기법은 흡수/주파수 특성이 알려진 물질을 이용하여 되돌아온 빛이 얼마나 많이 흡수되는지 측정하는 장비를 통해 속도를 직접 세기로 변환한다. 하지만 분해능(resolution) 문제로 인해 매우 높은 속도 측정에 제한이 있으며, 이 방법은 의공학적 적용(biomedical application)에 적합하지 않다.

다음으로 시간 적분된 스펙클 무늬의 1차 공간적 통계(first-order spatial statistics of time-integrated speckle patterns)에 대해 논의 한다. 시간 적분된 스펙클 무늬의 1차 공간적 통계는 단일 노출 스펙클 영상촬영(single-exposure speckle photography)의 기본 이론이다.[29] 이것은 점차 흐름을 시각화하는 방법으로 특히 비접촉, 실시간 기법으로 발전하였다. 시간 적분된 스펙클 무늬의 1차 공간적 통계는 레이저 도플러 속도 측정의 보완 기술로 간주되고 있다. 레이저 도플러 속도측정(laser Doppler velocimetry)은 측정이 더 정확하지만 점 측정 방식이다. 반면에 단일 노출 스펙클 영상촬영은 비록 정확도가 조금 낮지만 흐름의 전체적 영상을 제공하는 전 영역 측정 방식이다. 현재까지 발표된 기술 중 레이

저 스펙클 대조도 분석 기법은 유일하게 주사가 필요하지 않은 전 영역 기법이다. 또한, 이것은 흐름의 절대값보다 상대값을 측정하고, 흐름의 문제가 있는 영역을 나타낼 때에 유용하게 사용된다.

만약 시간 적분 스펙클 무늬의 적분 시간이 스펙클 변동의 주기와 비교할 만하다면 이 효과는 기록된 스펙클 무늬의 흐림(blurring)이 될 것이다(스펙클 대조도의 감소). 처음에 단일 노출 스펙클 영상촬영은 망막의 혈류를 측정하기 위해 개발 되었다.[30,31] 기본 기법은 간단하게 세기 변동의 비상관관계 시간(decorrelation time)과 같은 차수(same order)의 노출 시간을 이용하여 레이저를 조사하고, 망막을 촬영하는 것이다. 매우 낮은 조사 시간은 스펙클을 감지 할 수 없게(freeze)하며 높은 대조도의 스펙클 무늬를 야기하고, 긴 노출 시간은 스펙클 현상을 평균에 이르게(average out) 하고 낮은 대조도를 야기한다. 일반적으로 시야(field of view)에서 속도 분포는 스펙클 대조도의 변화로 나타내어진다. 결과 영상의 고역 광학 공간 필터(high-pass optical spatial filtering)통과는 이런 대조도 변화를 조금 더 보기 쉬운 세기 변화로 변환한다.[32] 스펙클 영상의 디지털 영상 처리와 같이 후에 진행된 연구는 속도를 색으로 나타내는 연구를 포함하고 있다.[33,34] 최근 피부의 모세혈관 혈류 흐름의 지도는 완전 디지털화, 실시간 기법으로 발전 하고 있다. 위에서 기술된 기법을 레이저 스펙클 대조도 분석(laser speckle contrast analysis - LASCA)이라 한다.[7,35]

이러한 이론을 바탕으로 여러 연구 그룹에서 시간 적분된 스펙클 무늬의 1차 공간적 통계에 대하여 연구가 진행 되었다. Takai는 진동하는 물체의 스펙클 대조도에 대해 연구하였고[36], Dacosta는 심박 측정의 원격 방법(remote method)을 연구하였다.[37] 연구에서 정맥으로부터 야기된 스펙클 무늬를 기록하기 위해 TV 카메라를 사용하였다. 그리고 이것을 프레임 별로 디지털화하고, 스펙클 대조도를 계산한 뒤 이것을 시간의 함수에 따른 그래프로 나타내었다. 연구에서 대조도의 최소값은 심박의 발생을 나타낸다. 또한, Jacques와 Kirkpatrick은 음파적으로(acoustically) 조직을 30Hz 주파수까지 만듦으로 시간 적분된 스펙클의 대조도를 생물학적 조직의 기계적 특성들을 연구하는데 사용하였다.[1,38]

#### 2.4.2 2차 통계(Second-order statistics)

2차 통계는 주로 변동의 주파수 정보를 이용하여 속도 정보를 알아낸다. 유체의 산란 중심에서 일어나는 임의 움직임에 관한 연구에서 자기상관 함수 (autocorrelation function)는 산란자의 속도 분포에 대한 정보를 전한다. 자기상관 함수를 측정하고 해석하는 기법은 세기 변동 분광학(intensity fluctuation spectroscopy), 빛 맥놀이 분광학(light beating spectroscopy) 혹은 광자 상관 분광학(photon correlation spectroscopy)등과 같은 방법이 많이 알려져 있다. 또한, 자기상관 함수 방법의 대안으로 변동의 주파수 스펙트럼(파워 스펙트럼)의 측정이 가능하다. 주파수 스펙트럼은 자기상관 함수의 푸리에 변환이다. 높은 속도를 갖는 산란자들은 움직이는 산란자들에 의해 산란된 빛의 도플러 편이(Doppler shift)로 인해 주파수 스펙트럼이 퍼지게 한다. 광자 상관 분광학은 레이저 스펙클 연구와는 독립적으로 발전된 연구이며 엄밀히 말해 스펙클 기법이 아니다. 광자 상관 분광학과 변동하는 스펙클(fluctuating speckle)의 관계는 입자 영상 속도 측정(particle image velocimetry)이 스펙클 영상촬영(speckle photography)에 갖는 관계와 같은 관계를 갖고 있다.

광자 상관 분광학과 밀접하게 연관이 있는 것은 레이저 도플러 속도 측정이다.[39] 한 가지 다른 점은 헤테로다인 접근이 이루어진다는 것이다. 산란된 신호는 지역 진동자(local oscillator)와 함께 맥놀이가 발생된다. 이런 접근은 방향성 흐름 측정에 더 적합하다. 반면 광자 상관 분광학은 확산(diffusion)과 자동력(motility)과 같은 비방향성 흐름의 측정에 주로 사용된다.

광자 상관 분광학과 레이저 도플러 속도측정이 시변 스펙클과 같은 물리적 현상이라는 것은 직관적 알기 쉽지 않다. 사실, 처음에는 서로 간에 큰 차이점이 있는 것처럼 보였다. 광자 상관 분광학과 레이저 도플러 속도측정의 이론은 움직이는 물체로부터 반사나 산란된 빛이 도플러 효과에 의해 빛의 주파수가 편이된다는 사실에 근거한다. 그러므로 도플러 해석은 주파수가 약간 다른 파동의 중첩과 결과 맥놀이 주파수의 검출과 관련이 있다. 반면에 시변 스펙클은 고전적인 간섭과 광 경로 차이 변화(optical path differences change)에 따른 결과 세기의 변화

관측에 근거한다. 따라서, 도플러 해석에서는 중첩된 파동이 다른 주파수를 갖는데 반해 스펙클 해석은 같은 주파수 파동의 중첩에 근거한다. 그럼에도 불구하고, 두 가지 경우 검출되는 주파수는 같다. 사실, 두 접근법은 같은 현상의 다른 접근 방식으로 볼 수 있다.[40]

이제 변동하는 스펙클의 2차 통계가 의공학적으로 어떻게 적용되고 있는지에 대하여 언급하고자 한다. 생물 의학 연구 분야에서 자주 쓰이는 스펙클 변동 통계의 주된 유형은 세기 변동의 2차 시간적 통계(second-order temporal statistics of intensity fluctuation)이다. 그리고 위에서 언급했듯이 여기에 매우 잘 발달된 연구 분야인 광자 상관 분광학과 레이저 도플러 속도측정이 포함된다. 후자의 기법은 망막[41,42]이나 다른 조직의 혈류를 측정하는데 많이 사용된다.[43] 레이저 도플러 속도측정 기법은 몇몇 의료 기관에서 많이 사용하는 도구가 되었다. 동맥과 모세혈관의 혈류의 흐름을 구분하기 위해 2개의 파장을 사용하는 것과 같이 기법의 개선과 관련된 많은 연구들이 진행되었다.[44] 최근 연구는 혈류의 절대값 측정 방법 개발을 위해 레이저 광선 반경, 혈관의 반경, 조직에서의 혈관 깊이의 함수에 대한 도플러 편이를 연구하였다.[45] 레이저 도플러 주사 기법은 모세혈관 혈류의 2차원 지도를 얻기 위해 발전되어 왔다. 조직 샘플링 깊이는 보통 1 ~ 2mm이고 속도 스펙트럼의 범위는 0.01mm/s ~ 10mm/s이다. 주사 영역은 256 × 256 화소의 해상도에서 최고 50cm × 50cm까지 가능하다. 주사 레이저 도플러 장비는 염증 연구나 상처 치료, 화상 깊이 진단이나 수술중 위 혈류의 측정을 포함한 많은 의학이나 수술 현장에서 사용된다. 하지만, 주사 레이저 도플러는 긴 주사 시간이 걸린다.(보통 5분) 이로 인해, 최근의 연구는 2차원 광 검출기 배열을 이용하여 주사 시간을 1초 이하로 줄이는데 목표를 두고 연구가 진행되고 있다.[1]

일본의 Asakura 연구 그룹은 스펙클 변동의 2차 통계를 이용하여 혈류 측정에 관한 대부분의 연구를 수행하였다. Asakura 그룹은 변동의 파워 스펙트럼을 측정하기 위해 스펙트럼 분석을 사용하면서 연구를 시작하였다. 이 그룹은 연구를 통해 고주파 성분과 저주파 성분의 비율로 표현되는 파워 스펙트럼 분포의 기울기(gradient)가 평균 속도의 지표라는 것을 알아내었다. 이 비율의 계산을 보다

용이하게 하기 위해 대역필터(band pass filter)를 사용하였다. 이 방법을 손바닥, 볼, 가슴, 다리의 피부의 혈류를 측정하는데 사용하였다. 하지만, 이 후의 연구를 통해 이 접근 방법을 항상 적용할 수 없다는 것을 보였다. 그리고 속도의 지표로 진동의 평균 주파수를 대신 사용하였다. 또한, 후에 진행된 연구에서 평균 주파수가 토끼의 망막과 맥락막의 혈류를 측정하기 위해 사용되었다. 다른 주요한 2차 통계는 자기상관 함수의 이용이다. 이것은 광자 상관 분광학에서 측정된 함수이고, 보통의 측정 기법은 이동 레지스터(shift register)에 기반을 둔 디지털 상관계(digital correlator)를 사용하는 것이다. Asakura는 안구의 기저부와 망막의 선택된 지점에서 혈류를 측정하기 위해 이 기법을 사용하였다. 또한, Asakura et al에서 살아있는 장기에서 야기된 시변 스펙클을 설명하기 위해 "바이오 스펙클"이라는 용어를 사용하였다.[46]

시변 스펙클의 2차 통계 응용은 혈류 흐름 측정에 제한되지 않는다. 자기상관 기법은 알 안의 새의 태아의 심박을 측정하는 것과 같이 다른 생물 의학 문제에 적용되어 왔다. 또한, 광자 상관 분광학을 이용한 많은 다른 응용이 보고되었다. 위에서 언급했듯 시변 스펙클과 이 기법(스펙클과 관계가 있든 없든)의 경계는 매우 불분명하다. 또한, 레이저 도플러 속도측정의 헤테로다인 기법도 혈류의 측정 이외의 분야에 사용되어져 왔다. 그 예로 운동성 미생물의 움직임 평가를 들 수 있다. 레이저 도플러와 결합한 현미경은 식물의 체관세포와 같은 매우 작은 계의 흐름 측정을 가능하게 한다. 최근 논문에서는 생물학적 활동의 이해와 평가의 시작점으로 식물의 건조를 관찰하기 위해 파워 스펙트럼과 자기상관을 모두 이용하였다. 다른 연구 그룹은 *in-vitro*에서 사람 공막의 정화를 연구하기 위해 산란된 빛의 편광되거나 혹은 되지 않은 성분의 세기 비율과 함께 자기상관 함수의 발생(evolution)을 이용하였다.[47]

2차 통계 사용에 있어서 한 가지 문제는 데이터를 해석하기 위해 수행 되어야 하는 많은 양의 신호와 데이터 처리이다. 이것은 파워 스펙트럼과 자기상관 함수의 측정 모두에 적용되었다. 이 문제는 한 개의 점을 측정할 때에는 문제가 되지 않는다. 그러나 만약 2차원이나 3차원 속도의 지도가 필요하다면 많은 양의 데이터를 처리해야만 한다. 이런 이유로 실제 측정을 간단하게 하기 위해 많은 시도



들이 이루어졌다. 망막과 모세혈관의 혈류를 측정하기 위해 적용된 단일 노출 스페클 영상촬영, 레이저 스페클 대조도 분석이 이런 기법에 해당한다. 여러 가지 이유로 인해, 2차 시간 통계의 측정은 전 영역에서 동시에 측정이 가능한 1차 공간적 통계의 측정으로 대체되었다. 비슷한 접근으로 이중 노출 스페클 영상촬영(double-exposure speckle photography)이 Hinsch에 의해 연구 되었다. 이 기법에서 스페클 비상관관계에 의해 감소되는 것은 간섭무늬(interference fringes)의 대조도이다. 실험에서 스페클 영상촬영을 사용하여 식물 잎과 밑의 성장을 측정하였고, 간섭무늬(fringe)의 선명도(visibility) 혹은 대조도(contrast)는 유기체내 생물학적 과정을 관찰하기 위해 사용되었다.[1]

## 제 3 장 시스템 및 실험

### 3.1 인공 혈류 장치

*In-vitro* 실험에서 인체 피하의 혈관분포 및 혈류와 유사한 조건을 제공하기 위해 인공 혈류 장치를 구성하였다. 인공 혈류 장치는 직경이 일정한 튜빙(tubing, Platinum silicon Tubing, LS/13; 풍림상사; 한국)과 튜빙 안의 액체가 일정한 속도로 흐를 수 있고, 흐르는 액체의 속도 조절이 가능한 연동펌프(Peristaltic pump, PP-150D; 0.3~570ml/min; 풍림상사; 한국)로 구성되었다. 마지막으로 튜빙 안에 흐를 액체로는 식염수를 사용하였다. 일반 증류수를 사용하지 않고 식염수를 사용한 이유는 스펙클의 산란 효과를 더욱 발생하게 하기 위해 액체 안에 산란물질이 이온상태로 분포하는 식염수를 사용하였다.(그림 4)



그림 4. 연동 펌프

### 3.2 레이저 스펙클 영상 장치

그림 5. 는 실험에 사용된 레이저 스펙클 영상 장치이다. 광원으로 다이오드 레이저 (Hitach HL6512MG; 658nm, 50mW; Thorlabs ,Newton, NJ, U.S.A.)를 사용하였고, 관심영역으로 광원을 전달하여 조사하기 위해 광섬유(BFL22-550; 550um; Thorlabs, Newton, NJ, U.S.A.)가 사용 되었다. 또한, 홀로그래피 확산기 (holography diffuser, R54-506; 25mm; 80° diffusing angle, Edmundoptics, Singapore)가 조사 영역에서 빛 분포를 균일하게 하기위해 광섬유 앞단에 위치하였다. 홀로그래피 확산기는 샘플 조사 영역으로부터 약 1cm 가량 위에 위치해 있다. 관심 영역 (*in-vitro* 실험에서  $2.5 \times 3\text{cm}$ 이고, *in-vivo* 실험에서  $7 \times 9\text{mm}$ )을 영상화할 수 있는 단색 CCD카메라(XC-HR70; Sony, Tokyo, Japan)를 통해 영상을 획득하였다. 영상은 프레임 그래버(Picolo; Euresys, Angleur, Belgium)를 통해 컴퓨터로 영상화되었다.

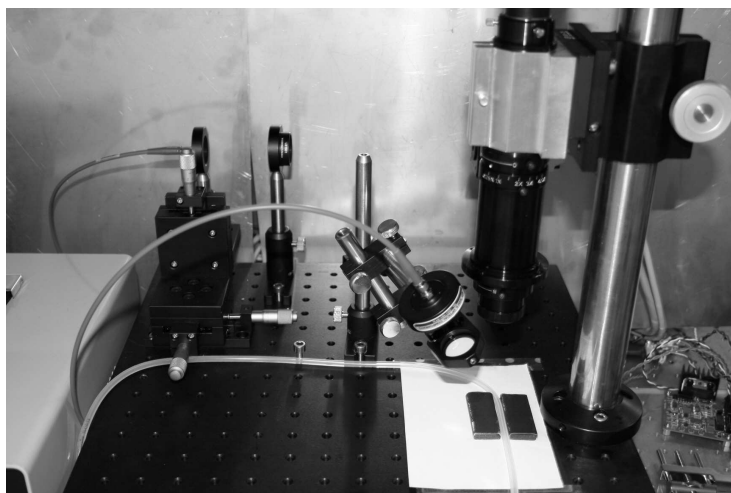


그림 5. 레이저 스펙클 영상 장치

### 3.3 물리·화학적 방법

본 연구에서 레이저 스펙클 관류 영상의 대조도를 향상시키기 위하여 물리·화학적 방법을 사용하였다. 화학적 방법은 피부 조직의 산란을 감소시켜 빛 투과도를 증가시키는 광 산란 감소 물질을 사용하였다. 물리적 방법은 미세바늘 롤러(micro-needle roller)가 사용되었다. 이는 피부 조직에 인공적인 극소 통로(artificial micro-channel)를 형성하여 글리세롤의 경피 투과 전달(transdermal delivery) 시간을 감소시키기 위한 것이다. 미세바늘을 이용하여 피부 표면에 극소 통로를 형성한 이유는 글리세롤의 특성에서 기인한다. 글리세롤은 친수성 물질이고, 피부의 최외각층인 각질층은 친지성이기 때문에 자연 확산으로 피부층을 투과하기 힘들며 또한, 매우 시간이 많이 걸리기 때문이다.

#### 3.3.1 광 산란 감소 물질(Optical clearing agent)

글리세롤이나 DMSO(dimethyl sulfoxide)같은 화학물질(chemical agent)의 조직에 대한 반응은 빛의 산란 감소와 이로 인한 광학 선명도(optical clarity)의 증가로 나타낼 수 있다. 조직의 광학적 선명도(optical tissue clearing)개선은 시준된 빛(collimated light)이 조직의 더 깊은 층까지 전달되게 하여 잠재적으로 다양한 광학적 진단 및 치료 기법의 성능(capability)을 개선하는 것이다. 비록 광학 선명도 개선의 기전(mechanism)이 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 이와 관련된 많은 문헌을 통해서 화학물질을 이용한 조직 광학 선명도 개선의 방법과 적용에 대해 논의되었다.[48] 화학물질에 의한 빛 산란 감소의 가정된 3가지의 기전은 첫 번째는 조직 성분의 탈수(dehydration of tissue constituents), 두 번째는 세포 사이 혹은 세포내 수분이 주로 세포를 이루고 있는 단백질성 물질(높은 굴절률(refractive index)을 갖는 물질)과 굴절률이 비슷한 물질로 교체, 세 번째는 교원질(collagen)의 구조적 변화(structural modification)나 해리(dissociation)가 있다. 비록 두 번째 기전(굴절률 맞춤)이 첫 번째 기전(탈수)을 필요로 하지만 이 두 기

전은 화학물질에 의한 수분의 대체와 같은 특징으로 다른 추가적 기전과 구분된다. 첫 번째와 두 번째 기전은 Tuchin에 의해 처음 제안되었고[49], 세 번째 기전은 Yeh에 의해 처음으로 제안되었다.[50] 그리고 명시하지 않은 기전들은 조직 형태와 생명력, 화학 물질, 전달 방법에 의존한 다른 상대적 기여와 함께 광 선명도 개선에 상승 혹은 상반되게 작용할 것으로 생각된다.[48]

본 연구에 사용된 광 산란 감소 물질은 70% 글리세롤(glycerol)이고, 0.05ml가 피부 조직에 국소적으로 적용되었다. 70% 글리세롤을 사용한 이유는 글리세롤은 점성이 높은 물질이기 때문에 농도가 높을수록 점성으로 인한 피부 표면으로 침투율이 낮아지기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 연구실에서 실시한 선행 연구 결과를 바탕으로 70%의 글리세롤이 경피 침투시간에 따른 광 산란 감소 효과를 비교 하였을 때 가장 효과적이기 때문에 선정하였다.

### 3.3.2 미세 바늘 방법(Micro-needling method)

미세바늘 방법을 사용하는 가장 중요한 이유는 이 방법이 경피를 통한 분자 이동을 위해 최소 침습 방법을 제공하기 때문이다. 이 같은 이유로 수많은 방법들이 약물의 경피 전달을 위해 미세바늘 방법을 차용하였다. 대부분의 연구들은 실리콘이나 금속으로 만들어진 미세바늘을 피부에 삽입하여 극소 통로(micro-channel)를 만드는데 집중하였다.

다음은 미세바늘을 이용한 약물의 경피 전달의 여러 가지 방법에 대해 논의하고자 한다. "poke with patch"는 극소 통로를 만들기 위해 미세바늘을 사용하고, 피부 표면에 경피 전달 패치를 부착하는 방법이다. 약물의 전달은 확산 혹은 전기장이 가해졌을 경우 전리요법(iontophoresis)에 의해 이루어진다. 다른 방법은 "coat and poke"로, 우선 약물이 바늘에 코팅되고, 미세바늘이 피부에 삽입된다. 이 방법은 피부 표면에 약물 저장소가 없고 전달되는 모든 약물은 바늘에 있게 된다. 두 번째 방법을 응용한 것이 "dip and scrape" 방법이다. 이 방법은 미세바늘을 먼저 약물에 살짝 담근 후에 피부 표면을 문지르는 것이다. 이 방법을 이용하면 바늘에 의해 생성된 미세 마멸(microabrasion)에 약물이 남게 된다.[51]

또한, 미세바늘 방법에 관한 연구 중 바늘의 속이 비어있는 미세바늘 설계와 방법으로 패치보다는 주사를 연상시키는 방법의 연구도 진행된 바 있다. 비록 제작과 사용이 힘들어도 속이 비어있는 미세바늘의 통로를 통해 피부로 유체의 흐름이 더 용이하고, 시간에 따라 약물의 투과 조절이 가능하여 약물의 전달력을 더욱 빠르게 한다.[51]

본 연구는 기계적 롤링을 통해 피부 표면에 극소 통로를 형성하는 롤러 형태의 미세바늘을 사용하였다.(그림 6) 피부 표면에 기계적 롤링을 적용하면 관심 영역의 넓은 부위에 비교적 짧은 시간에 극소 통로를 형성할 수 있고, FDA 승인을 받은 제품으로 이미 피부과에서 치료 목적으로 많이 사용되어 안전하기 때문이다. 연구에 사용된 롤러는 기계적 롤링을 통해 피부 표면에 극소 단위( $10^{-6}$ )의 통로를 쉽게 형성할 수 있다. 형성된 극소 통로는 시간의 경과에 따라 닫히게 되고 초기의 피부 상태로 완벽하게 재생이 된다. 각 바늘은  $70\mu\text{m}$  직경을 갖고 있고 높이는  $500\mu\text{m}$ 이다. 미세 바늘은 2cm 직경과 2cm 넓이의 원통 표면에 한 열에 25개의 바늘이 있는 정렬되어 있는 열이 원통 전체에 8열이 배열되어 있고, 약 200개 바늘이 미세바늘 롤러 원통 표면에 위치해 있다. 피부의 관심 영역에 10에서 15회 롤링 시 약  $240 \text{ channel}/\text{cm}^2$ 의 극소 통로를 형성한다.



그림 6. 미세바늘 롤러

## 3.4 실험

### 3.4.1 광원 균일 분포 실험

레이저 스펙클 영상은 획득한 영상의 스펙클 무늬 변동을 빛의 세기(스펙클 대조도) 변화로 나타내기 때문에 광원이 조사되는 영역의 초기 광원 분포가 매우 중요하다. 만약 초기의 광원 분포가 균일하지 않다면 획득된 영상에서 스펙클 대조도의 변화는 혈류의 흐름이나 유체의 흐름에 따른 변화가 아닌 광원의 초기 분포에 영향을 받게 되어 레이저 스펙클 영상 획득 시 오차가 발생하게 된다. 따라서 광원 균일 분포에 관한 실험은 레이저 스펙클 영상을 획득하기에 앞서 실시한 사전 실험으로 본 실험 진행 시 광원으로 인해 발생 할 수 있는 실험의 오차를 최소화하기 위하여 영상 획득 영역의 광원 분포를 균일하게 하기 위해 실시한 실험이다.

실험을 위해 레이저 스펙클 영상 장치에 광원으로 사용된 레이저 다이오드를 광원을 이용하였고, 광원이 조사될 물체로는 확산 반사판(diffuse reflectance target - SRT-99-100; Labsphere, North Sutton, NH, U.S.A.)을 사용하였다. 확산 반사판은 거의 모든 파장 영역에서 조사된 빛의 99%를 반사하는 판으로 주로 영상 장치 보정에 많이 사용되는 장비이다. 조사 지역의 광원을 균일하게 분포하기 위해 홀로그래피 확산기를 사용하였다.(그림 7) 홀로그래피 확산기를 통과여 나온 빛은 입사된 빛의 형태와 상관없이 출력되는 빛의 형태가 일정하게 유지 되어 조사되는 지역에 비교적 균일한 광원 분포가 가능하게 해준다.

실험은 홀로그래피 확산기를 통과한 레이저와 통과하지 않은 레이저를 확산 반사판에 조사하여 영상을 획득하고, 영상 분석을 통하여 두 영상의 빛 분포를 비교하는 것으로 진행하였다. 또한, 조사된 광원의 세기를 카메라를 통하여 획득 시 빛 세기의 값이 초과(saturation)되지 않도록 카메라의 노출 시간을 조절 한 후 영상을 획득하였다.

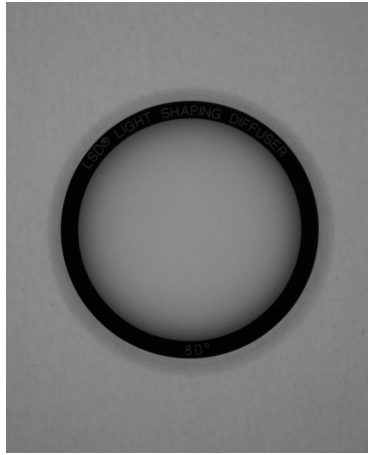


그림 7. 홀로그래피 확산기

### 3.4.2 *In-vitro* 실험

*In-vitro* 실험을 위해 돼지 피부 샘플이 준비되었고, 샘플의 지방층은 제거되었다. 실험 순서는 다음과 같다. 튜빙에 레이저를 조사하고 영상을 획득한다. 튜빙위에 샘플을 올려놓은 후 영상을 획득한다. 샘플에 본 연구에서 제시된 물리·화학적 방법의 효과를 확인하기 위해 미세바늘 방법을 적용하고, 그 후에 글리세롤이 국소 적용되었다. 미세바늘 방법은 샘플에 가로, 세로, 대각선의 방향으로 50회씩 총 150회 적용하였다. 샘플에 글리세롤을 국소 도포한 후 60분이 경과되면 스펙클 영상을 획득하였다. 튜빙 안에 흐르는 식염수는 0RPM, 80RPM, 150RPM으로 속도를 조절해가며 튜빙을 통해 흘러졌다.

### 3.4.3 *In-vivo* 실험

30 ~ 35g의 수컷 쥐가 *in-vivo* 실험에 사용되었다. 실험 진행 시 쥐의 마취를 위해 Ketamine과 Xylazine을 혼합(0.05ml, 0.02ml)하여 사용하였다. 실험이 진행되는 동안 쥐의 체온은 작은 발열등을 이용하여 일정하게 유지하였다. 상대적으로 혈관이 깊은 곳에 위치한 쥐의 왼쪽 대퇴부 동맥을 관심영역으로 지정하였다.



관심영역의 털은 제모 되었다. 제모된 관심 영역에 레이저를 조사하고 영상을 획득하였다. 미세바늘을 가로, 세로 각각 50회씩 총 100회 적용하였고, 글리세롤이 표면에 국소 도포되었다. 글리세롤 도포 30분 후 관심 영역의 영상을 획득하였다.

### 3.5 영상 분석

레이저 스펙클 영상 및 영상 분석에 관한 이론은 Briers et al(2001년)과 Dunn et al(2001년)에 자세히 기술되어 있다.[1,6] 스펙클 영상 분석 과정을 간단히 설명하면 획득한 일련의 스펙클 원 영상들에 일정한 화소 크기의 정사각형 창(window)을 적용하여(본 연구에서는  $5 \times 5$ 의 정사각형 창 적용) 스펙클 대조도를 계산한 후 원 영상들을 스펙클 대조도 영상으로 변환하여 이를 속도 지표 나타내는 일련의 과정이다. 본 연구에서는 획득한 영상을 분석하기 위하여 Matlab 7.0(Mathwork, Natick, MA, U.S.A.)을 사용하였고, 상세한 알고리즘은 부록에 기술 하였다.

본 연구에서 사용한 스펙클 대조도 계산을 위한 알고리즘은 3단계로 구성되어 있다. 알고리즘 1은 스펙클 대조도 계산에 필요한 영상 시스템의 변수를 저장하고, 획득한 영상의 입력 및 계산된 영상을 저장한다. 처리된 스펙클 대조도를 이용하여 상관 시간(correlation time)을 계산하고 이의 역수를 속도로 하여, 최종적으로 처리된 영상을 의사색(false color)으로 변환하여 속도의 지표로 나타낸다. 알고리즘 2는 알고리즘 1을 통하여 입력된 스펙클 원 영상에  $5 \times 5$ 의 창을 적용하고, 연속적으로 획득된 영상의 스펙클 대조도의 평균을 계산한다. 마지막으로 알고리즘 3에서는 알고리즘 2와 연계하여 영상의 스펙클 대조도를 계산하게 된다. 계산된 스펙클 대조도의 최대값은 1로 설정을 하고, 스펙클 대조도를 이용하여 영상은 속도 지표로 표현된다.

속도 지표를 계산하기 위해서는 복잡한 스펙클 이론을 필요로 한다. 이론에 대한 자세한 설명은 본 연구의 주제에 벗어남으로 이론에 대해 간략히 설명하고자 한다.

2.4절에서 언급했듯이 움직이는 물체의 시간 적분은 영상에 흐림(blurring)을 야기한다. 레이저 스펙클 무늬의 경우, 스펙클 대조도의 감소로 나타나게 된다. 이것은 곧 스펙클의 움직임을 야기한다. 임의 속도 분포에서 각각의 스펙클은 빛의 세기로 변동하고, 이로 미루어 보아 속도와 흐림의 정도에는 서로 상관관계가

성립한다. 어떠한 가정을 전제로 스펙클 대조도와 변동하는 스펙클의 시간적 통계에는 다음과 같은 수학적 관계는 성립될 수 있다.[30]

$$\sigma^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T C_t(\tau) d\tau \quad \text{식. 4}$$

$\sigma^2$ 는 스펙클 무늬 세기의 공간적 변화를 나타낸다.  $C_t(\tau)$ 는 단일 스펙클 세기에서 시간적 변동의 자기공분산 함수(autocovariance function)를 나타낸다. 스펙클 대조도는 카메라의 노출 시간(T)의 함수이고 스펙클 대조도는 단일 스펙클 세기 변화의 자기공분산 함수와 관련이 있다.[14] 자기공분산 함수는 자기상관 함수의 표준화된 표현으로 다음과 같이 정의 된다.

$$C_t(\tau) = \frac{\langle (I(t) - \langle I \rangle_t)(I(t+\tau) - \langle I \rangle_t) \rangle_t}{\langle I \rangle_t^2} \quad \text{식. 5}$$

$\langle \rangle_t$ 는 시간 평균 기호를 나타내고, 유체 흐름에서 분자의 속도 분포를 알기 위해 자기공분산이 로렌츠 속도 분포(Lorentzian velocity distribution)를 갖는다고 가정할 수 있고 이는 브라운 운동(Brownian motion)에만 해당 된다.(식. 5) 또한, 위 식을 바탕으로 레이저 스펙클 영상 분석과 움직이는 물체와 입자로부터 산란된 레이저 빛의 세기 변동을 이용하는 기법들과의 관계를 정의 할 수 있다. 식. 5의 왼쪽부분을 측정하는 것은 레이저 스펙클 영상 분석 기법이고, 광자 상관 분광학, 레이저 도플러, 시변 스펙클 기법들은 식. 5의 오른쪽 부분을 측정한다. 광자 상관 분광학의 경우 상관 시간은 직접적으로 측정이 가능하다. 하지만, 스펙클 대조도 측정을 상관 시관과 연계하기 위해서는 다음과 같은 식을 이용한 가정이 필요하다.

$$C_t(\tau) = \langle I \rangle^2 \exp(-2\tau/\tau_c) \quad \text{식. 6}$$

위 가정을 바탕으로 식을 정리 하면 다음과 같은 식을 유도 할 수 있다. [25]

$$C = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \left[ \frac{\tau_c}{2T} \left\{ 1 - \exp\left( \frac{-2T}{\tau_c} \right) \right\} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{식. 7}$$

위 수식을 통하여 스페클 대조도, 노출 시간 그리고 상관 시간의 관계를 알아낼 수 있다.  $\tau_c$ 는 상관 시간(자기공분산 함수가 1의 값에서 1/e의 값으로 떨어질 때 까지 소요되는 시간)으로  $\tau_c = 1/(ak_0v)$ 이고 있고,  $a$ 는 산란된 스펙트럼과 물질의 산란 값의 로렌츠 너비(Lorentzian width)와 관련된 요소이고,  $k_0$ 는 파수,  $v$ 는 평균 속도이다.[34] 식. 7을 바탕으로 그림 8[1]과 같은 그래프를 나타낼 수 있다. 이 그래프를 통하여 스페클 대조도는 상관시간과 노출시간의 함수로 나타낼 수 있다. 또한, 이를 통하여 상관 시간 및 노출 시간의 범위를 정할 수 있게 되고 스페클 대조도를 속도지표로 나타낼 수 있게 된다.

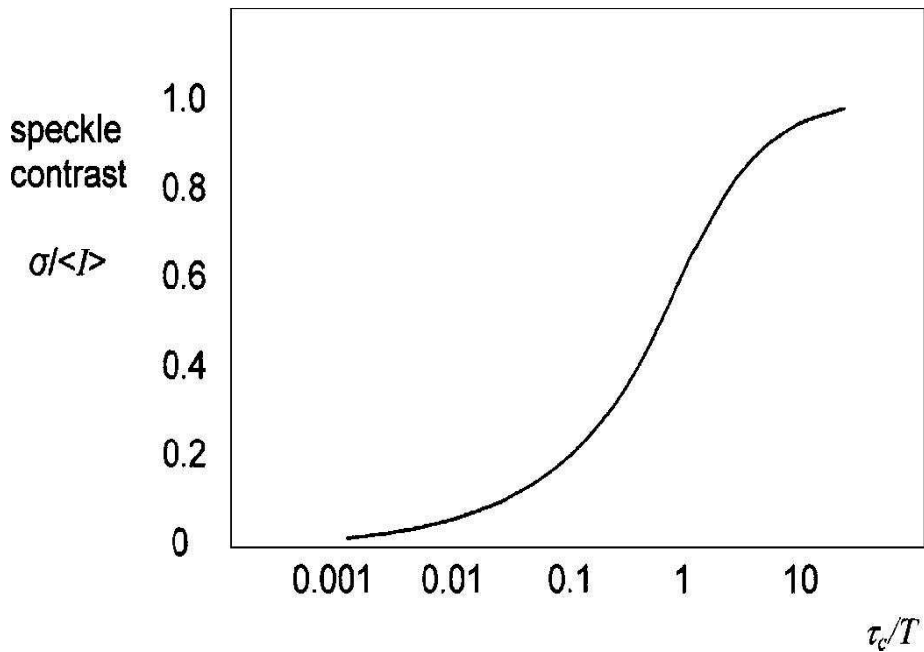


그림 8. 스페클 대조도와 상관시간·노출시간의 비에 따른 그래프

## 제 4 장 결 과

### 4.1 광원 균일 분포 실험

그림 9는 광원 균일 분포 실험의 결과 영상이다. 영상 (a)는 광원을 확산 반사판에 직접 조사하였을 때 영상이다. 광원이 확산 반사판의 좁은 영역에 집중되어 조사되는 것을 볼 수 있다. 영상 (b)는 광원에서 나온 빛이 확산기를 거쳐 확산 반사판에 조사되었을 때 영상을 나타낸 것이다. 영상 (a)와 비교 하였을 때 영상 (b)는 영상의 넓은 부분으로 비교적 균일하게 광원이 분포하는 것을 볼 수 있다.

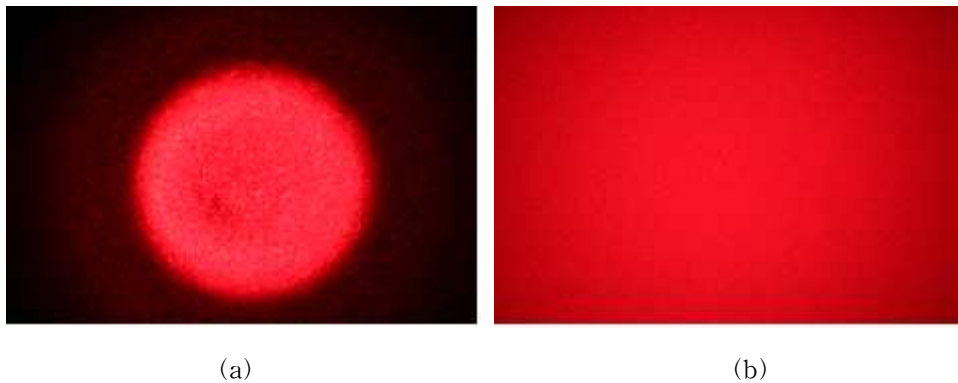
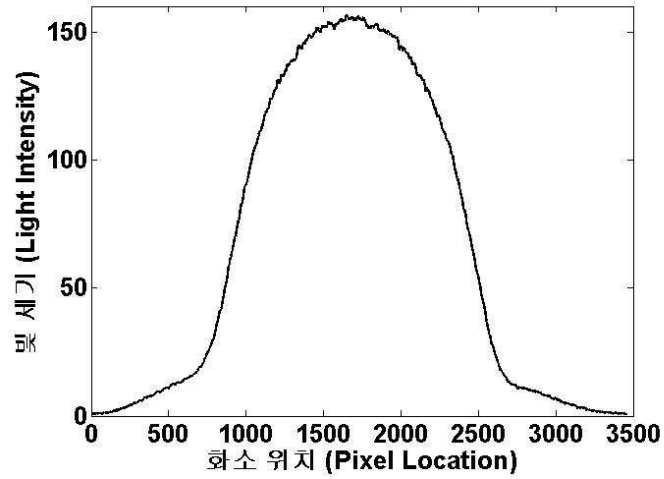


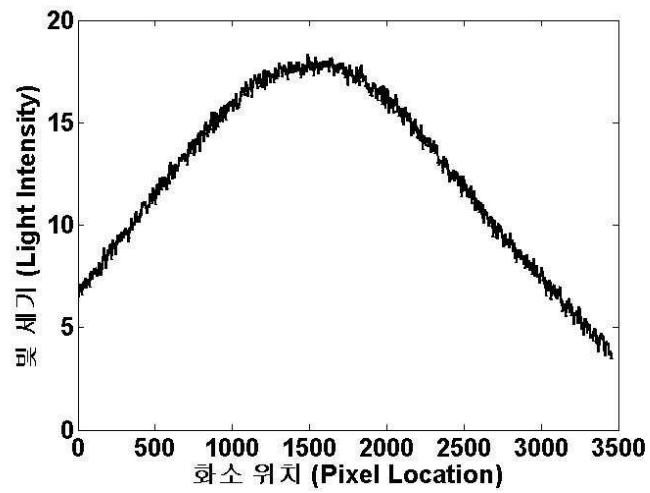
그림 9. 광원 분포 비교 영상. (a) 광원, (b) 확산기 통과 광원

그림 10은 그림 9 영상의 광원 분포를 빛 세기의 그래프로 나타낸 것이다. 영상을 그래프로 나타내기 위하여 영상의 빛 세기 값을 투영(projection - 화소에 저장된 빛 세기 값을 행 별로 평균값을 취하는 방법) 방식으로 계산 하였다. 선 주사(line scan - 관심이 되는 한 행이나 열의 값을 그대로 취하는 방법) 방식이 아닌 투영 방식을 사용한 이유는 영상 처리 시 발생할 수 있는 오차를 최소화하기 위해서이다. 그림 10 (a)의 그래프는 광원이 좁은 부위에 집중되는 가우스

(gaussian) 빛 분포를 나타내고(빛 세기의 최대값과 최소값의 차이 약 130), 그림 10 (b)의 그래프는 그림 10 (a)의 그래프에 비해 광원이 넓은 부위에 비교적 균일하게 분포하는 평평한(flat) 빛 분포를 나타낸다.(빛 세기의 최대값과 최소값의 차이 약 10)



(a)



(b)

그림 10. 광원 분포 비교 그래프. (a) 광원, (b) 확산기 통과 광원

## 4.2 *In-vitro* 실험

그림 11은 *in-vitro* 실험을 통해 획득한 스펙클 원 영상이다. 영상 (a)는 튜빙 영상이고, 영상 (b)는 튜빙 위에 돼지 피부 샘플을 올려놓은 후 획득한 영상이다. 영상 (c)는 샘플에 글리세롤을 도포하고 60분 후 획득한 영상이다. 영상 (b)와 (c)를 비교하면 처음에 샘플 조직의 불투명함(turbidity)으로 인해 보이지 않았던 튜빙이 글리세롤을 도포하고 일정시간이 지난 후 샘플의 불투명함(turbidity)이 감소됨에 따라 초기에 보이지 않았던 튜빙의 형태가 보이는 것을 확인 할 수 있다.

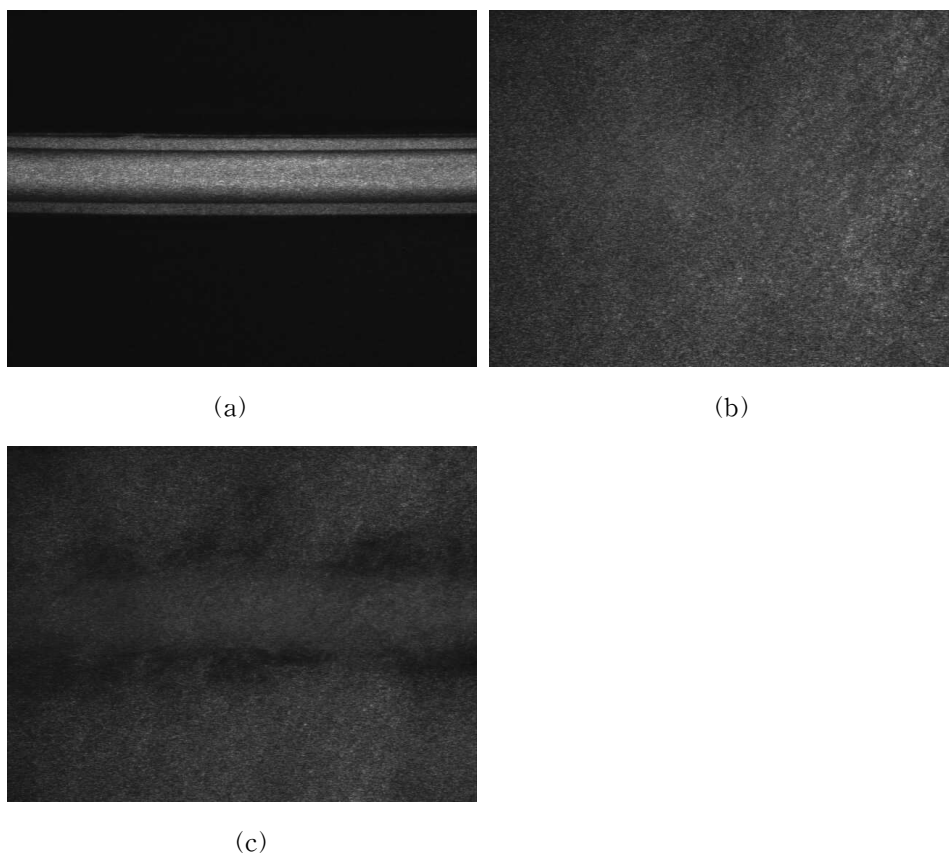


그림 11. *In-vitro* 레이저 스펙클 원 영상. (a) 튜빙 영상, (b) 튜빙+샘플 영상, (c) 글리세롤 도포 60분 후 영상

그림 12는 그림 11 영상을 color 카메라를 이용하여 획득한 영상으로 글리세롤의 도포에 따른 피부 조직의 투명도 증가를 시각적으로 더욱 잘 확인할 수 있다. 영상 (c)를 보면 초기에 샘플의 불투명도로 인해 보이지 않았던 튜빙이(그림 12 (b)) 시간이 지남에 따라 광 산란감쇠 효과로 인해 점차 선명하게 보이는 것을 확인할 수 있다. (그림 12 (c))

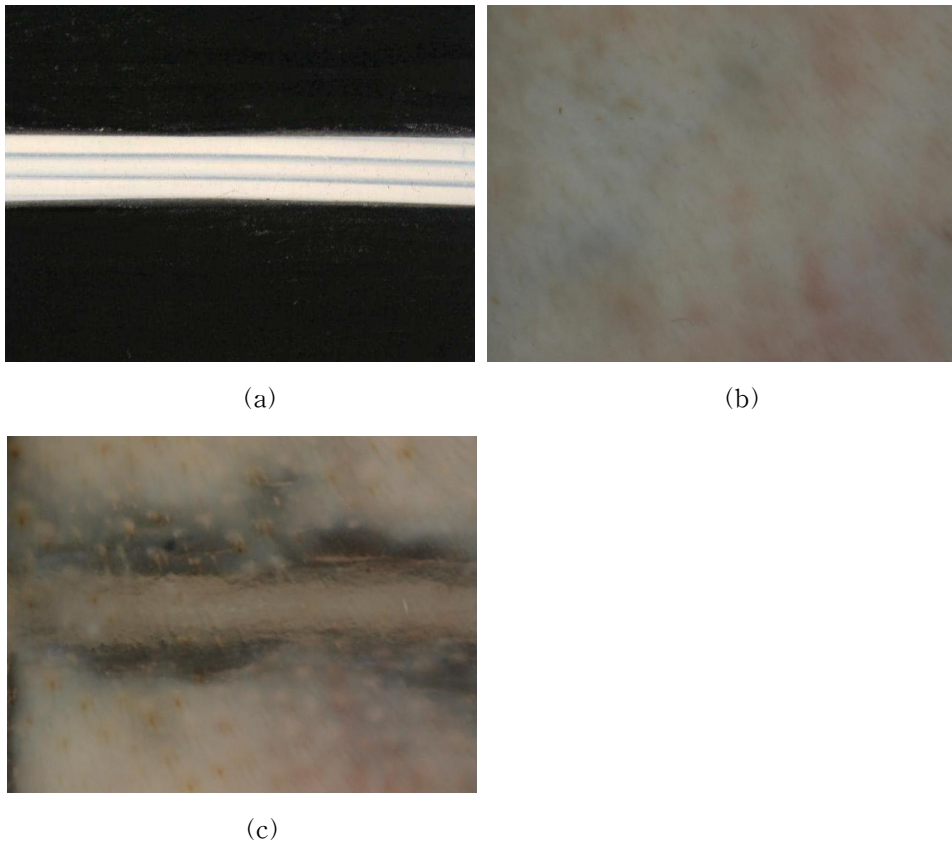


그림 12. *In-vitro* color 영상. (a) 튜빙 영상, (b) 튜빙+샘플 영상, (c) 글리세롤 도포 60분 후 영상



그림 13은 실험을 통해 획득한 그림 11의 스펙클 원 영상을 영상 분석을 통하여 스펙클 대조도 영상으로 나타낸 것이다. 영상 (a)와 (b)를 비교하면 튜빙을 흐르는 식염수의 속도에 따라 영상에서 스펙클 대조도가 다르게 나타나는 것을 볼 수 있다. 또한, 튜빙 위에 샘플을 올려놓은 후 획득한 영상에서는 샘플의 불투명도 때문에 튜빙 안의 식염수가 일정한 속도로 흐르고 있어도 스펙클 대조도 영상에서는 그 흐름이 대조도로 나타나지 않는다. 반면, 샘플에 글리세롤을 도포한 후 일정 시간이 흐른 뒤에 획득한 영상에서는 속도에 따른 스펙클 대조도의 차이가 나타났다. 속도가 0RPM일 때 글리세롤을 도포한 영상 (그림 13 (e))은 글리세롤을 도포하기 전 영상 (그림 13 (c))과 비슷한 대조도를 나타내었다. 반면, 튜빙 안에 식염수가 속도 150RPM으로 흐를 때에는 글리세롤을 도포한 영상 (그림 13 (f))에서 글리세롤을 도포하기 전 영상 (그림 13 (d))과 다른 스펙클 대조도를 나타내었다. 영상 (f)는 영상 (b)에서 식염수가 흐르는 영역과 비슷한 스펙클 대조도를 나타내었다.

그림 11 (a)의 영상에서 보듯 튜빙의 배경은 흰색이고, 튜빙을 지지해주기 위한 양 쪽의 지지대 색이 검은색인 것을 볼 수 있다. 이것은 주변 배경과 튜빙의 경계를 명확하게 하기 위한 것으로, 이로 인해 영상 처리된 스펙클 대조도 영상에서 튜빙 양쪽의 지지대에 속도가 높게 나타나는 것을 볼 수 있다. 이것은 지지대의 색에 의한 것으로 실험의 결과에는 영향을 미치지 않는다.

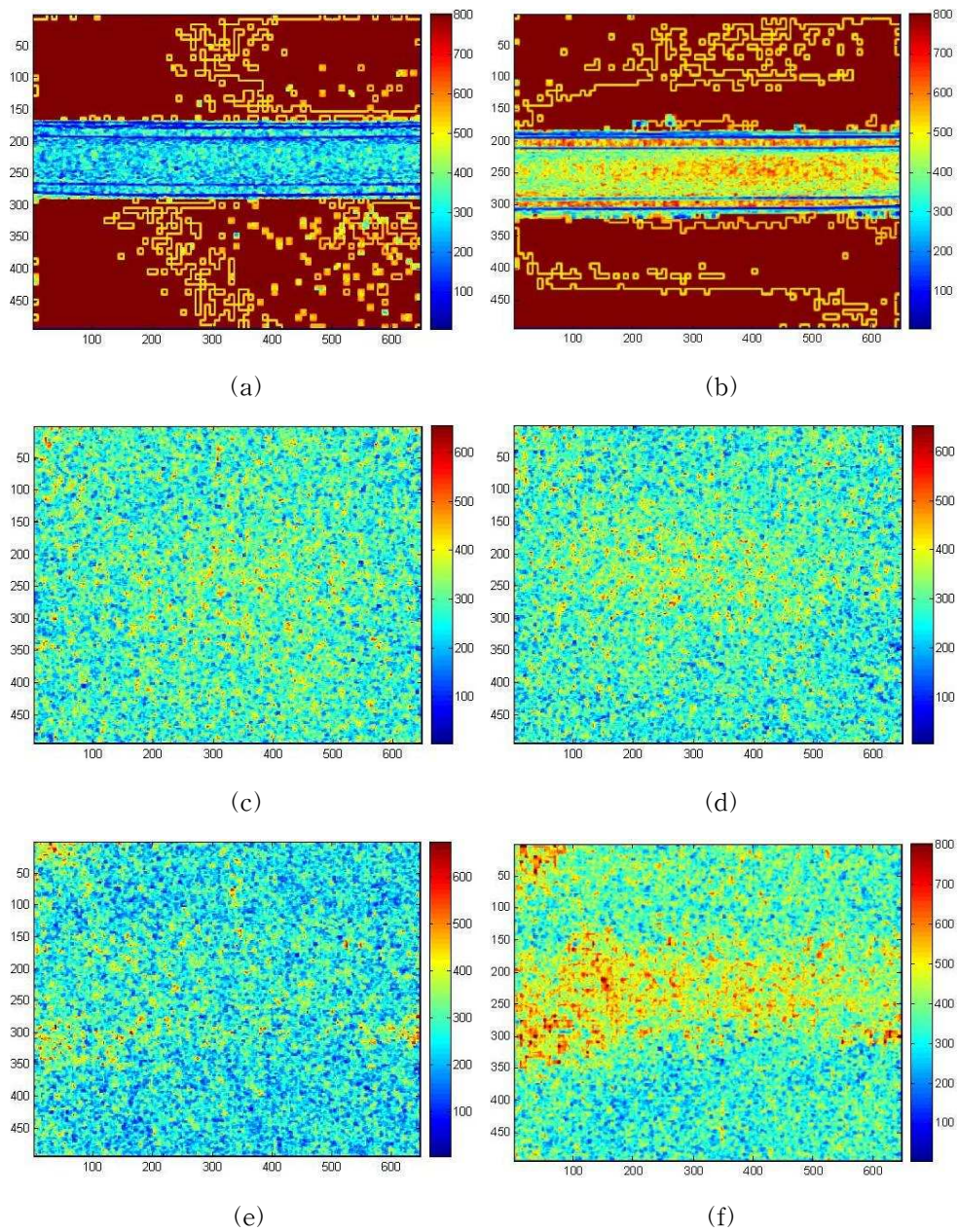


그림 13. *In-vitro* 레이저 스펙클 대조도 영상. (a)와(b) 튜빙 영상, (c)와(d) 튜빙+ 샘플 영상, (e)와 (f) 글리세롤 도포 60분 후 영상. 영상 (a),(c),(e): 식염수의 속도 0RPM, 영상 (b),(d),(f): 식염수의 속도 150RPM

### 4.3 *In-vivo* 실험

그림 14의 영상 (a)와 (b)를 비교해 보면 초기에 보이지 않던 피하 혈관이 글리세롤 도포 후 광 산란 감소 효과에 의해 보이는 것을 알 수 있다. 하지만 영상을 보면 글리세롤에 의해 피부 심부에 위치한 혈관의 시각적 나타남의 정도가 선명하지 않고, 부분적으로 혈관이 보이지 않는 곳이 있다. 영상 (c)와 (d)는 스펙클 대조도 영상으로 원 영상과 마찬가지로 혈관이 있는 부분과 그렇지 않은 부분의 대조도의 차이가 크지 않은 것을 알 수 있다.

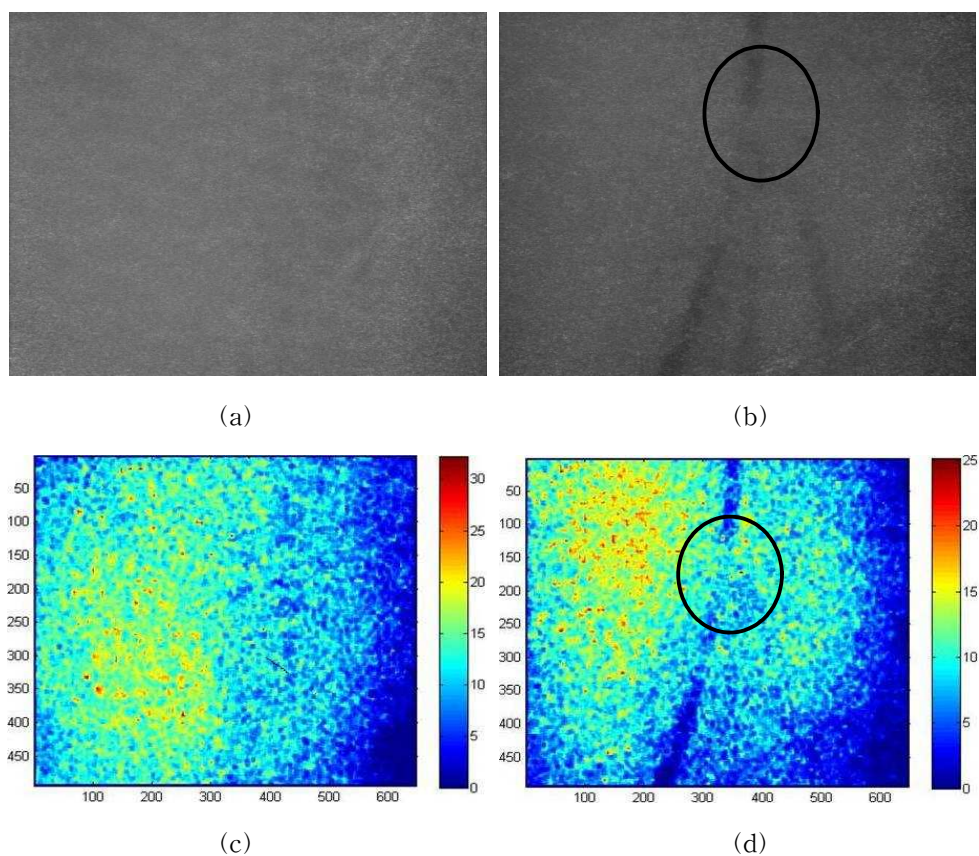
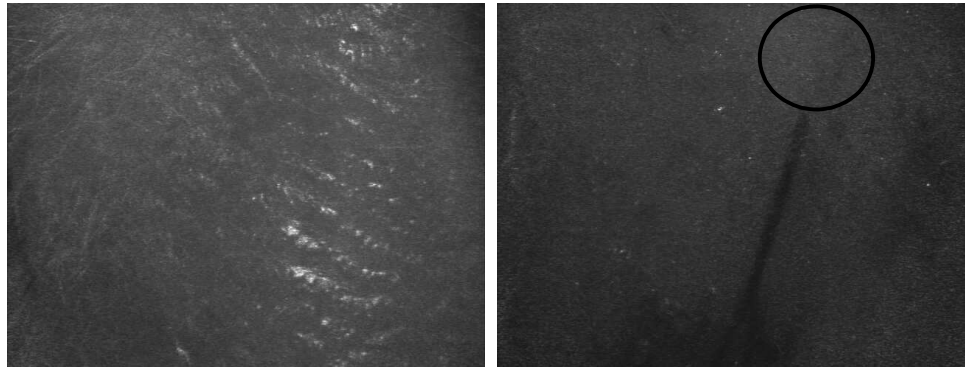


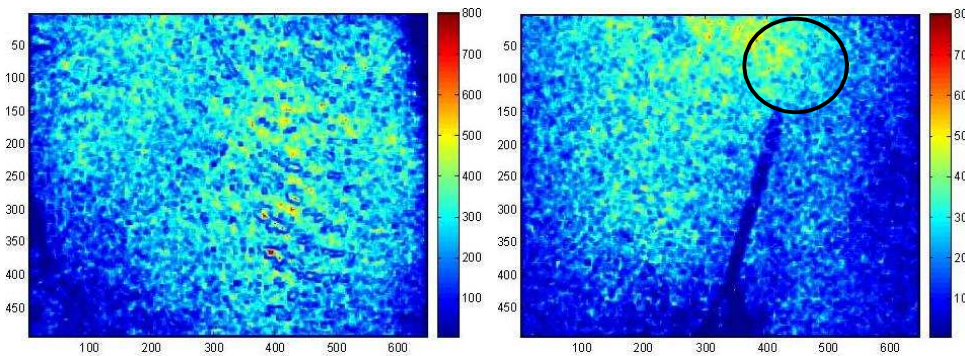
그림 14. *In-vivo* 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 1. 글리세롤 도포 전(a) 과 도포 후(b) 원 영상, 글리세롤 도포 전(c) 과 도포 후(d) 대조도 영상





(a)

(b)



(c)

(d)

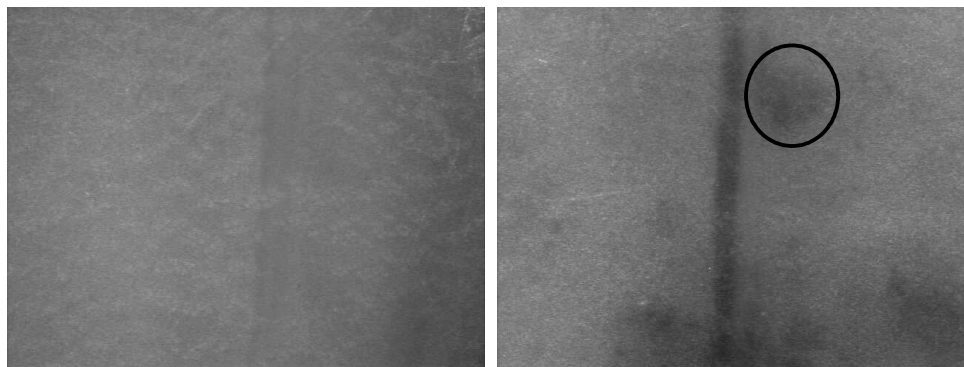
그림 15. *In-vivo* 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 2. 글리세롤 도포 전(a) 과 도포 후(b) 원 영상, 글리세롤 도포 전(c) 과 도포 후(d) 대조도 영상

그림 15의 영상 (a)와 (b)를 비교하면 그림 14에서 같이 글리세롤 도포에 따라 초기에 보이지 않던 피하의 혈관이 보이는 것을 볼 수 있다. 그러나 영상의 중간에서 혈관의 시각적 나타남이 없어지는 것을 볼 수 있다. 이는 스펙클 대조도 영상에서도 나타나는데, 영상 (c)와 (d)를 비교하면 시각적으로 혈관이 보임에 따라 스펙클 대조도 변화를 볼 수 있으나 혈관이 영상 중간에 없어짐에 따라 스펙클 대조도의 차이 역시 중간에 없어지는 것을 볼 수 있다.

그림 16에서 글리세롤 도포 전(영상 (a))과 도포 후(영상 (b)) 영상을 비교해 보면 위 결과 영상들과 비교하였을 때 글리세롤을 피부에 도포한 후 시간의 경과에 따라 피하의 혈관이 보다 확연히 나타나는 것을 볼 수 있다.

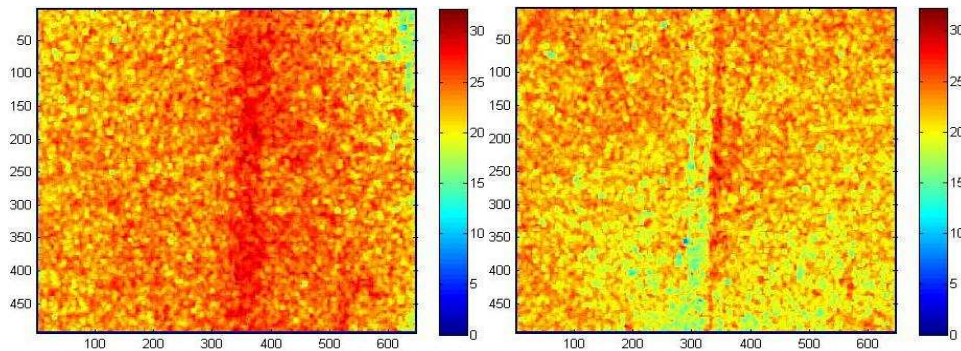
영상 (c)와 (d)는 영상 분석을 통한 스펙클 대조도 영상이다. 영상을 보면 원 영상에서 나타난 피하의 혈관에 관한 정보가 스펙클 대조도 영상에서 잘 표현되지 못한 것을 볼 수 있다. 이 문제를 해결하기 위해 영상 (c)와 (d)를 영상 처리를 통해 대조도 향상(contrast enhancement)과정을 거친 후 스펙클 대조도 영상으로 나타낸다. 영상 (c)와 (d)를 영상 (e)와 (f)와 비교해 보면 혈관의 정보를 담고 있는 스펙클 영상 대조도가 향상된 것을 볼 수 있다. 이 결과를 바탕으로 본 연구에서 *in-vivo* 실험을 통해 획득한 모든 원 영상은 스펙클 대조도 영상으로 나타내기 전에 대조도 향상의 영상 처리 과정을 거친 후 스펙클 대조도 영상으로 나타내었다.

그림 16의 스펙클 대조도 영상은 다른 실험의 영상에 비해 스펙클 대조도가 비교적 잘 나타났다. 하지만 영상 (f)의 표시된 부분은 혈관이 있는 부분이 아니지만 해당 영역에 마치 혈관이 있는 것과 같은 스펙클 대조도가 나타나는 것을 볼 수 있다.



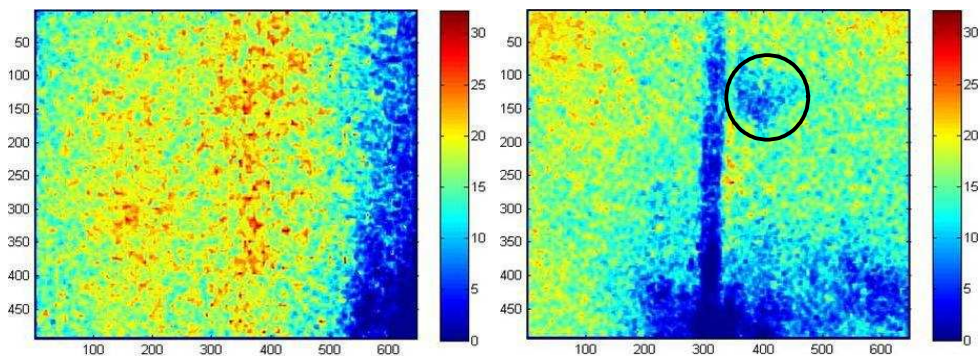
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

그림 16. *In-vivo* 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 3. 글리세롤 도포 전(a) 과 도포 후(b) 원 영상, 글리세롤 도포 전(c) 과 도포 후(d) 대조도 영상, 글리세롤 도포 전(e) 과 도포 후(f) 대조도 향상 영상

그림 17에서도 다른 결과와 같이 글리세롤 도포에 따라 초기에 잘 보이지 않던 피하의 혈관이 잘 보이는 것을 알 수 있다.(영상 (c)와(e)) 이 실험 결과의 경우 그림 14와 그림 15의 영상들과 비교 하여 피하의 혈관을 끊김이나 흐림 없이 비교적 잘 관찰 할 수 있고 그림 16의 영상과 비교하여 피하에 위치한 여러 갈래의 혈관을 관찰 할 수 있다. 영상 (e)는 영상 (c)의 표시한 일정 영역을 확대한 영상이다. 영상 (c)에서는 피부의 광 산란 감소 현상을 영상 (e)보다 더 확실하게 관찰 할 수 있다. 영상 (b), (d), (f)는 원 영상을 영상 처리를 통하여 계산한 스펙클 대조도 영상이다. 영상 (b)와 (f)를 비교하면 글리세롤 도포에 따라 초기에 보이지 않던 혈관이 시각적으로 나타남에 따라 스펙클 대조도 또한 변한 것을 알 수 있다. 또한, 영상 (d)의 경우 영상 (f)에 비해 혈관의 시각적 변화에 따른 스펙클 대조도도 변화가 잘 나타나지 않는 것을 볼 수 있다.

위 *in-vivo* 실험 결과들로 미뤄 볼 때 피부를 통해 초기에 피부 표면에 육안으로 관찰되지 않았던 피하에 위치한 혈관이 시각적으로 나타남으로써 국소 적용된 글리세롤이 쥐 피부 조직의 투명도를 증가시킨 것을 알 수 있다. 여러 실험 결과에서 정도의 차이는 있지만 초기에 보이지 않던 피하의 혈관이 글리세롤을 도포한 후 나타나기 시작했다.



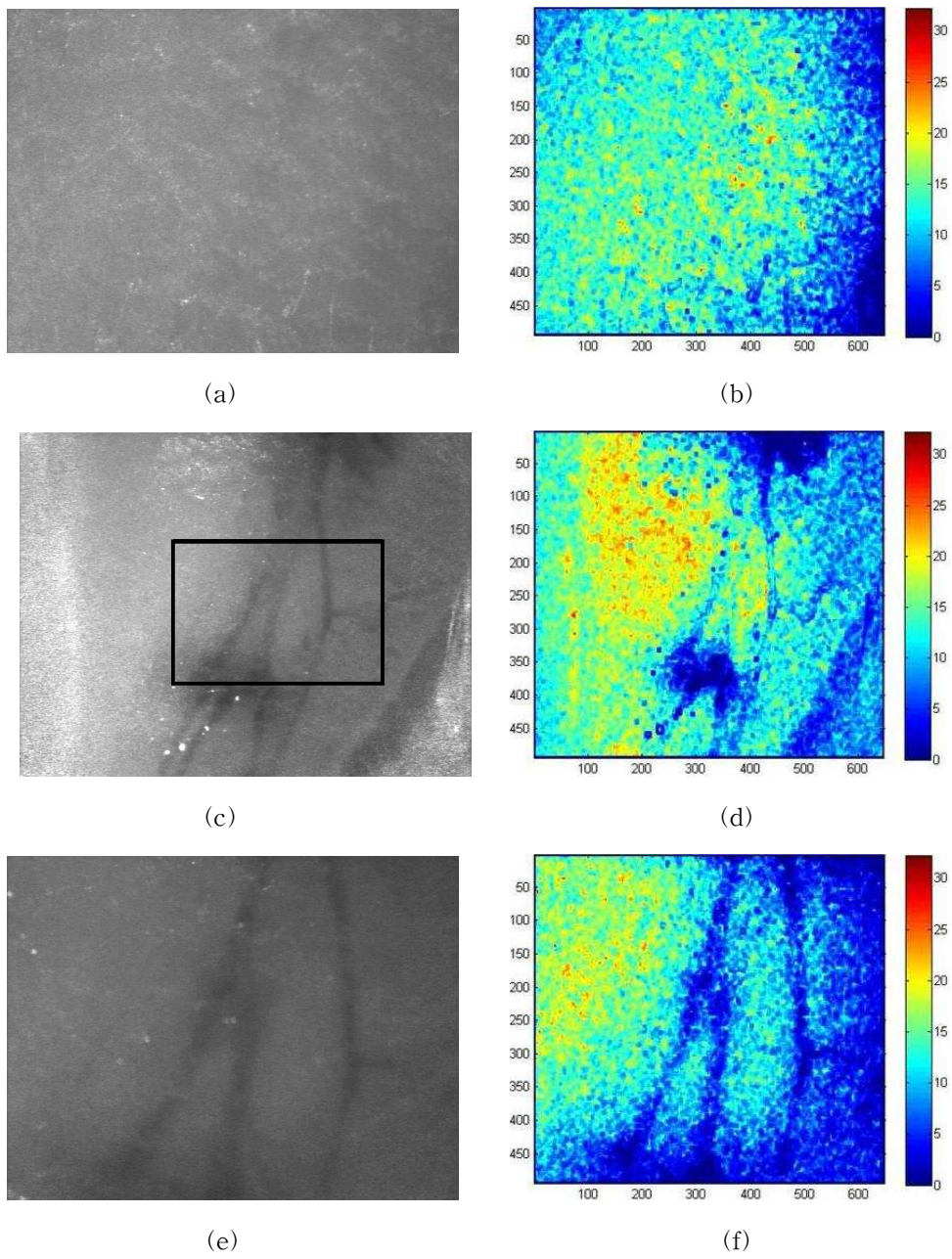


그림 17. *In-vivo* 레이저 스펙클 원 영상 및 대조도 영상 4. 글리세롤 도포 전(a) 과 도포 후 (c, e) 원 영상, 글리세롤 도포 전(b) 과 도포 후(d, f) 대조도 영상



## 제 5 장 고 찰

본 연구는 레이저 스펙클 관류 영상의 대조도 개선을 위해 *in-vitro*와 *in-vivo* 실험을 통해 제시한 물리·화학적 방법의 효과를 알아보았다.

대부분의 기존 레이저 스펙클 영상에 대한 연구들은 절개 과정을 거쳐 혈관을 노출시킨 뒤 광원을 직접 조사하고, 혈관을 관찰하여 혈류의 흐름을 관찰하는 것에 집중되어왔다. 본 연구는 레이저 스펙클 영상 방법을 이용하여 절개 과정 없이 피부를 통하여 직접적으로 피하 혈관을 영상화하였다. 그림 13은 *in-vitro* 실험을 통한 스펙클 대조도 영상을 나타내고 있다. 튜빙을 통하여 식염수가 흐르고 있다고 해도 글리세롤이 적용되기 전 스펙클 대조도 영상은 그림 13 (d)와 같이 속도의 정보를 나타내지 못하고 있다. 또한, 튜빙에 식염수가 흐르지 않으면 그림 13 (e)와 같이 글리세롤이 적용되었다 하더라도 속도의 정보를 나타내지 못하고 있다. 반면, 튜빙에 식염수가 일정한 속도로 흐르고, 글리세롤이 적용된 영상(그림 13 (f))의 경우 튜빙 안의 식염수의 흐름이 스펙클 대조도에서 잘 나타나는 것을 볼 수 있다. 이 결과로 미세 바늘 방법이 사용된 글리세롤 적용은 *in-vitro*에서 스펙클 영상의 대조도를 개선하고 광 산란 감소에 걸리는 시간을 단축 시켜 준다는 사실을 확인 할 수 있다.

*In-vitro* 결과는 *in-vivo* 실험을 통해 다시 확인할 수 있다. 정상 상태에서 피부를 통하여 혈관을 맨 눈(bare eye)으로 관찰하는 것은 쉽지 않다. 하지만 글리세롤을 피부에 적용하면 광 산란 감소 효과에 의해 피부를 통한 혈관의 관찰이 가능하게 된다. *In-vitro* 실험에서 광 산란 감소 효과는 광 산란 감소 물질 도포 후 약 60분 뒤에 현저하게 관찰되며, *in-vivo* 실험에서 약 30분 뒤에 현저하게 관찰되었다. 하지만 앞서 언급했듯이 글리세롤의 피부 통과는 매우 제한되어 있다. 미세바늘 방법의 효과를 비교하기 위해 피부 표면에 미세 바늘의 적용 없이 글리세롤을 국소 적용해 보았다. 실험 결과 글리세롤의 자연 확산(natural diffusion)을 관찰 할 수 없었고, 시간의 경과에 따른 광 산란 감소 효과 역시 관찰 되지 않았다. 따라서, 본 연구는 대퇴부 동맥 지역에 미세 바늘 방법을 먼저 적용한 후

그 다음에 글리세롤을 국소 적용하였다. 정상 상태에서 스펙클 대조도 영상은 그림 14 (c), 그림 15 (c), 그림 16 (c), 그림 17(b)에서 보는 것과 같이 혈관 정보를 포함하고 있지 않다. 그러나 피부에 미세 바늘 방법과 복합된 글리세롤이 적용되면 스펙클 대조도 영상은 그림 14 (d), 그림 15 (d), 그림 16 (d), 그림 17(e)에서 보는 것과 같이 대퇴부 동맥의 혈류 흐름 정보를 잘 나타낸다.

그림 14 (d)와 그림 15(d)의 스펙클 대조도 영상의 경우 혈관의 시각적 나타남이 상대적으로 약하거나 부분적으로 나타나지 않는 것을 관찰 할 수 있는데, 이것은 미세 바늘 방법 적용 시 피부 표면의 극소 통로 생성이 원할 하지 않아 경피를 통한 광 산란 감소 물질의 피부층으로 전달이 미약하여 부분적으로 광 산란 감소 효과가 적게 일어난 것으로 생각 할 수 있다. 그림 16(d)의 경우 미세 바늘 방법 적용 시 너무 과한 적용으로 인하여 피하의 모세혈관 파열되었고, 이로 인해 혈액 덩어리(blood clot)가 피하에 생겨나 혈류 정보에 오차를 발생시킨 것을 볼 수 있다. 또한, 그림 17 (d)의 스펙클 대조도 영상의 경우 원 영상(그림 17 (c))에서는 광 산란 감소 효과로 인해 피하의 혈관이 잘 보이지만 스펙클 대조도 영상에서는 혈류의 정보를 잘 나타내지 못하고 있다. 이는 원 영상에서 보듯이 영상 획득 영역에 광원의 분포가 고르지 못하여 광원이 일정 영역에 많이 분포하는 것을 관찰 할 수 있고, 이 부위에 많은 양의 광원 조사로 인해 반사가 심하게 일어난 것을 볼 수 있다. 이것으로 인해 원 영상에서는 광 산란 감소 효과를 관찰 할 수 있지만, 스펙클 대조도 영상에서는 광 산란 감소 효과로 인한 스펙클 대조도 개선 효과를 관찰 할 수 없다. 사전 실험을 통해 조사 영역의 광원 분포를 균일하게 하기 위한 방법을 제시하였음에도 광원의 균일하지 못한 분포에 의한 실험의 오차가 발생하였다. *In-vitro* 실험의 경우 돼지 피부 샘플이 비교적 평평하여 광원이 조사 지역에 균일하게 분포하여 조사 광원에 의한 오차는 거의 발생하지 않았다. 하지만 *in-vivo* 실험의 경우 쥐의 대퇴부 지역의 굴곡에 의해 광원 분포가 영향을 받고, 이로 인해 결과 영상에서 오차가 발생한 것으로 생각된다. 이 문제의 경우 향후 실험을 통해 개선해야할 점으로 생각된다. 또한, 반사 문제는 광원과 카메라 단에 편광기를 장착하여 교차편광으로 영상을 획득하게 되면 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 광 산란 감소의 정도를 돼지 샘플 아래에 있는 튜빙의 시각적 나타남(그림 11 (b)와 (c), 그림 12 (b)와 (c))이나 쥐 피부의 혈관의 시각적 나타남(그림 14 (a)와 (b), 그림 15 (a)와 (b), 그림 16 (a)와 (b), 그림 17 (a)와 (c), (e))을 관찰함으로써 평가 할 수 있었다. 튜빙과 혈관의 시각적 나타남은 시간이 지남에 따라 더욱 뚜렷하게 나타났다. 이를 통하여 피부 조직에 광 산란 감소의 과정이 시간 종속적인 과정임을 제시하고 있다.

다음으로 미세바늘 방법은 글리세롤의 투과성을 높이기 위해 사용되었고 결과적으로 침투 시간(penetration time)을 감소 시켰다. *In-vitro* 실험에서 미세 바늘 방법이 적용된 피부 샘플은 빠른 광 산란 감소 효과를 나타냈다. 이는 미세바늘 방법에 의해 피부에 경피 극소 통로(transepidermal micro-channel)가 형성되어 이 통로를 통한 글리세롤의 피부 침투율 증가에 기인 한 것으로 생각된다. 또한, *in-vivo* 실험에서 미세바늘 방법을 적용하지 않고 글리세롤만 국소 적용하였을 경우 쥐 피부에서 글리세롤이 효과적으로 투과하지 못하는 현상이 관찰되었고, 이로 인해 피부 조직에서 광 산란 감소 효과가 나타내지 않았다.

향후 연구에서는 실험을 통해 발생한 레이저 스펙클 영상의 문제점을 보완하여 영상의 해상도를 더욱 개선하고, 실제 임상에서 적용 가능한 레이저 스펙클 장비를 구축하고, 임상 실험을 실시할 계획이다.

## 제 6 장 결 론

본 연구를 통하여 레이저 스펙클 영상의 대조도 개선을 위해 제시한 물리·화학적 방법의 혼합 적용이 피부 심부에 위치한 혈관의 스펙클 영상의 대조도를 크게 향상 시키는 것을 알 수 있었다. 실험 결과를 바탕으로 임상에서도 유사한 결과를 나타낼 것으로 생각된다. 또한, 연구에서 제시한 물리·화학적 방법은 레이저 스펙클 영상에서 뿐만 아니라 광을 이용한 모든 진단 및 치료 장비에 적용 가능할 것으로 생각되며, 장비의 효율 개선에도 많은 이점을 줄 것으로 생각된다.

## 부 록

### 알고리즘 I

```
function speckle(numImage,name);
T = 0.04;
matrix = zeros(494,648,numImage);

for i = 1:numImage;
    filename = [num2str(i),'.jpg'];
    data = imread(filename);
    matrix(:, :,i) = data;
end;

m = example_sc(matrix,numImage);
m1 = m > 1;
m2 = not(m1);
m = m.*m2 + m1;
m4 = m - 1;

velocity =((-4*(m4) + (10/3)*(m4).^2 - (32/9)*(m4).^3 + (556/135)*(m4).^4 -
(1996/405)*(m4).^5 + (5638/945)*(m4).^6 - (307424/42525)*(m4).^7 +
(222328/25515)*(m4).^8 - (11944892/1148175)*(m4).^9 +
(2323113074/189448875)*(m4).^10)/(2*T));

figure, imagesc(velocity);
colorbar;
```

## 알고리즘 II

```
function SCm=example_sc(I,numImage);

Nfiles=10;
SC=zeros(size(I));
for im=1:Nfiles,
    SC(:,:,im)=colfilt(I(:,:,im),[5 5], 'sliding', @speckle_contrast);
end

SCm=mean(SC,3);
```

## 알고리즘 III

```
function sc=speckle_contrast(v)
    sc=std(v)./mean(v);
```

## 참고문헌

- [1] J. D. Briers, "Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging," *Physiol. Meas.*, vol. 22, pp. R35 - R66, 2001.
- [2] J. C. Dainty (ed) 1975 and 1984 *Laser Speckle and Related Topics* (Berlin: Springer)
- [3] M. D. Stern, "In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering," *Nature*, vol. 254, pp. 56 - 58, 1975.
- [4] K. R. Forrester, C. Stewart, J. Tulip, C. Leonard, and R. C. Bray, "Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: measurement in human skin and rabbit articular tissue," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 40, pp. 687-697, 2002.
- [5] Y. Aizu, K. Ogino, T. Sugita, T. Yamamoto, N. Takai, and T. Asakura, "Evaluation of blood flow at ocular fundus by using laser speckle, " *Appl. Opt.* vol., 31, pp. 3020-3029, 1992.
- [6] A. K. Dunn, H. Bolay, M. A. Moskowitz, and D. A. Boas, "Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle," *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* vol. 21, pp. 195-201, 2001.
- [7] J. D. Briers, G. Richards, and X. W. He, "Capillary blood flow monitoring using laser speckle contrast analysis (LASCA)," *J. Biomed. Opt.* vol. 4, pp. 164-175, 1996.
- [8] S. S. Ulyanov, "High-resolution speckle-microscopy: study of the spatial structure of a bioflow," *Physiol. Meas.* vol. 22, pp. 681-691, 2001.
- [9] A. C. Völker, P. Zakharov, B. Weber, F. Buck, and F. Scheffold, "Laser speckle imaging with an active noise reduction scheme," *Opt. Express* vol. 13, no. 24, pp. 9782-9787, 2005.
- [10] S. Yuan, A. Devor, D. A. Boas, and A. K. Dunn, "Determination of

- optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging," *Appl. Optics* vol. 44, no. 10, pp. 1823-1830, 2005.
- [11] H. Cheng, Q. Luo, S. Zeng, S. Chen, J. Cen, and H. Gong, "Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution," *J. Biomed. Opt.* vol. 8, no. 3, pp. 559-564, 2003.
- [12] K. Murari, N. Li, A. Rege, X. Jia, A. All, and N. Thakor, "Contrast-enhanced imaging of cerebral vasculature with laser speckle A method for processing laser speckle images to extract high-resolution motion," *Appl. Optics* vol. 46, no. 22, pp. 5340-5346, 2007.
- [13] J. D. Rigden and E. I. Gordon, "The granularity of scattered optical maser light," *Proc. IRE*, vol. 50, pp. 2367 - 2368, 1962.
- [14] J. W. Goodman, "Statistical properties of laser speckle patterns *Laser Speckle and Related Topics*," 2nd ed 1984 ed J C Dainty (Berlin: Springer) pp. 9 - 75, 1975.
- [15] J. D. Briers, "Wavelength dependence of intensity fluctuations in speckle patterns from biological specimens," *Opt. Commun.*, vol. 13, pp. 324-326, 1975.
- [16] J. D. Briers, "Speckle fluctuations as a screening test in the holographic measurement of plant motion and growth," *J. Exp. Bot.*, vol. 29 pp. 395-399, 1978.
- [17] A. Oulamara, G. Tribillon and J. Duvernoy, "Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle," *J. Mod. Opt.*, vol. 36 pp. 165-179, 1989.
- [18] Z. Xu, C. Joenathan and B. M. Khorana, "Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens" *Opt. Eng.* vol. 34 pp. 1487-1502, 1995.



- [19] J. D. Briers, "The statistics of fluctuating speckle patterns produced by a mixture of moving and stationary scatterers," *Opt. Quant. Electron.*, vol. 10, pp. 364-366, 1978.
- [20] A. F. Fercher, "Velocity measurement by first-order statistics of time-differentiated laser speckles," *Opt. Commun.*, vol. 33, pp. 129-135, 1980.
- [21] H. Fujii, K. Nohira, Y. Yamamoto, H. Ikawa, and T. Ohura, "Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing," *Appl. Opt.*, vol. 26, pp. 5321-5325, 1987.
- [22] B. Ruth, "Superposition of two dynamic speckle patterns - an application to non-contact blood flow measurements," *J. Mod. Opt.*, vol. 34, pp. 257-273, 1987.
- [23] B. Ruth, "Non-contact blood flow determination using a laser speckle technique," *Opt. Laser Technol.*, vol. 20, pp. 309-316, 1988.
- [24] R. Bonner and R. Nossal, "Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue," *Appl. Opt.*, vol. 20, pp. 2097-2107, 1981.
- [25] B. Ruth, "Measuring the steady-state value and the dynamics of the skin blood flow using the non-contact laser method," *Med. Eng. Phys.*, vol. 16, pp. 105-111, 1994.
- [26] B. Ruth, J. Schmand and D. Abendroth, "Non-contact determination of skin blood flow using the laser speckle method: application to patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and to type-I diabetics," *Lasers Surg. Med.*, vol. 13, pp. 179-188, 1993.
- [27] B. Zheng, C. M. Pleass and C. S. Ih, "Feature information extraction from dynamic biospeckle," *Appl. Opt.*, vol. 33, pp. 231-237, 1994.
- [28] J. Ohtsubo and T. Asakura, "Velocity measurement of a diffuse object by using time-varying speckles," *Opt. Quant. Electron.*, vol. 8, pp. 523-529, 1976.

- [29] A. F. Fercher and J. D. Briers, "Flow visualization by means of single-exposure speckle photography," *Opt. Commun.*, vol. 37, pp. 326-329, 1981.
- [30] J. D. Briers and A. F. Fercher, "A laser speckle technique for the visualization of retinal blood flow," *Proc. SPIE*, vol. 369, pp. 22-28, 1982.
- [31] J. D. Briers and A. F. Fercher, "Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography," *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 22, pp. 255-259, 1982.
- [32] J. D. Briers, "Optical filtering techniques to enhance speckle contrast variations in single-exposure speckle photography," *Optik*, vol. 63, pp. 265-276, 1982.
- [33] A. F. Fercher, M. Peukert and E. Roth, "Visualization and measurement of retinal blood flow by means of laser speckle photography," *Opt. Eng.*, vol. 25, pp. 731-735, 1986.
- [34] J. D. Briers and S. Webster, "Quasi-real time digital version of single-exposure speckle photography for full-field monitoring of velocity or flow fields," *Opt. Commun.*, vol. 116, pp. 36-42, 1995.
- [35] J. D. Briers and S. Webster, "Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow," *J. Biomed. Opt.*, vol. 1, pp. 174-179, 1996.
- [36] N. Takai, "Contrast of time-averaged image speckle pattern for a vibrating object," *Opt. Commun.*, vol. 25, pp. 31-34, 1978.
- [37] G. Dacosta, "Optical remote sensing of heartbeats," *Opt. Commun.*, vol. 117, pp. 395-398, 1995.
- [38] S. L. Jacques and S. J. Kirkpatrick, "Acoustically modulated speckle imaging of biological tissues," *Optics Letts.*, vol. 23, pp. 879-881, 1998.
- [39] J. B. Abbiss, T. W. Chubb, and E. R. Pike, "Laser Doppler anemometry," *Opt. Laser Technol.*, vol. 6, pp. 249-261, 1974.

- [40] J. D. Briers, "Laser Doppler and time-varying speckle: a reconciliation," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 13, pp. 345-350, 1996.
- [41] C. Riva, B. Ross, and G. Benedek, "Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries," *Invest. Ophthalmol.* vol. 11, pp. 936-944, 1972.
- [42] T. Tanaka, C. Riva, and I. Ben-Sira, "Blood velocity measurements in human retinal vessels," *Science*, vol. 186, pp. 830-832, 1974.
- [43] M. D. Stern, D. L. Lappe, P. D. Bowen, J. E. Chinovsky, G. A. Holloway, H. R. Kaiser, and R. L. Bowman, "Continuous measurement of tissue blood flow by laser Doppler spectroscopy," *Am. J. Physiol.*, vol. 232, pp. 441-448, 1977.
- [44] A. N. Obeid, D. M. Bogget, N. J. Barnett, G. Dougherty and P. Rolfe, "Depth discrimination in laser Doppler skin blood flow measurement using different lasers," *Med. and Biol. Eng. and Comput.*, vol. 26, pp. 415-419, 1988.
- [45] P. Starukhin, S. Ulyanov, E. Galanzha and V. Tuchin, "Blood-flow measurements with a small number of scattering events," *Appl. Opt.*, vol. 39, pp. 2823-2830, 2000.
- [46] Y. Aizu and T. Asakura, "Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow," *Opt. Laser Technol.*, vol. 23, pp. 205-219, 1991.
- [47] D. A. Zimnyakov, P. L. Maksimova and V. V. Tuchin, "Controlling optical properties of biological tissues: II. Coherent optical methods for studying the tissue structure," *Opt & Spectrosc.*, vol. 88, pp. 936-943, 2000.
- [48] Christopher G. Rylander, Oliver F. Stumpp, Thomas E. Milner, Nate J. Kemp, John M. Mendenhall, Kenneth R. Diller, A. J. Welch, "Dehydration mechanism of optical clearing in tissue *Journal of Biomedical Optics*," vol. 11, no. 4, pp. 041117, 2006.

- [49] V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. H. Mavlutov, and A. A. Mishin, "Light propagation in tissues with controlled optical properties," *J. Biomed. Opt.* vol. 2, pp. 401-417, 1997.
- [50] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, "Reversible dissociation of collagen in tissues," *J. Invest. Dermatol.* vol. 121, no. 6, pp. 1332 - 1335, 2003.
- [51] M. R. Prausnitz, "Microneedles for transdermal drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, pp. 581-587, 2004.

## ABSTRACT

### Study about Contrast Enhancement of Laser Speckle Imaging using Optical Clearing Agent

Son, Taeyoon

Dept. of Biomedical Engineering

The Graduate School

Yonsei University

Laser speckle imaging modality is one of widely used methods to evaluate blood flow because of full-field, real time, non-contact, non-invasive and its simplicity. However, laser speckle imaging has a limitation in the evaluation of subcutaneous blood flow due to its low perfusion image contrast. In many studies, various methods have been tried to enhance the image contrast. Such methods presented positive results in some degree. However, it could not be fundamental solutions due to low penetration depth of lasers restricted by optical tissue scattering property. This study suggests a method to enhance the perfusion image contrast of laser speckle imaging modality by increasing the penetration depth of lasers. An optical clearing agent was topically applied on skin treated with micro-needle roller in order to reduce the time period of optical tissue clearing and therefore, enhance the penetration depth of laser. In this study, we investigated the effect of glycerol and micro-needling methods in the contrast enhancement of laser speckle perfusion image and presented the results of *in-vitro* and *in-vivo* animal experiment.

---

Key Words : Laser speckle imaging, contrast enhancement, perfusion image, optical clearing, micro-needle