



Doctoral Thesis

## High resolution imaging and optical sectioning by Harmonic Excitation Light Microscopy combined with deconvolution

**Author(s):**

Fedosseev, Roman

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005299725> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No. 16691

**High resolution imaging and optical sectioning  
by Harmonic Excitation Light Microscopy  
combined with deconvolution**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

ROMAN FEDOSSEEV

Master of Applied Mathematics and Physics  
Moscow Institute of Physics and Technology, Russia

born April 11, 1978  
citizen of Russia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. A. Stemmer, examiner  
Prof. Dr. C. Cremer, co-examiner  
Dr. Y. Belyaev, co-examiner

2006

# Abstract

Fluorescence light microscopy is a well-established and widely used analysis tool in life sciences. With tremendous advances in cell biology in recent decades, fluorescence microscopy methods allow one to investigate complex processes in life cells and tissues. However, optical microscopes suffer from limited resolution, which, according to the Rayleigh criterion, amounts to  $\sim 240$  nm for green light and oil immersion objectives with high numerical aperture. Axial resolution of wide-field microscopes is three times poorer. This weakness of conventional light microscopes has motivated the research and development of high-resolution methods in fluorescence microscopy.

In the present work, the method of Harmonic Excitation Light Microscopy (HELM) is further developed. The technique achieves twofold improvement in lateral resolution by using structured illumination pattern and computational processing of the observed images. The method can be easily adapted to different wavelengths and its application to multicolor imaging and colocalization studies is demonstrated. However, poor axial resolution limited application of the

original HELM method to imaging of thick specimens, as the out-of-focus contribution produces blur in the original images and, as a consequence, artifacts in the reconstructed high-resolution images. To overcome this limitation, the out-of-focus contribution is extracted from the original images by deconvolution procedures. Combination of deconvolution methods with HELM produces optical sections with resolution reaching 100 nm.

Special attention is drawn to the presence of noise in the original images and its deteriorating effects on the reconstructed high-resolution images. When the spectra of original images are corrupted by noise, the image reconstruction procedure amplifies high-frequency noise content, producing artifacts in the final images. An approach based on wavelet analysis is implemented in order to filter out noise contribution from the original data. As a result, high-frequency noise content in the original spectra is reduced dramatically, and image reconstruction produces high-resolution images without noise artifacts.

The thesis demonstrates that Harmonic Excitation Light Microscopy, extended by deconvolution and denoising procedures, can be successfully applied to imaging of thick biological specimens in the presence of noise.

# Zusammenfassung

Fluoreszenzmikroskopie ist eine bewährte und weitverbreitete Analysetechnik für Life Sciences. Zusammen mit den enormen Fortschritten in der Zellbiologie ermöglicht die Fluoreszenz-Mikroskopie die Untersuchung von komplexen Prozessen in lebenden Zellen und in Gewebe. Allerdings ist die optische Auflösung eines Mikroskops begrenzt. Gemäss dem Rayleigh Kriterium beträgt sie für grünes Licht und Oelimmersions-Objektive mit hoher numerischer Apertur etwa 240 nm. Die axiale Auflösung eines wide-field Mikroskops ist nicht dreimal schlechter. Diese Schwäche der konventionellen Lichtmikroskope regte die Erforschung und Entwicklung von hochauflösenden Mikroskopiemethoden an.

In dieser Arbeit wird die Methode des Harmonic Excitation Light Microscopy (HELM) weiterentwickelt. Diese Technik verdoppelt die laterale Auflösung durch Verwendung strukturierter Beleuchtungsmuster und numerischer Nachbearbeitung der aufgenommenen Bilder. Die Methode kann einfach auf verschiedene Wellenlängen übertragen werden. Ihre Anwendungen für Multicolor Imaging und

Kolokalisierungstudien werden gezeigt. Durch die schlechte Auflösung in axialer Richtung der ursprünglichen HELM Methode ist das Abbilden von dicken biologischen Proben nur begrenzt möglich. Beiträge von ausserhalb der Fokusebene erzeugen Verschmierungen, was wiederum zu Artefakten in den rekonstruierten hochauflösenden Bildern führt.

Um dieses Problem zu lösen, werden die Beiträge aus nicht fokalen Ebenen durch Dekonvolutionsverfahren extrahiert. Die Kombination von Dekonvolutionsverfahren und HELM ermöglicht optische Sektionierung mit einer Auflösung von 100 nm.

Besondere Aufmerksamkeit wurde auf das Rauschen gelegt, das die Originalbilder behaftet und die Nachbearbeitung beeinträchtigt. Hochfrequentes Rauschen wird durch den Rekonstruktionsprozess noch zusätzlich verstärkt, was zu Artefakten in den hochauflösenden Bildern führt. In einem Ansatz wird versucht durch die Anwendung von einer Wavelet Analyse die Rauschanteile aus den Originaldaten herauszufiltern. Dadurch wird der Anteil an hochfrequentem Rauschen dramatisch reduziert und der Bildnachbearbeitungsprozess erzeugt hochaufgelöste Bilder ohne Artefakte welche auf Rauschen beruhen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Harmonic Excitation Light Microscopy, erweitert durch Dekonvolutionsverfahren und Rauschfilterung, erfolgreich zur Abbildung von dicken biologischen Proben, die mit Rauschen behaftet sind, angewandt werden kann.