

Válaszok Dr. Török Péter opponens kérdéseire

Mindenekelőtt szeretném megköszönni az opponens munkáját, a dolgozat alapos átnézését és a részletes bírálatot. A feltett kérdéseket azok eredeti sorrendjében az alábbiakban igyekszem megválaszolni.

Kérdések/megjegyzések

1. Az idézett hivatkozások nem teljesek, több helyen az irodalom egy részét nem ismeri vagy figyelmen kívül hagyja. Ilyen például a 4.1 pont alatt diszkutált nagyapertúrás lencsék polarizáció módosító hatása, ahol az irodalomban már az 1950-es években leírt módszereket nem ismerteti és ezért olyan eredményeket tulajdonít magának, amit korábban már mások is megkaptak. Ez azonban nem befolyásolja alapvetően kísérleti eredményeinek minőségét.

Válasz: A 4.1 pontban ismertetett eredmények lényegében kísérleti jellegűek. Az OSLO-s szimulációk is alapvetően a kísérletek magyarázatára, alátámasztására szolgáltak. A nagyapertúrás lencsék leképezésének polarizáció-érzékeny elméleti tárgyalása valóban nem szerepel a dolgozatban, mert ebben a témában az én tudományos hozzáadott értékem csekély, és a téma túlságosan nagy és jelentős ahhoz, hogy röviden ismertessem. Itt elsősorban a témához kapcsolódó kísérletek és azok eredményeinek elemzése volt a cél. Valóban pár oldalon érdemes lett volna kitérni az elméleti háttérre, de úgy gondoltam, ezt röviden nem tudom összefoglalni és a dolgozat későbbi része nem ad az elmélethez új eredményt.

2. Annak dacára, hogy egy MTA doktori értekezés a szerző teljes munkásságát hivatott értékelni, jobban szerettem volna egy koherensebben kidolgozott dolgozatot olvasni. Tisztában vagyok azzal azonban, hogy ezen kritika majdnem az összes doktori dolgozatot illetheti.

Válasz: A dolgozatban csak azokat a kutatási eredményeimet igyekeztem összefoglalni, amelyek a diffrakciós határnál jobb térbeli feloldást biztosítanak. A korai eredmények valóban akkor születtek, amikor a feloldás és mélységélesség együttes javítása volt a fő célkitűzés. Később a hangsúly átkerült a mikroszkópiára és a biológiai minták tanulmányozására. A dolgozat írásánál én is éreztem, hogy ez a váltás zökkenést okoz a dolgozat menetében. Mivel számos ötlet (pl. kettősen törő lemez használata) átfed a litográfiai és mikroszkópiai területek között, nem szűkítettem tovább a témát. A 4.7 fejezet valóban kilóg a többi közül, mert szoros értelemben nem ad szuperrezolúciós térbeli feloldást. Azért került bele a dolgozatba, mert ugyan a fluoreszcencia anizotrópia mérések térbeli feloldása nem haladja meg a diffrakciós küszöböt, de egymolekula szinten ad információt a lokális környezetről. A bírálóval egyetértve ezt a fejezetet talán kihagyhattam volna.

3. Az ábrák minősége sokszor nem elégséges, és azokat sajnos a szerző legtöbbször angolul iratozta fel (néhány esetben nyelvtani vagy helyesírási hibával).

Válasz: A dolgozatban igyekeztem a képeket/ábrákat egységes formátumban beilleszteni, azaz egységesen három (fél, háromnegyed vagy egész) tükörméretet használtam és az ábrák döntő részét az eredeti cikkekből változtatás nélkül vettem át. Ez magyarázza, hogy a legtöbb ábra az eredeti angol felirattal szerepel.

4. A szerző többször hasonlítja a STED és SMLM mikroszkópos módszerek felbontását a Rayleigh felbontáshoz. Rayleigh két csillag teleszkópos felbontásához szükséges szöggel

definiálta a felbontási határt, úgy, hogy a két csillag akkor bontható fel, ha az egyik csillag PSF-jának maximuma legalább egybe esik a másik PSF első minimumával. Abbe később ezt a határt átfoglalmazta úgy, hogy a szög helyett az intenzitás PSF rádiuszát definiálta felbontási minimumnak. Mindkét definíciónak a közös eleme az, hogy az optikai rendszert intenzitásában lineárisnak tekintik. Ezzel szemben mind a STED, mind a SMLM módszerek intenzitásában nemlineárisak. Kérem a szerzőt, hogy válaszában elemezze, a szuperrezolúciós módszerek nemlinearitásának szerepét az eredeti szerzők (Hell, Betzig etc.) által leírt maximálisan elérhető felbontás elérésében, illetve, hogy ezek a felbontás értékek milyen körülmények között hasonlíthatók jogosan a Rayleigh/Abbe felbontással.

Válasz:

Válaszomban elsősorban a lokalizációs módszerre szeretnék kitérni.

A Rayleigh, Sparrow, Maréchal, Abbe feloldási küszöbök tárgyalása során a PSF tipikusan kellően túlmintavételezett mind térben, mind intenzitásban. Térbeli profilja tisztán kirajzolódik, továbbá a zajtól is gyakran eltekintünk. Ez a modell alkalmazható a csillagok leképezésénél (megfelelő követő mechanikát használva) vagy klasszikus fluoreszcens mikroszkópiában, mert lényegében tetszőleges ideig tudunk exponálni és kellően sok fotont tudunk összegyűjteni. A fotonszám csökkenésével azonban a fenti kritériumok nem feltétlenül teljesülnek, ezért a feloldási küszöbre klasszikusan használt definíciók alkalmazhatósága korlátozott. A SMLM-ben tipikusan 5–50 ms expozíciós időket használunk, mert ekkora a fluoreszcens festék ON állapotának élettartama. Ennyi idő alatt a molekula pár tízezer fotont bocsát ki és a detektor ebből pár ezret gyűjt össze. A PSF-et 2D pixelizált detektor rögzíti. A lokalizációs módszerben a lokalizációs pontosság [1] függ a kamera pixelméretének és PSF méretének hányadosától. Kis értékek esetén (nagy nagyítás) a detektált fotonok túl sok pixelre esnek, lecsökkentve ezzel az egyes pixeleken a jel/zaj viszonyt. Extra nagy hányados esetén az összes foton egy pixelre esik, így a lokalizáció nem végezhető el. Megmutatható, hogy az ideális arányszám 1 körül van. Ebben az esetben a PSF struktúrája nem feloldható, hiszen lényegében 5x5 pixelre esik az egész PSF, ezért a hagyományos feloldási küszöbre használt definíciók közvetlenül nem alkalmazhatók. Például a Rayleigh kritériumnál az első minimum helye nem határozható meg. Érdeemes azt is megemlíteni, hogy nagy numerikus apertúrák esetén a PSF alakja eltér az Airy-féle elhajlási képtől és közelít a Gauss-eloszláshoz [2]; ezért sem használható a Rayleigh feloldási küszöb.

Ideális esetben az SMLM technika alkalmazásánál a fluoreszcens molekulák időben és térben szétválasztva sugároznak, azaz térbeli szeparációjuk nem probléma, a molekulák képeinek távolsága nagyságrenddel nagyobb, mint a PSF mérete, ezért a Rayleigh-féle feloldási küszöb nem alkalmazható. Azonban sűrűn festett biológia mintáknál előfordulhat, hogy olyan képkockákat is szeretnénk kiértékelni, amelyeken átfedő PSF-ek vannak. Ekkor több Gauss-függvényt illeszthetünk a detektált foltra. A függvények száma lehet előre determinált, de függhet a folt paramétereitől (intenzitás, ellipticitás) is. Ennek eldöntése, azaz az optimális algoritmus kiválasztása (a lehető legtöbb valós lokalizáció meghatározásához) erősen függ a mintától, és megítélésem szerint jelenleg empirikus jellegű.

A lokalizációs módszerek térbeli feloldásaként gyakran a lokalizációs pontosságot adják meg. Egy mérési sorozatban a lokalizációs pontosság alapján sorba rendezhetjük a molekulákat és tetszés szerinti küszöböt beállítva akár 5 nm-es pontossági határt is beállíthatunk. Azonban ez az elfogadott lokalizációk számának drasztikus csökkenéséhez vezet. Meg kell említeni, hogy a gyakorlatban többnyire a mintában lévő struktúrák feloldása, láthatóvá tétele a cél. Ez a lokalizációs pontosságon túl függ például a lokalizációk számától, sűrűségétől. Hosszabb mérési idővel növelhető a lokalizációk száma, de ez tipikusan a térbeli drift növekedésével jár

együtt. A jelölés sűrűségét a mintavételezési tétel figyelembevételével érdemes megfontolni. A térbeli frekvencia növelésével a lokalizációk számát érdemes növelni, de a nagy jelölési sűrűség az átfedő PSF-ek számának növeléséhez vezet. A mérés ezen feltételek figyelembevételével egy állandó optimalizálási folyamatot jelent, amit mintáról mintára (nem csak a festéktől függően) kell elvégezni.

5. A testSTROM esetén a szerző leírja, hogy a PSF-nak egy képtéri pozíciótól független hengerszimmetrikus eloszlást tételezett fel. Ezen döntést azzal indokolta, hogy a képtér, ill. látótér mérete kicsiny. Azt is kijelenti, hogy az OSLO nevű programot használta a képalkotás szimulációjára. Ezzel kapcsolatos kérdéseim a következők:

a. Egy optikai tervező program csak annyira képes valósághű modellezésre, amennyire a modellezendő optikát valósághűen írjuk le. Ez egy alapvető probléma minden mikroszkópos optikai rendszer modellezésénél. Jól tudott az is, hogy nagyapertúrás objektívjaik receptje (prescription) minden lencsegyártó vállalat legdrágábban őrzött titka.

Általános válasz: Valóban, minden OSLO-s szimulációnál kérdéseket vet fel az optikai rendszer definiálása (geometriai paraméterek, anyagi állandók stb.) és kapcsolata a tényleges rendszerrel, mert a cégek nem adják meg, hogy melyik objektívhez melyik szabadalom tartozik. Továbbá a szabadalmak nem adják meg az összes releváns információt, és tapasztalatom szerint valóban tartalmazhatnak nyilvánvalóan hibás adatokat. Ezért az OSLO-s szimulációkat a kutatásaim során elsősorban a kísérleti eredmények alátámasztására alkalmaztam. A levont következtetések a kísérleti eredményekkel együtt állják meg a helyüket. Mélyebb, elméleti optikai számításokat nem végeztem, azok kívül esnek a dolgozat témáján.

Kérdésem tehát, hogy hogyan modellezte a szerző a nagyapertúrás objektív lencsét a 4.4.4-es ábra leírása körüli értekezésben. Arra is kíváncsi lennék, hogy a tubuslencsét hogyan modellezte, és mik voltak a főbb feltételek a modellben kiválasztott tubuslencse használatára.

Amennyiben az objektív lencse ugyan az volt, mint a kromatikus hiba leírásánál tárgyalt objektív, akkor kérdezem, hogy a 136-os szabadalomban megadott lencsét hogyan optimalizálták, hiszen az tudható, hogy japán szabadalmakban leírt lencsék üvegeire a törésmutatót és Abbeszámot mindig annyira megváltoztatják, hogy a lencse eléggé messze legyen az optimális beállítástól, azaz a szabadalomban leírt megvalósítás (embodiment) gyakorlatilag használhatatlan legyen.

Válasz: A szimuláció első lépéseként olyan szabadalmat kerestem, amelyben valamelyik embodiment paraméterei (gyártó, NA , M , WD) megegyeznek az objektíven feltüntetett fizikai paraméterekkel. Egyértelmű, a cég által megerősített vagy hivatkozással alátámasztható bizonyíték nem volt arra, hogy a kiválasztott szabadalomban megadott objektív ténylegesen megegyezik a kísérletek során alkalmazott objektívvel. Az OSLO-s szimulációk során az embodiment táblázatában (1.A ábra) megadott geometriai paraméterekkel dolgoztam. Az anyag definiálásánál a szabadalomban megadott törésmutatót és Abbe-számot használtam, de igyekeztem nem direkt módon definiálni e két adat segítségével a közeget (az OSLO-ban a Model opcióval lehet ezt megtenni), hanem az OSLO-ba beépített katalógusból kerestem ki az anyagokat. Például a 136-os referenciában (US 7199938) megadott szabadalomban a 6. embodimentet használtam és az OSLO-ban az első felület anyagát az OBSOLETE1 katalógusban találtam meg (1.B ábra). Tapasztalatom szerint az így megadott anyagokkal a leképezés minősége (pl. Strehl-arány) javult a direkt módon megadotthoz képest. A szimulációk

során, sajnos többször előfordult, hogy nem találtam meg a lehetséges üveget, ezekben az esetekben a direkt megadást választottam. Megjegyzem, hogy ennél a szabadalomnál az objektív összes lencséjéhez tudtam a katalógusból üveget választani. A tubuslencse paraméterei (az objektívvel azonos módon) megtalálhatók a szabadalomban. Azonban a szabadalom által ugyancsak megadott tubuslencsében a közegeket direkt módon kellett definiálnom, mert ott a szabadalomban megadott értékekkel egyező anyagot nem találtam. (Megjegyzem, hogy ebben a szabadalomban a tubuslencse paraméterei megítélésem szerint hibásan vannak megadva, ezért végül nem is használtam azokat). A fenti okok miatt e szimulációk során egy 180 mm fókusztávolságú tökéletes lencsét (Perfect lens) használtam.

A. Embodiment #6 (USP7199938)

$\beta = -100\times$, NA = 1.41, f = 1.8 mm, WD = 0.13 mm
Thickness of cover glass = 0.17

$r_1 = \infty$	$d_1 = 0.6$	$n_1 = 1.51633$	$v_1 = 64.14$
$r_2 = -2.3056$	$d_2 = 1.69$	$n_2 = 1.77250$	$v_2 = 49.60$
$r_3 = -1.8319$	$d_3 = 0.4937$		
$r. = -14.3487$	$d. = 3.8685$	$n. = 1.49700$	$v. = 81.14$

1.ábra: Üvegek kiválasztása az OSLO-ba épített katalógus alapján. Az USP7199938 számú szabadalom hatodik embodiment táblázatában megadott adatokkal definiált üveg (A) azonosítása az OSLO beépített katalógusában szereplő (B) közzeggel.

B.

b. Az a feltevés, hogy az optikai rendszer PSF-je kép-pozíció független az én véleményem szerint még 50 μm -es FOI esetén is helytelen. Egy olyan matematikai rendszerben, ahol görbeillesztéssel a PSF méretét egy- vagy másfél nagyságrenddel lecsökkentik és néhányszor 10nm-es görbeillesztési pontosságot mutatnak ki, a PSF még kismértékű transzverzális irányú elmozdulása is jelentőségteljes. Természetesen az optikai tervezésből ismert Strehl hányados, illetve a Maréchal kritérium nem használható ebben az esetben, mert azok a hullámfront varianciáját veszik, torzulás mértékének, még a PSF súlypont eltolása, illetve hengersizmetriájának eltorzulása nem kapcsolhatóak a varianciához matematikai érvek nélkül. Ebben azt értem, hogy ugyan a Maréchal kritérium, illetve hullámfront variancia közvetlenül kapcsolható Seidel/Zernike aberrációk toleranciájához, a harmadrendű Seidel aberrációk nem adnak lehetőséget a PSF súlypontjának direkt számolására. Kérem tehát a szerzőt, hogy matematikailag indokolja meg hogy miért gondolja, hogy ezen feltevés helyes.

Válasz: Egyetértek azzal, hogy a PSF nem független a FOV-tól, az optikai tengelytől mért távolságtól függ a leképezési hiba, torzul a PSF és végső soron romlik a képminőség. Ezt a 4.4.4 ábrán látható OSLO szimulációk is jól mutatják. Kísérletileg számos cikkben vizsgálták a PSF pozíciófüggő torzulásának hatását a lokalizációra 2D és 3D esetben is. Diezmann és

munkatársai [3] pl. nanohole array-t használtak a PSF pozíciófüggő 3D mérésére és azt találták, hogy az elérheti az 50–100 nm-t is.

A fentiek ellenére a TestSTORM szimulációs kódban a PSF helyfüggését nem vettük figyelembe, mert megítélésem szerint e hiba hatása elsősorban nagy kiterjedésű mintáknál illetve többcsatornás méréseknél (többszínű mérések, polarizációs mérések) válnak kritikussá.

A dolgozatban ismertett méréseknél a minták karakterisztikus mérete kicsi (a DNA DSB fókuszok pár mikron átmérőjűek, a szarkomer kettős vonalak távolsága <150 nm, átmérőjük pár mikron). Ez azt jelenti, hogy az 1 mikron átmérőjű DNS DSB fókusz két szélén fellépő PSF torzulásból adódó hiba ≈ 2 nm, ami véleményem szerint a kiértékelést lényegében nem befolyásolja.

Megjegyzem, hogy jelenlegi kutatásaink során a dolgozatban is említett szarkomer mintákon öntanuló algoritmussal keressük meg a kettős vonalakat. Az algoritmust a TestSTORM-mal legenerált adatsoron tanítjuk be és a mért adatokon a vonalakat a FOV-beli pozíciótól függetlenül nagy hatékonysággal találja meg. Úgy gondolom, hogy ez jól mutatja a TestSTORM adatsorok alkalmazhatóságát valós kísérleti eredmények kiértékelésére.

Meg kell jegyezni, hogy a lokalizációs pontosság térbeli függésének a PSF torzuláson túl más okai is lehetnek, amelyeket a TestSTORM szintén nem vesz figyelembe:

- (i) A kísérletek során a minta kivilágítása tipikusan inhomogén (általában Gauss), ami befolyásolja a lokalizációs pontosságot és helyfüggővé teszi azt.
- (ii) A nyaláb szélén a lézer teljesítménye túl alacsony ahhoz, hogy kellő számú fluoreszcens molekula kerüljön OFF állapotba, megnövelve ezzel a fluoreszcens háttérrel.
- (iii) A mikroszkóp optikai elemei közül talán az objektív a legkritikusabb a PSF aberrációja szempontjából. Tapasztalatom szerint azonban a dikroikus tükör, a frame-be épített extra (Nikon esetén x1.5 nagyítású) lencse és az emissziós szűrők is hatással vannak a végső kép minőségére.
- (iv) A nagy numerikus apertúrájú TIRF objektívek (pl. a szegedi és Cambridge-i rendszerben is használt Nikon CFI Apo TIRF 100XC oil) nem PLAN objektívek, azaz a látótér szélén a képsíkgörbület miatt torzul a PSF.

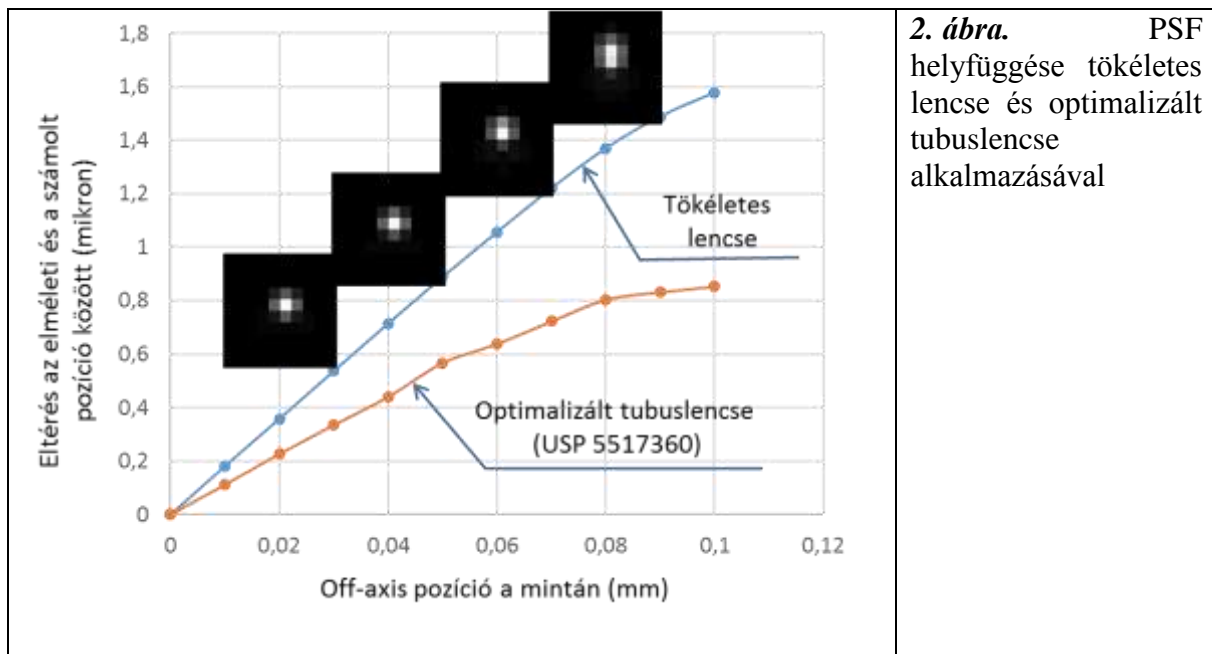
A fentiek miatt a testSTORM szimulációs kódba helyfüggő PSF modellt nem építettünk be.

Azonban a bírálónak igaza van, ez valóban korlátozza a program felhasználási körét, amit a dolgozatban nem hangsúlyoztam kellően.

A színhiba leírásánál a szerző elmondja, hogy a tubuslencse egy 180mm-es fókusz távolságú ideális lencse volt. Kérésem ezzel kapcsolatban az az, hogy a szerző írja le válaszában, hogy ez a feltevés járhat-e a képtér pozíció függő aberrációk megváltozásában egy valódi de optimalizált lencséhez képest.

Válasz: A kérdés megválaszolásához a 136-os hivatkozásban megadott szabadalomban (USP_7199938) leírt objektívvel ellenőrző PSF számolásokat végeztem az OSLO-ban definiált „tökéletes lencse” és egy Olympus tubuslencse alkalmazásával. Sajnos a dolgozatban hivatkozott szabadalomban a tubuslencse adatai rosszul vannak megadva, ezért az ott megadott lencse adatait nem tudtam használni. A szimulációkhoz ezért egy másik Olympus szabadalomban (USP_5517360) megadott tubuslencsét használtam. A szimuláció során a

pontszerű fényforrás pozícióját 100 μm maximális off-axis pozícióig változtattam, és a PSF „peak position” értékének a pontos értéktől (nagyítás \times forrás pozíciója) való eltérését ábrázoltam a forrás pozíciójának függvényében (2. ábra). A nagyítás értékére rendre kisebb értéket kaptam, mint 100, azaz a szimuláció alapján a PSF-ek az optikai tengely felé tolódtak el. Az eltérés a forrás off-axis pozíciójának monoton növekvő függvénye. Az ábrán a 20, 40, 60 és 80 mikronos off-axis értékekkel számolt PSF-ek is láthatók, az alkalmazott EMCCD 16 mikron pixelméretű felbontásában. Meg kell jegyezni, hogy a kísérletek során a teljes látótér 80 mikron nagyságú volt, azaz a PSF torzulása vizuálisan soha nem volt érzékelhető. A szimuláció érdekes eredménye, hogy a szabadalomból vett tubuslencsével számolva a hiba kisebb, mint a tökéletes lencsével kapott érték. Megítélésem szerint a bíráló kérdésére a válasz igen, és egy optimalizált tubuslencse akár jobb leképezést is biztosíthat mint az OSLO-ban definiált tökéletes lencse. Ez magyarázható azzal, hogy egy adott mikroszkópgyártó a leképezési hibák korrigálására az objektív és a tubuslencse együttesét használja. Sajnos azt is meg kell említenem, hogy a tubuslencse kiválasztásánál az irodalomban egyértelműen találunk utalást arra, hogy a szabadalmakban leírt tubuslencse adatok (különösen az Olympus esetén) nem egyeznek meg a mikroszkópokba installált lencsékkel [4]. Ezért használtam én is többször az OSLO-ban definiálható tökéletes lencsét egy valódi tubuslencse helyett.

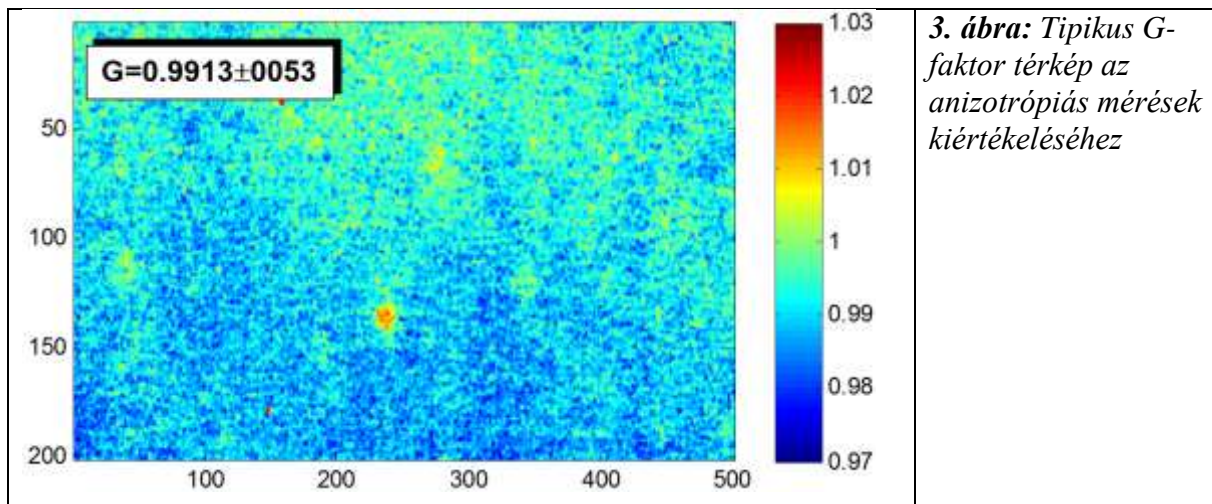


2. ábra. PSF helyfüggése tökéletes lencse és optimalizált tubuslencse alkalmazásával

6. A 4.7.1 ábra diszkussziójával kapcsolatban kérdezem, hogy a szerző megmérte-e, hogy a polarizációs nyalábosztó mennyire homogén módon osztja a nyalábot. Tudható, hogy az osztás homogenitása nagymértékben függ az osztóra eső nyaláb átmérőjétől. A homogenitás mértéke csak részben szabja meg a kioltási arányt, ami a dolgozatban 10⁻³-ként szerepel.

Válasz: A nyalábosztó homogenitását önmagában nem mértem ki. Az anizotrópia meghatározásához szükség volt a G-faktor meghatározására, ami a két kar azonos bemenő jelre adott válaszában hányadosa, és ezért közvetlenül függ a nyalábosztó osztási arányától is. A G-faktort egy híg festékkoldattal mértem ki, ahol feltételezhető, hogy a molekulák gyors forgása miatt az anizotrópia nulla. Ezt a kalibrációs mérést minden mérési nap elején el kellett végezni, mert a rendszert többen és több modalitásban is használták. Egy ilyen tipikus G-faktor térképet

mutat a 3. ábra. A G-faktor térbeli változásának okát (pl. pontosan melyik optikai elem vezet be) nem vizsgáltam, de tapasztalatom szerint a nyalábosztó mellett a dikroikus tükrök is befolyásolják a polarizációs viszonyokat. Megjegyzem, hogy a (Nikon) szuperrezolúciós filterkockákban a dikroikus tükröket nem ragasztják vagy szorítják le, a feszültségek minimalizálására azokat csupán ráfektetik a kockában kialakított keretre, így a váltás során elmozdulhatnak. Ezért (is) végeztem el a kalibrációt minden mérés előtt és mértem az egész rendszer válaszjelét, nem külön az egyes elemekét. Az anizotrópia kiszámításakor az egyes pixeleken mért G-faktor értékét használtam, az ábrán feltüntetett átlagérték csak tájékoztató jellegű.



7. Ugyan ezen ábrával kapcsolatban a szerző kijelenti, hogy az optikai rendszer működését OSLO-val szimulálta. Kérdésem, hogy a szerzőnek birtokában voltak-e az objektív lencsén belül használt reflexió mentesítő rétegek adatai. Amennyiben nem, kérem becsülje meg a számolási hibát, amit ezen rétegek elhanyagolása okoz. Nem lehet, hogy ez okozza a 86. oldal alján leírt numerikus diszkrepanciát?

Válasz: Nem álltak rendelkezésemre az AR rétegek adatai, a szabadalmak a lencsék bevonatával kapcsolatban nem közöltek adatokat, ezért azokat az OSLO-s szimulációk során nem tudtam figyelembe venni. Sajnos az irodalomban egyértelmű utalást nem találtam arra, hogy a nagy numerikus apertúrájú objektívekben használt antireflexiós bevonatot hogyan kell/érdemes a sugárkövető algoritmusoknál figyelembe venni. Mivel az optimális AR bevonat függ a lencse anyagától is, így nagy valószínűséggel egy általános bevonat alkalmazása is megkérdőjelezhető. Ezen okok miatt az OSLO-s szimulációkat az AR bevonat vizsgálatára nem tartottam alkalmasnak, ezért nem is történtek ilyen irányú számolások. Meg kell jegyezni, hogy a dolgozatban hivatkozott cikkben [5] sem vették figyelembe az AR bevonatot, de megemlítik, hogy az objektívekben tipikusan AR bevonattal rendelkező lencsék vannak, ezért a tárgyalt esethez képest a valós objektívek esetén a depolarizáció kisebb hatású. Mivel más referenciában szereplő depolarizációs értékek is az alacsonyabb értéket jósolták, ezért fogadtam el az OSLO-s szimulációk eredményét.

A kérdéses objektívet a Nikon honlapja (Nikon objective selection) javasolja DIC mérésekhez is, és a szegedi laboratóriumban mi is többször használtuk DIC és fáziskontraszt mérésekhez. Ennek alapján arra következtetünk, hogy az AR bevonat a depolarizáció értékét csökkenti a tiszta felülethez képest, de jelentős változást nem okoz.

Referenciák

1. Thompson, R.E., Larson, D.R. and Webb, W.W., 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical journal*, 82(5), pp.2775-2783.
2. Stallinga, S. and Rieger, B., 2010. Accuracy of the Gaussian point spread function model in 2D localization microscopy. *Optics express*, 18(24), pp.24461-24476.
3. 2015_Diezmman: Von Diezmman, A., Lee, M.Y., Lew, M.D. and Moerner, W.E., 2015. Correcting field-dependent aberrations with nanoscale accuracy in three-dimensional single-molecule localization microscopy. *Optica*, 2(11), pp.985-993.
4. Kurvits, J.A., Jiang, M. and Zia, R., 2015. Comparative analysis of imaging configurations and objectives for Fourier microscopy. *JOSA A*, 32(11), pp.2082-2092.
5. Axelrod, D., 1979. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophysical journal*, 26(3), pp.557-573.

Szeged, 2022. március 9.

.....
Erdélyi Miklós