



基于空间频域滤波高动态光学投影层析的斑马鱼 三维成像研究*

李秉尧 张艳婷 林秋萍 王 磊 黎思娜 韩定安 钟俊平 王茗祎 曾亚光**

(佛山科学技术学院物理与光电工程学院, 佛山 528000)

摘要 本文提出了一种基于空间频率滤波的多曝光融合的高动态投影层析三维成像方法, 实现了活体斑马鱼 (17 mm × 4 mm, 最大厚度为 2.33 mm, 最小厚度为 0.29 mm) 的三维结构成像. 通过相机采用不同曝光时间记录系列吸收图像, 将每张图像取变换到频域去除低频后, 将各张滤波后叠加并逆傅里叶变换回空域, 对变换后的图像进行归一化处理, 最终获得高动态图像. 在每个投影角度获得这种高动态吸收投影图像, 进行滤波反投影算法重建, 获得高动态的整条斑马鱼三维结构信息. 实验成像结果表明, 这种空间频率滤波多曝光融合的高动态光学投影层析三维成像研究, 可以获得复杂结构更丰富的空间信息, 对斑马鱼等模式生物早期胚胎生长发育进程进行监测和定量评估有一定的应用前景.

关键词 光学投影层析成像, 高动态范围, 频域, 三维结构成像

中图分类号 O439, Q-334

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0088

光学投影层析成像 (optical projection tomography, OPT) 是 2002 年由 Sharpe 等^[1] 在《科学》(Science) 首次提出具有微米级别空间分辨率的新兴三维显微成像技术, 其可对有效探测范围为 1~10 mm 的小生物胚胎吸收投影成像或荧光成像. 最近几年来, OPT 在生物形态结构发育^[2-3]、生理反应^[4-5] 与基因表达^[6-8] 等方面的研究运用取得了很多成果. OPT 新的发展是通过与细胞运动学分析、激光散斑等技术结合, 实现了三维血流重建^[9-11], 其在生物成像中有广泛的应用空间和发展潜力. 斑马鱼是一种广泛用于研究的模式生物样品, 对其进行三维层析成像, 在胚胎发育、循环系统机理研究有重要的研究价值. 但是采用 OPT 技术实现对整条斑马鱼进行成像, 有一个现实的应用问题需要解决: 斑马鱼全身的厚度不均 (即: 鱼头部厚度大, 光吸收强, 需要曝光时间长; 尾部比较薄, 光吸收弱, 需要曝光时间短), 导致产生的吸收差异比较大. 单次曝光下, 相机的动态范围不够, 导致图像顾头而不能顾尾, 无法实现对整条斑马鱼清晰成像^[12]. 因此如何扩展 OPT 成像的动态范围是成像要解决的关键科学问题. 最近几年来,

研究者提出了一些方法实现高动态 OPT 成像: Fei 等^[12] 运用图像压缩的方法实现了高动态 OPT (HDR-OPT); Wang 等^[13] 采用归一化算法对不同区域曝光时间进行修正, 再进行高动态成像; Yang 等^[14] 采用 OMP 算法对各曝光时间的原始图像进行重构再进行高动态处理. 针对斑马鱼的厚度是次序变化和饱和区域基本连通的特点, 本文提出了一种空间滤波的方法实现高动态 OPT, 其可有效拓宽成像动态范围, 实现具有更高衬比度细节的完整三维结构成像. 研究的思路是: 对每个投影角度位置, 采用不同曝光时间记录吸收图像, 将每张

* 国家自然科学基金 (61771139, 61605026, 81601534, 61805038, 61705036), 广东省自然科学基金 (2017A030313386), 佛山科学技术学院高层次人才科研启动项目 (gg040988), 佛山科学技术学院高层次人才及岭南学者科研启动项目 (肿瘤血管的多参数可视化研究, 糖尿病视网膜微血管功能成像研究), 2019 年研究生自由探索基金 (2019ZYTS45), 广东省大学生“攀登计划”专项资金 (pdjh2019b0508) 和佛山科学技术学院大学生创新创业训练计划 (XJ2019253, XJ2019243) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 13590668561, E-mail: zeng.yg@163.com

收稿日期: 2019-04-16, 接受日期: 2019-08-26

图像取反处理后, 从空间域变换到频域, 进行低频滤波后前后叠加, 逆傅里叶变换回来并归一化处理, 从而获得一张融合后高动态图像. 这种方法的本质是通过滤除掉低频空间信号, 去除过度曝光产生的整体信号. 在每个投影角度获得这种高动态投影图像, 再进行滤波反投影算法重建, 获得样品完整的、具有更高对比度的三维结构信息. 实验结果对比表明, 我们的方法比单次 OPT 成像有更大的动态范围, 其更加精细、更贴近人眼对样品的辨识程度.

1 高动态OPT成像方法

实现高动态 OPT 需要在每个投影方向上获得高动态的吸收图像. 为将 N 张同场景下曝光时间线性递增的图像融合, 各部位的吸收图像经历了一个从低吸收到过饱和的系列图像. 其中核心问题在于如何去除吸收图像中饱和部分的图像, 保留图像中有用的信息.

实验中, 相机根据程序设定按照线性增加的曝光时间, 记录同一投影位置系列的吸收图像 (实验中, 在每个位置记录 10 张图像). 为了消除在记录过程中生物样品抖动产生的图像错位, 利用图像互相关方法对相邻两帧图像移动位置进行纠正, 消除生物样品的抖动. 消抖后的图像按曝光时间从小到大排列, 将每一帧图像从空间域变换到频域分析:

$$F_n(u, v) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f_n(x, y) e^{-i(ux+vy)} dx dy \quad (1)$$

$f_n(x, y)$ 是相机记录的不同曝光的照片, $F_n(u, v)$ 是其二维傅里叶变换后得到的频域图像; 为了滤除掉饱和的光强, 使用其表达式对信号进行零频滤波; 方法如下:

$$I(x, y) = \text{IFFT}(R(u, v)F(u, v)) \quad (2)$$

$$R(u, v) = \begin{cases} 0, & F(u, v) \leq R_0 \\ 1, & F(u, v) > R_0 \end{cases} \quad (3)$$

$I(x, y)$ 是经滤波后逆傅里叶变换后的图像; $R(u, v)$ 是选择零频滤波函数; $R_0 = \sqrt{u^2 + v^2}$ 是零频的滤波范围, 表示点 (u, v) 到滤波器中心的距离, 即为在频谱上将零频分量滤去的孔径大小, 可根据实际情况进行修改, 在本文实验中 R_0 的取值为 0.0022. 实现滤波操作的方法如图 1 所示: 对于曝光过多而产生的饱和区域, 其空间频率的信号主要集中在零频部分, 去除零频其实就是将饱和区域的信号进行去除. 在滤波后的各个图像进行叠加, 并进行归一化处理. 为避免融合后图像出现像素值为负的情况, 将得到的融合图像加上其像素值最小值的绝对值, 使得图像数值本底抬高, 再除以图片的最大值, 实现归一化操作. 归一化处理可消除斑马鱼的扁平形状、不同角度光强的差异对图像的影响, 这样能够获得采集每个投影方向不同曝光时间图像高动态吸收的融合图像.

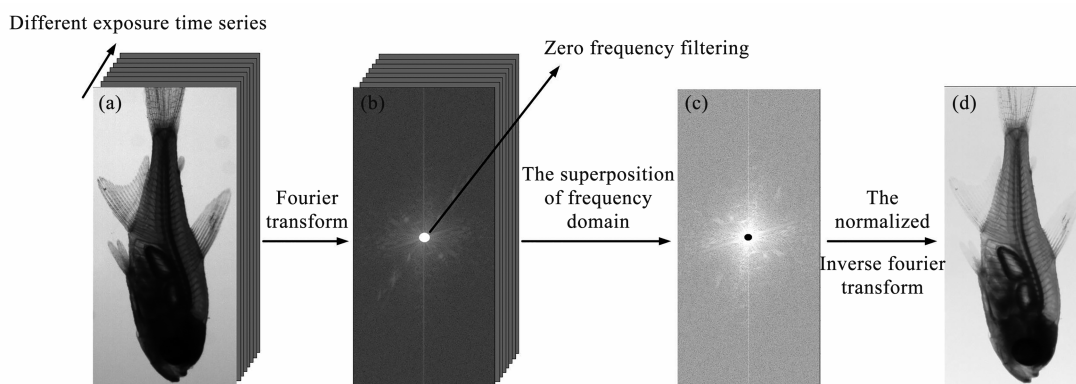


Fig. 1 High dynamic OPT image processing method

(a) The original image sequence arranged from smallest to largest by exposure time; (b) The two-dimensional Fourier transform image sequence corresponding to (a) time series after zero-frequency filtering; (c) The frequency domain image obtained by (b) superposition; (d) The high dynamic image obtained by normalization of (c) after inverse Fourier transform.

在其他每个投影角度位置上按照角度如上操作, 可以获得各个角度的高动态范围投影图像

$P(l, \theta)$ (θ 在 $0 \sim 2\pi$ 之间). 样品一个断层面的反投影函数值为 $Z(x, y)$, 由滤波反投影算法:

$$Z(x,y) = \int_0^\pi \int_{-\infty}^{+\infty} P(l,\theta) * c(l) \times \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - l) dl d\theta (4)$$

其中, $c(l)$ 是 S-L 滤波函数. 由此可以实现三维的吸收投影层析成像, 在基于 Amira 环境下对完整的三维组织结构进行可视化、操纵控制.

2 实验系统

为验证我们方法的有效性, 对生长了 35 d 的活体斑马鱼 (17 mm×4 mm, 最大厚度为 2.33 mm, 最小厚度为 0.29 mm) 进行高动态三维成像, 样品通过适量的稳定剂麻醉, 以减少运动对成像的影响. 基于多曝光融合的高动态 OPT 斑马鱼三维成像系统如图 2 所示. 一束白光经准直扩束镜后, 照射在样品上, 样品固定在填充了 1.3% 冷琼脂 (凝胶温度为 24~29℃) 的聚全氟乙丙烯管 (折射率为 1.341~1.349) 中; 聚全氟乙丙烯管固定在步进电机上, 并放置在充满折射率匹配液的匹配池中. 在步进电机的转动下, 样品以每步 1.8° 沿电机转轴中心旋转一周. 样品在每一个角度上的光学信息均经

远心镜头 (Edmund optics 58428, 放大倍率为 0.3×), 被 CMOS 工业相机 (Basler, acA2000-340 kmNIR, 像素为 2 048×1 088, 最低曝光时间为 24 μs, 最低曝光时间的默认帧率为 42 fps) 接收. 相机为 8 bit 的读数设置, 图像的强度值在 0~255 之间. 在本实验中, 其成像范围为 700×900 pixel², 采用美国国家仪器公司 (NI) 的高速图像采集卡与多功能数据采集卡, 连接上位机、步进电机、CMOS 相机等硬件设备. 整套实验装置放置在精密隔振平台上. 实验样品为斑马鱼 (长度约 17 mm, 使用 MS-222 鱼用专用安定剂对样品进行麻醉处理). 曝光时间和梯度的选择, 应使得所选取的不同曝光时间下对应动态范围的并集涵盖了整个场景的动态范围. 同样的, 由于每个曝光与相邻曝光之间的动态范围可能出现交集, 为尽量避免信息冗余, 我们要选择合适的曝光梯度^[15]. 在本文实验中, 每个角度在 0.06~1.50 ms 之间采集 10 张线性曝光时间的投影图像, 共采集 200 个角度, 分别在 LabVIEW 和 MATLAB 环境下实现图像采集和图像处理.

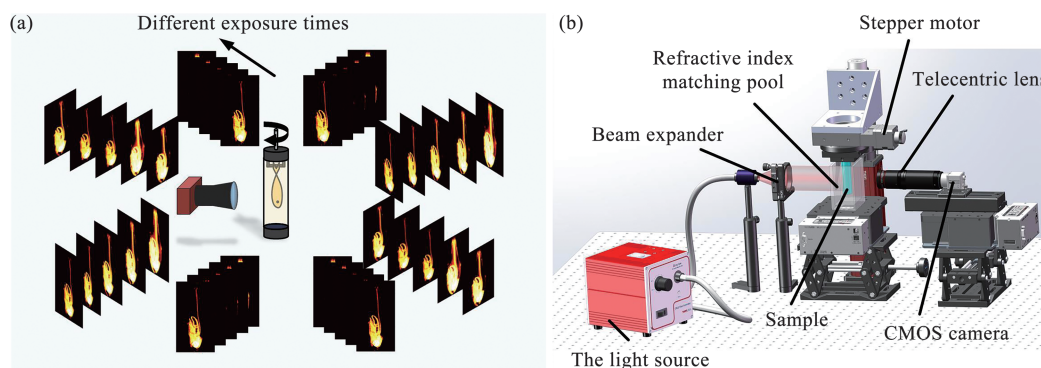


Fig. 2 High dynamic OPT imaging principle device diagram

(a) Schematic diagram of imaging method with high dynamic OPT imaging; (b) Experimental device diagram of high dynamic OPT imaging.

3 实验结果与分析

根据我们的成像方法提出的图像处理可获得高动态且精细的结构吸收图像信息. 运用该方法得到的单一角度下的高动态图像所需的时间约为 0.79 s. 得到各个角度的图像实现三维重建时, 若用 GPU 进行加速, 速度会提高 100 倍左右. 图 3 给出了斑马鱼在 $\theta=0^\circ$ 时不同曝光的原始图像、高动态图像和相应位置的信号对比. 图 3a-c 是相机设置曝光时间 0.06 ms 到 1.5 ms 采集到的原始图像. 在短曝光时

间下, 斑马鱼的鱼鳍部分 (图 3a, 红圈 1、3) 非常清晰, 经过归一化处理, 图像的像素值强度的读数范围在 0.254~0.380 之间; 图像中鱼的脊椎 (红圈 2)、头部和肚子 (红圈 6) 都不清楚, 其图像强度范围都低于 0.157 以下, 尤其头部区域图像强度均低于 0.078, 没有进行投影成像的意义. 但是在较长曝光时间的作用下, 相机的曝光时间设置为 0.54 ms, 图中鱼鳍的读数都已经饱和了, 鱼鳍区域 (图 3a, 红圈 1、3) 的图像强度都是 1, 达到图像强度最大值; 这时鱼的脊椎部分 (红圈 2) 的读

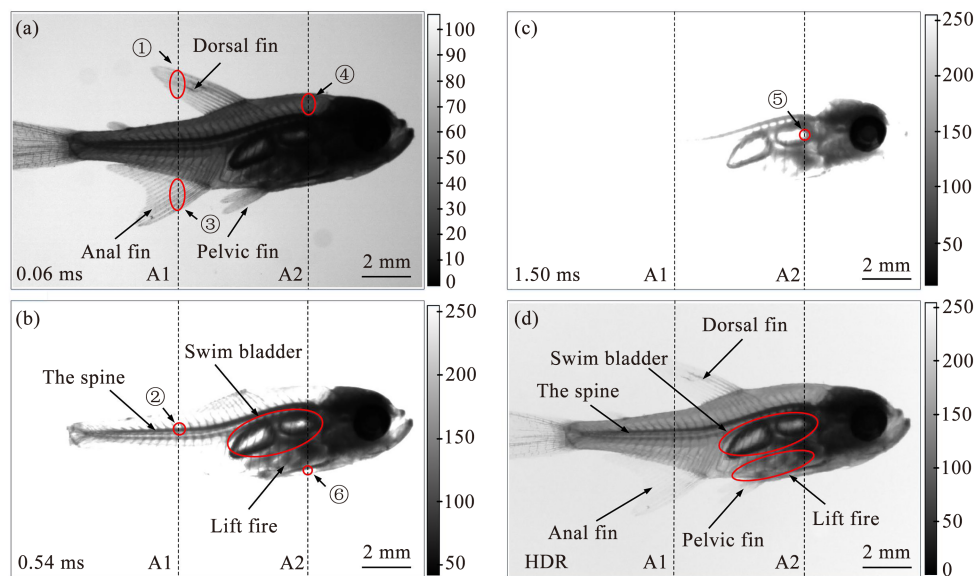


Fig. 3 Comparison of images with different exposure times and high dynamic images

(a) The original image of zebrafish at a minimum exposure time of 0.06 ms. The dorsal fin on ring 1 and anal fin on ring 3 in the figure can be clearly observed, and the protruding spine of ring 4 can be distinguished; (b) The original image of zebrafish at the exposure time of 0.54 ms, and fish bones corresponding to circle 2 and fish intestines of circle 6 can be clearly observed; (c) The original image of zebrafish at a maximum exposure of 1.50 ms, and the structural layers of fish head and swim bladder can be observed; (d) The high dynamic image of zebrafish, which expands the dynamic range of the image and allows simultaneous observation of information in different regions.

数在 0.369~0.475 之间, 其中主脊椎和侧支架骨头的平均读数分别为 0.369 和 0.475, 有较大的图像对比度; 鱼头和鱼肚部分 (红圈 6) 的图像强度比较低, 各个部位的吸收差异不大. 图 3c 是曝光时间在 1.5 ms 情况下的图像, 这是 10 帧图像的最大曝光时间. 从图中可以看出, 鱼的其他部位基本都饱和了, 鱼的头部有比较清晰的吸收对比差异. 从图 3a~c 中针对不同部位的斑马鱼成像可设置不同的曝光时间, 在合适的曝光时间内, 不同部位的吸收才有较大差异. 利用上述成像方法的空间频率滤波的办法, 我们获得将 10 张吸收图像进行融合后的高动态的吸收图像 (图 3d). 从图中我们看到, 鱼鳍、鱼脊椎、鱼鳔和鱼头部分都有比较清晰的图像. 根据归一化后的读数, 在图中标识的范围内, 鱼鳍部分 (红圈 1、3) 的平均图像强度在 0.82, 鱼脊椎 (红圈 2) 部分的平均图像强度在 0.54, 鱼鳔部分 (红圈 5) 平均图像强度在 0.61, 鱼头部分的平均图像强度是 0.22. 通过融合图像样品的尾部血管信号, 按照参考文献 [16] 定义的血管分辨率公式, 我们可以进一步求得血管的分辨率为 $14.9 \mu\text{m}$. 融合后的图像有比较高的细节展示能力, 图像的动态范围获得较大的提高. 由于不同曝光下相机捕获

的动态范围区间不同, 即在各个曝光下相机都捕获了整个场景动态范围中的一部分, 在选择合适的曝光区间情况下, 不同曝光下场景动态范围的并集即可涵盖了整个场景的动态范围. 通过得到样品不同曝光下的图片, 可以进一步得到不同区域的最佳成像区间. 基于频域滤波的高动态融合算法, 将其过曝而形成的饱和和联通区域滤掉, 即保留不同曝光下样品最佳的成像信息, 进一步融合得到的高动态图像, 可容纳更大动态范围的样品细节信息.

图 4 为图 3 中用虚线标示的鱼鳍 (图 4a) 和鱼肚部位 (图 4b) 的归一化图像信号曲线. 在不同曝光时间条件下获得图像的信号与融合后图像的对比, 这些不同位置的信号强度对比跟圈定位置的图像强度是一致的. 从图 4 可以看出, 融合后的图像具有更大的动态范围, 使得无论是厚度为 2.33 mm 的头部还是厚度为 0.29 mm 的尾部鱼鳍部分都可以清晰地显示出来, 得到更高的成像探测深度, 实现整条斑马鱼的成像. 高动态范围 OPT 图像可弥补传统 OPT 动态范围限制, 其图像中呈现出鱼鳍、鱼尾这些相对鱼脊髓透明的组织结构, 如鱼眼、鱼鳔、鱼肠等等, 整个样品呈现的结构信息较为精细, 更加符合人眼识别特点, 为三维重建提供了信

息较为丰富的投影图像.

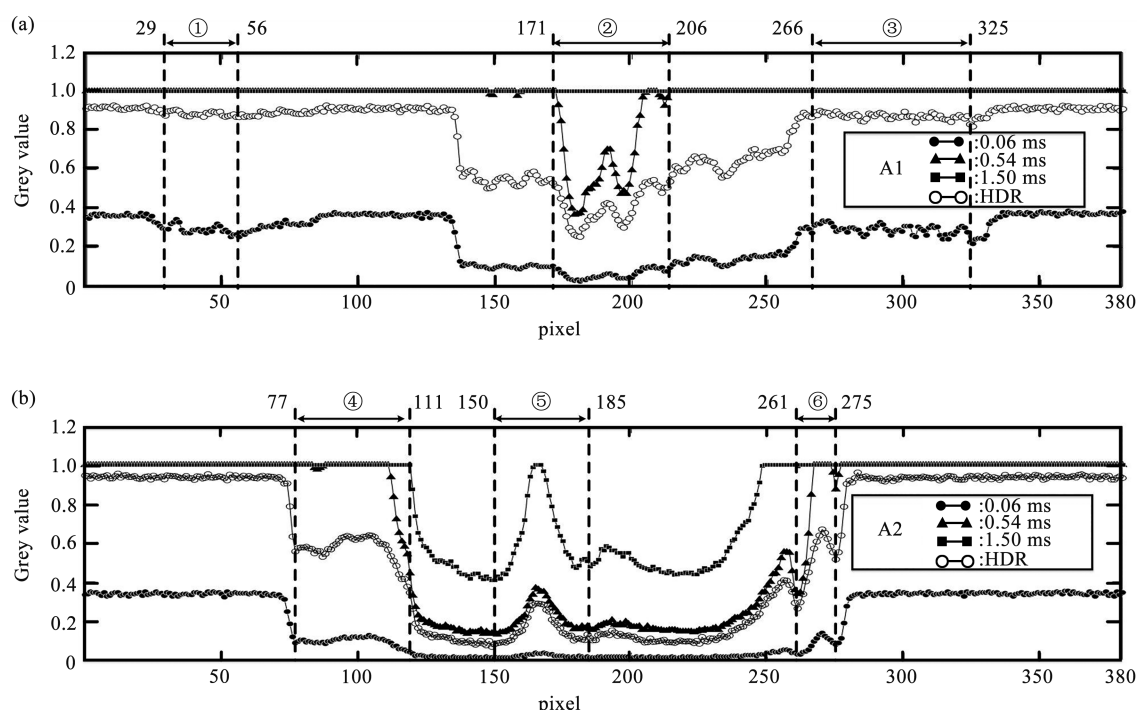


Fig. 4 Comparison of A1 and A2 gray values of different exposure time images in Figure 3

(a), (b) are the normalized signal curve at A1, A2 in different images in Figure 3 respectively, including 1 ring is fish fin area, circle is the anal fin of the fish area 3, 4, 6 corresponding circles are to organize shark fin and fish maw. It can be seen from the diagram, the strength of the signal curve of 0.06 ms have evident changes, and the curve of 0.54 ms and 1.50 ms due to the exposure time is too high, the presence of signals is distorted; corresponding spine and swim bladder can be observed at area 2 and 5, 0.06 ms signal curve because of the exposure time is too low, the light can't through, curve is not obvious, and 0.54 ms, 1.50 ms signal curve a significant change can be observed. The curve of the HDR retained the different exposure time the change of the original image information, broaden the dynamic range of the image, can see different parts of the signal curve changes at the same time.

获得每个投影角度位置的二维高动态吸收图像后, 根据滤波反投影成像进行层析成像, 可实现斑马鱼的三维组织结构重建. 每个角度都获得1张融合而成的高动态OPT图像 (共200个角度), 根据公式 (4) 可实现空间切片的重建. 为了显示三维成像的动态范围, 三维可视化结构图通过 Amira 软件将各个重建的切片图像组合. 图 5a~d 是从10个曝光中选出 0.06 ms、0.54 ms、1.02 ms 以及 1.50 ms 曝光下的三维结构重建图. 图 5a 仅有鱼鳍、部分鱼尾信息相对清晰; 图 5b 的三维重建结构图透光性较强的鱼鳍因曝光时间饱和丢失信息, 透光性中等的组织鱼刺相对清晰, 透光性相对较差的鱼脊髓可见大概轮廓; 图 5c 和 5d 中, 鱼脊髓呈现细致丰富的结果, 同时鱼鳃、眼睛的轮廓相对清晰, 但鱼鳍、鱼尾信息丢失严重; 图 5e 高动态 OPT 三

维组织结构重建结果除了可以观察到样品的脊椎结构之外, 对脊椎周围微小骨头的分布, 以及鱼鳃、鱼肠、心脏等结构具有更为细致的可视化. 与传统的 OPT 成像相比, 基于高动态的 OPT 三维成像能获得较为清晰的、具有更高对比度的三维组织结构重建.

在获得了高动态 OPT 后, 可以根据三维重建的斑马鱼的吸收图像来看断层的图像, 基于空间频率滤波融合的高动态 OPT 能获得不同视角下清晰的、精细的高动态 OPT 组织结构切片信息. 在图 6 所示的三个不同方向的切片范围, 取空间坐标 XYZ 某一剖面为例, 图 6a 是当切片沿着 Z 轴倾斜时的剖面, 可以从图中观察到样品的脊椎结构; 图 6b 是 XZ 平面沿 Y 轴方向的切片, 可观察到鱼体的鱼鳃结构、脊椎以及脊椎周围微小骨头的分布. 本

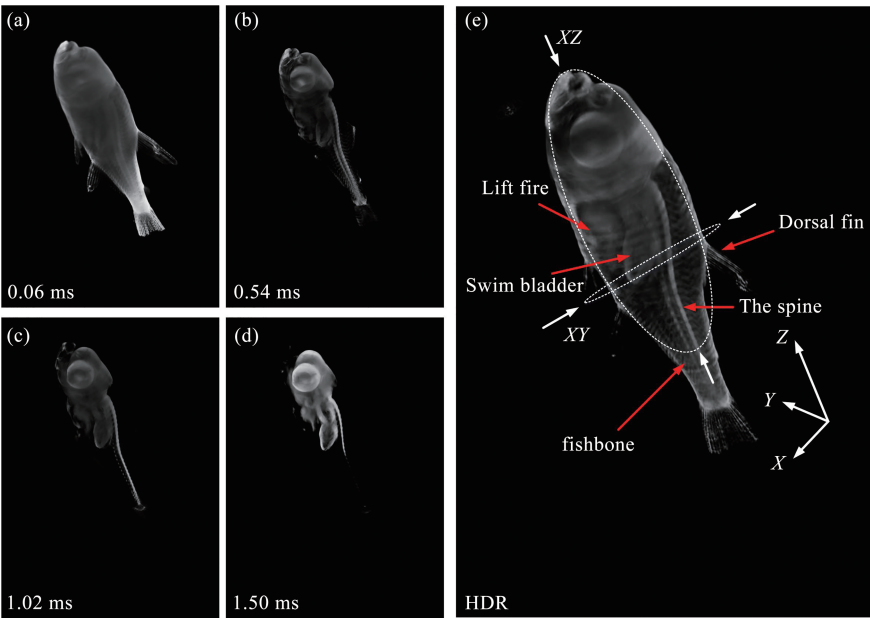


Fig. 5 High dynamic OPT reconstruction structure of zebrafish

(a) The 3d reconstruction image of zebrafish under 0.06 ms exposure time; (b) The 3d reconstruction of zebra fish under 0.54 ms exposure time; (c) The 3d reconstruction of zebrafish under 1.02 ms exposure time; (d) The 3d reconstruction of zebrafish under the exposure time of 1.50 ms; (e) The 3d reconstruction image of zebrafish after high dynamic fusion, the two cross sections XY and XZ identified on (e) are shown in Figure 6.

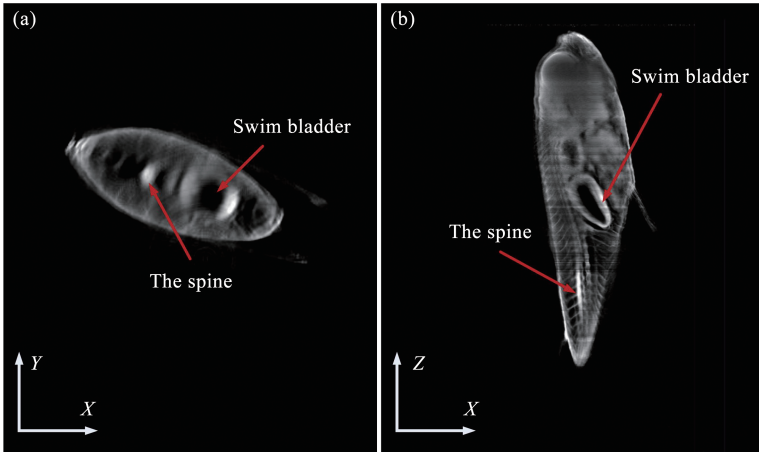


Fig. 6 High dynamic OPT imaging of the chromatogram of the location identified in Figure 5

(a) The XY section diagram obtained in Figure 4e, which is the 499 th slice along the Z -axis of the X and Y plane. (b) The XZ section diagram in Figure 4e; this section is the 156 th section along the Y -axis in the X and Z plane.

方法能分辨鱼脊髓、腹部的鱼鳔、鱼肠等断层结构,可获得更具有高衬比度,具有更丰富的细节结构信息.

利用空间频率零频滤波的方法能够获得较好的高动态成像效果.这个方法有效的主要原因是,当样品的吸收差异比较大时,相机的曝光时间差距比

较大,区域的饱和面积比较大且是连贯的,饱和区域的空间频率信号都集中在零频.这比较适合斑马鱼这种生物样品,因为它的厚度从头部到尾部是连续减少的,即使不同的曝光时间,它的饱和区域图像都是连贯在一起.我们的方法适合这种连续变化的样品.对于厚度不规则的样品,其饱和区域是随

意不规则的, 它的空间频率可能在高频, 本方法可能就不适用了. 同样的, 如果样品含有特别亮或暗的点状结构时, 由于区域较小, 无法形成联通的饱和和区域时, 其将贡献全频谱信息, 单一角度下无法获取该点状结构的信息. 但由于要求三维成像, 即要采集不同角度下的投影图像进行三维重建, 在我们的实验中总共采集了200个角度位置, 因此个别角度下的信息丢失对其三维重建影响不大. 通过对采集到的图像进行零频滤波去除物理学上的饱和, 保留不同曝光下样品不同的动态范围信息, 得到的动态范围交集接近样品实际动态范围的图像. 其有别于软件对图片的调节, 通常软件都是通过提高图片的亮度或对比度来达到视觉清晰的效果, 而相机采集到的图片是由于物理学上相机的动态范围比实际场景中样品的动态范围小, 使得超过相机动态范围的场景信息丢失, 即使通过调节阈值增加对比度, 也无法获得相机动态范围外的信息, 使得到的样品信息不完整.

4 结 论

本论文采用空间频率滤波的方法实现高动态光学投影层析三维成像. 空间频率滤波的核心是将饱和和部分的信号去除, 再将不同吸收变化的信号进行叠加, 实现了不同曝光的图像融合, 获得高动态光强的OPT成像. 相比传统OPT方法, 该方法可使获得样品具有更完整、更高对比度的结构信息. 成像结果表明, 高动态OPT能够实现对斑马鱼进行全身的三维成像, 其对模式生物的早期胚胎生长发育关系与进程有一定的研究价值.

参 考 文 献

- [1] Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, *et al.* Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science*, 2002, **296**(5567):541-545
- [2] Quintana L, Sharpe J. Optical projection tomography of vertebrate embryo development. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, **2011**(6):586-594
- [3] Lee K, Avondo J, Morrison H, *et al.* Visualizing plant development and gene expression in three dimensions using optical projection tomography. *Plant Cell*, 2006, **18**(9):2145-2156
- [4] Varsha K, Susan C, Stein J V, *et al.* Optical projection tomography reveals dynamics of HEV growth after immunization with protein plus CFA and features shared with HEVs in acute autoimmune lymphadenopathy. *Frontiers in Immunology*, 2012, **3**:282
- [5] Arranz A, Dong D, Zhu S, *et al.* In-vivo optical tomography of small scattering specimens: time-lapse 3D imaging of the head eversion process in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, 2014, **4**:7325
- [6] James McGinty, Harriet B. Taylor, Lingling Chen, *et al.* In vivo fluorescence lifetime optical projection tomography. *Biomed. Opt. Express*, 2011, **2**(5):1340-1350
- [7] Miao Q, Hayenga J, Meyer M G, *et al.* Resolution improvement in optical projection tomography by the focal scanning method. *Optics Letters*, 2010, **35**(20):3363-3365
- [8] Miao Q, Yu J, Rahn J R, *et al.* Dual-mode optical projection tomography microscope using gold nanorods and hematoxylin-stained cancer cells. *Optics Letters*, 2010, **35**(7):1037-1039
- [9] Bassi A, Fieramonti L. A label-free approach to vascular imaging of living organisms. *SpineNewsroom*, 2012, doi: 10.1117/2.1201204.004179
- [10] Feng G, Chen J, Lu X, *et al.* Laser speckle projection tomography. *Optics Letters*, 2013, **38**(15):2654-2656
- [11] Liao R W, Wang M Y, Zhang F L, *et al.* Optical projection angiography. *Appl. Phys. Lett.*, 2016, **109**(19): 193702
- [12] Fei P, Yu Z, Wang X, *et al.* High dynamic range optical projection tomography (HDR-OPT). *Optics Express*, 2012, **20**(8):8824-8836
- [13] 王洁琳, 廖日威, 曾亚光, 等. 基于线性化动态范围变换的光学投影层析三维成像. *光学学报*, 2017, **37**(5): 110-117
- [14] Wang J L, Liao R W, Zeng Y G, *et al.* *Acta Optica Sinica*, 2017, **37**(5):110-117
- [15] 杨小平, 肖化. 压缩感知OMP算法应用在高动态光学投影层析成像. *电子技术与软件工程*, 2017, **13**: 74-75
- [16] Yang X P, Xiao H. Electronic technology and software engineering, 2017, **13**:74-75
- [17] 白本督, 范九伦. 高动态范围成像最小包围曝光方法. *西安邮电大学学报*, 2015, **20**(5): 43-47
- [18] Bai B D, Fan J L. *Journal of Xi'an University of Posts and Telecommunications*, 2015, **20**(5):43-47
- [19] Wang M Y, Zeng Y G, Liang X J, *et al.* In vivo label-free microangiography by laser speckle imaging with intensity fluctuation modulation. *J Biomed Opt*, 2013, **18**(12):126001

High Dynamic Optical Projection Tomography Based on Multi-exposure for Three-dimensional Imaging of Zebrafish*

LI Bing-Yao, ZHANG Yan-Ting, LIN Qiu-Ping, WANG Lei, LI Si-Na, HAN Ding-An,
ZHONG Jun-Ping, WANG Ming-Yi, ZENG Ya-Guang**

(School of Physics and Optoelectronic Engineering, Foshan University, Foshan 528000, China)

Abstract In this paper, a multi-exposure fusion high-motion projection tomography three-dimensional imaging method based on spatial frequency filtering is proposed to realize the three-dimensional structure imaging of living zebrafish (17 mm×4 mm, maximum thickness 2.33 mm, minimum thickness 0.29 mm). Our method is to record the series of absorption images by using different exposure time of the camera, transform each image into the frequency domain to remove the low frequency, and then superimpose each filtered spatial frequency signal and inverse Fourier transform back into the air domain, and the transformed image is normalized to obtain a high dynamic image. The high dynamic absorption projection image is obtained at each projection angle, and then reconstructed by a filtered back projection algorithm to obtain highly dynamic three-dimensional structure information. The experimental imaging results show that the multi-exposure fusion high-visibility optical projection tomography three-dimensional imaging study of spatial frequency filtering can obtain more abundant spatial information of complex structures, and the relationship and process of early embryo growth and development of zebrafish monitoring and quantitative assessment have certain application prospects.

Key words optical projection tomography, high dynamics, frequency domain, three-dimensional imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0088

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (61771139, 61605026, 81601534, 61805038, 61705036), Guangdong Natural Science Foundation (2017A030313386), Scientific Research Initiation Project of Foshan University (gg040988), Scientific Research Projects Initiated by High-Level Talents and Lingnan Scholars of Foshan University of Science and Technology (Multi-parameter visualization of tumor blood vessels, and Functional imaging of diabetic retinal microvessels), 2019 Graduate Student Free Exploration Fund Project (2019ZYTS45), Guangdong College Students "Climbing Plan" Special Fund (pdjh2019b0508), Foshan University of Science and Technology College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program Funded Projects (XJ2019253, XJ2019243).

** Corresponding author.

Tel: 13590668561, E-mail: zeng.yg@163.com,

Received: April 16, 2019 Accepted: August 26, 2019