



Получено: 2.11.2023 г. | Принято: 8.11.2023 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.450.455>

Научная статья

## "ФЕМТОСКАН ОНЛАЙН": 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И ОБРАБОТКА ДАННЫХ БИОНАНОСКОПИИ

А.И.Ахметова<sup>1</sup>, к.ф.-м.н., мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-5115-8030 / [akhmetovaai@my.msu.ru](mailto:akhmetovaai@my.msu.ru)  
И.В.Яминский<sup>1</sup>, д.ф.-м.н., проф. МГУ имени М.В.Ломоносова, ORCID: 0000-0001-8731-3947  
Т.О.Советников<sup>1</sup>, магистр, ORCID: 0000-0001-6541-8932

**Аннотация.** Атомно-силовая микроскопия – это уникальный инструмент для изучения 3D-морфологии биологических объектов и измерения их свойств. Для применения метода и интерпретации полученных данных немаловажную роль играет программное обеспечение, которое позволяет корректно обработать изображения, убрать артефакты сканирования и собрать воедино ценную информацию об объектах [1, 2]. В ПО "ФемтоСкан Онлайн" реализовано несколько функций, которые существенно облегчают обработку изображений и сбор данных об интересующих объектах.

**Ключевые слова:** обработка данных, выравнивание подложки, атомно-силовая микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия, бионаноскопия

**Для цитирования:** А.И. Ахметова, И.В. Яминский, Т.О. Советников. "ФемтоСкан онлайн": 3D-визуализация и обработка данных бионаноскопии. НАНОИНДУСТРИЯ. 2023. Т. 16, № 7–8. С. 450–455. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.450.455>

Received: 2.11.2023 | Accepted: 8.11.2023 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.450.455>

Original paper

## FEMTOSCAN ONLINE: 3D VISUALIZATION AND PROCESSING OF BIONANOSCOPY DATA

A.I.Akhmetova<sup>1</sup>, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-5115-8030 / [akhmetovaai@my.msu.ru](mailto:akhmetovaai@my.msu.ru)  
I.V.Yaminsky<sup>1</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., ORCID: 0000-0001-8731-3947  
T.O.Sovetnikov<sup>1</sup>, Master Degree, ORCID: 0000-0001-6541-8932

**Abstract.** Atomic force microscopy is a unique tool for obtaining the 3D morphology of biological objects and measuring their properties. To apply the method and interpret the obtained data, an important role is played by software that allows you to correctly process the resulting images, remove scanning artifacts and collect valuable information about objects in the image [1, 2]. FemtoScan Online software implements several functions that greatly facilitate image processing and data collection about objects of interest.

**Keywords:** data processing, substrate alignment, atomic force microscopy, scanning probe microscopy, bionanoscopus

**For citation:** A.I. Akhmetova, I.V. Yaminsky, T.O. Sovetnikov. FemtoScan online: 3D visualization and processing of bionanoscopus data. NANOINDUSTRY. 2023. V. 16, no. 7–8. PP. 450–455. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.450.455>.

<sup>1</sup> МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia



## ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия позволяет не только воссоздавать 3D-рельеф исследуемых образцов, но и получать многочисленные данные об адсорбции частиц на различных подложках, адгезии, упругости измеряемых объектов и других биомеханических свойств. С помощью АСМ можно создавать морфометрический портрет клеток крови [3], оценивать влияние цитотоксических веществ на опухолевые клетки [4], изучать характер адсорбции частиц на сенсорных подложках [5].

При обилии возможностей АСМ необходимо уделять внимание методике обработки данных. Сканирование в атомно-силовой микроскопии осуществляется построчно, при переходе на новую строку на изображении появляются ступени (рис.1а), которых в действительности, конечно, не существует. Особенно явным этот артефакт становится при резком изменении амплитуды перепада высот от строки к строке, когда в АСМ наблюдаются одиночные объекты, между которыми есть строки, в которые входит только рельеф гладкой поверхности подложки (рис.1а).

Чтобы избавиться от этого ступенчатого рельефа в ПО "ФемтоСкан Онлайн" используется функция "Усреднение по строкам", которая приводит среднюю высоту в каждой из строк изображения к единому значению. В большинстве случаев вместе с функцией "Удаление среднего наклона" усреднение по строкам позволяет получить хороший кадр, но не всегда получается хорошо обработать изображения с одиночными объектами. Из-за присутствия на изображении строк одной лишь подложки средние значения по всему кадру будут слишком отличаться, после применения функции возле наиболее крупных объектов появляется заметная "тень" (рис.1б).

Появившиеся затемненные участки можно убрать, выделив крупные объекты с помощью инструмента "Выделение области" и используя функцию "Выравнивание по строкам" за исключением выделенной области.

Для более качественного выравнивания фона можно воспользоваться алгоритмом выравнивания подложки с помощью функции "Вычитание изображений". Для этого мы сделаем три изображения: первое - исходное, которое мы будем обрабатывать, второе представляет собой подложку без объектов, и третье - наше итоговое изображение, которое на первом этапе необходимо продублировать из первого. Сначала на исходном изображении выделяем все

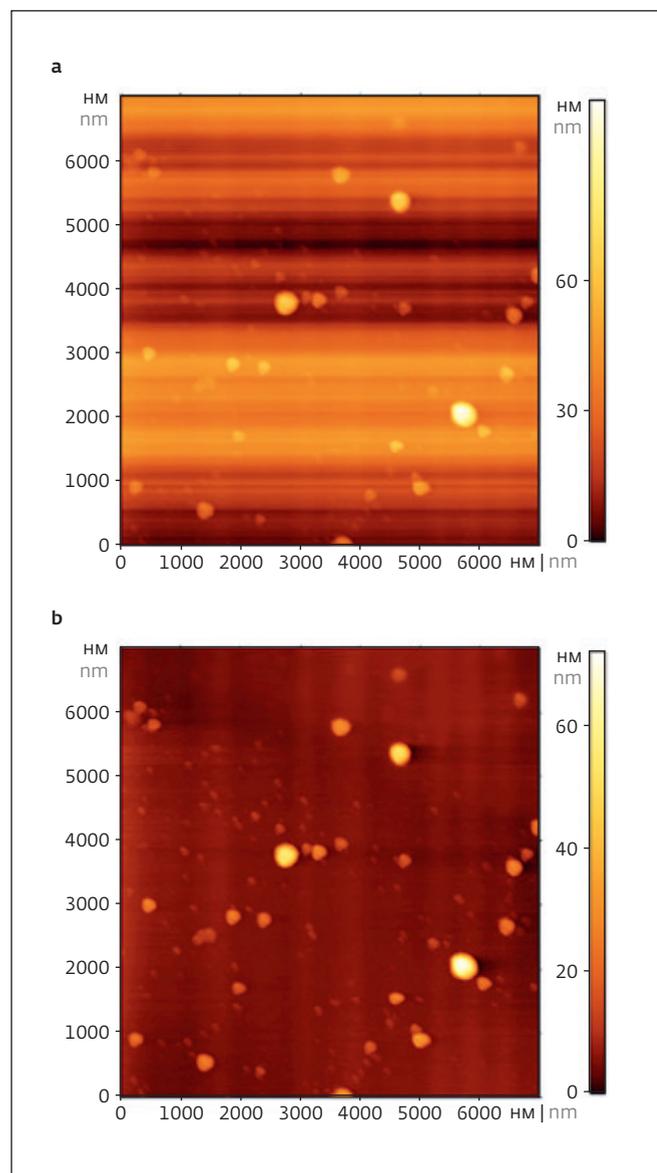


Рис.1. 2D-изображение CaP-частиц, покрытых хитозаном. а – до выравнивания подложки на снимке присутствуют характерные ступени; б – после усреднения по строкам ступени пропадают

Fig.1. 2D image of CaP particles coated with chitosan. a – before substrate alignment, characteristic steps are present in the image; b – after line averaging, the steps disappear

## INTRODUCTION

Atomic force microscopy allows not only to recreate 3D relief of the samples under study, but also to obtain numerous data on adsorption of particles on various substrates, adhesion, elasticity of the measured objects and other biomechanical properties. AFM can be used to form a morphometric portrait of blood cells [3], assess the effect of cytotoxic substances on tumour cells [4], and

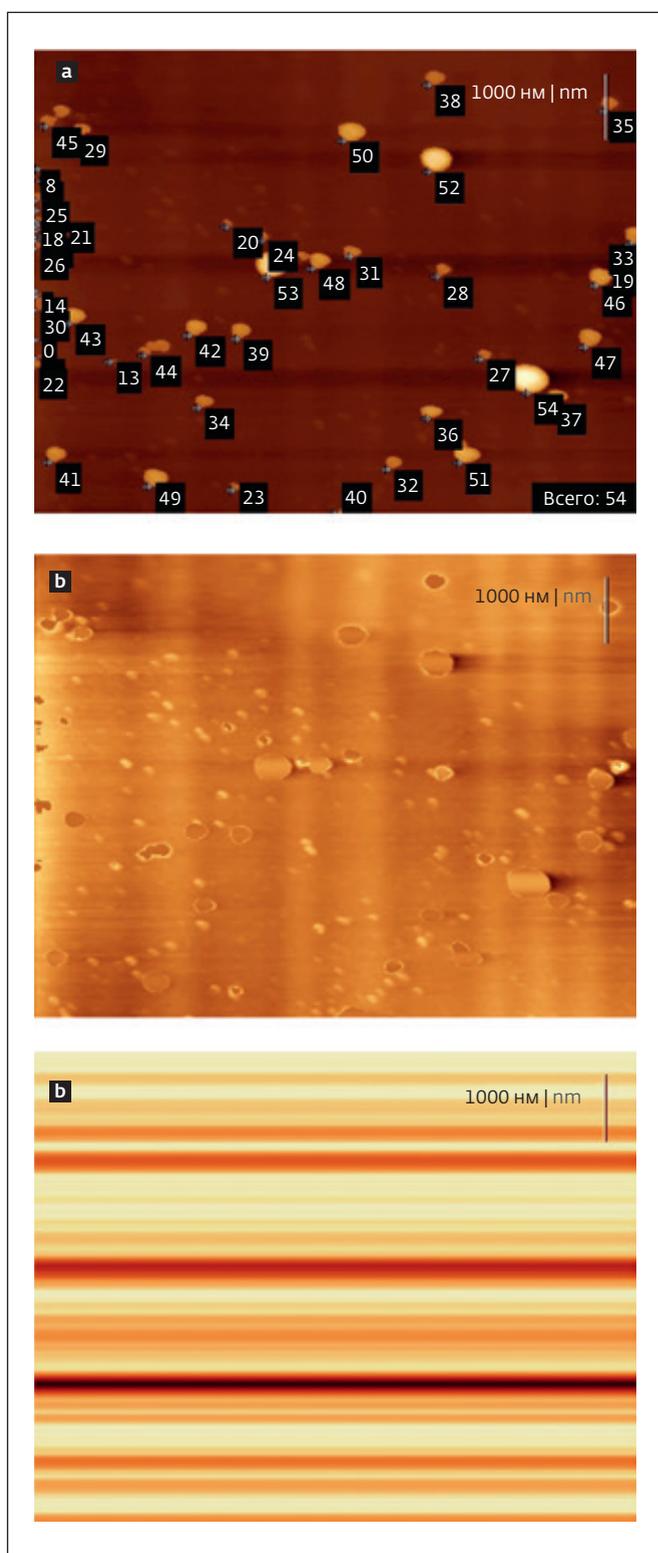


Рис. 2. Алгоритм выравнивания подложки изображения: а – кадр с выделенными объектами; б – подложка без объектов; с – разность выровненной и исходной подложки  
 Fig. 2. Algorithm of image substrate alignment: а – frame with selected objects; б – substrate without objects; с – difference of aligned and original substrate

study the nature of particle adsorption on sensor substrates [5].

With the abundance of AFM capabilities, it is necessary to pay attention to the methodology of data processing. Scanning in atomic force microscopy is carried out line by line, and at transition to a new line, steps appear on the image (Fig. 1a), which, of course, do not exist in reality. This artefact becomes especially evident when the amplitude of height difference changes sharply from row to row, when single objects are observed in AFM, between which there are rows that include only the relief of the smooth surface of the substrate (Fig. 1a).

To get rid of this stepped relief, FemtoScan Online software uses the Row Averaging function, which brings the average height in each image row to a single value. In most cases, line averaging together with the Remove Average Slope function allows to obtain a good picture, but images with single objects are not always well processed. Due to the presence on the image of rows of the underlay alone, the average values over the whole frame will be too different, after applying the function a noticeable "Shadow" appears near the largest objects (Fig. 1b).

The darkened areas that appear can be removed by selecting large objects with the Area Selection tool and using the Line alignment excluding the selected area function.

For better alignment of the background, you can use the aligning algorithm for underlay using the Image Subtraction function. To do this, we will make three images: the first is the original image, which we will process, the second is the background without objects, and the third is our final image, which at the first stage should be duplicated from the first one. First, we select all the objects of interest in the original image (Fig. 2a) and delete them. Next, duplicate the image without objects (Fig. 2b) and use the Align to lines function to get the second image with aligned background. Now subtract the image with aligned background from the image without objects (Fig. 2b). The difference of the two images is shown in Fig. 2c. The obtained result is subtracted from the third image. The final frame can be compared with the original one in Fig. 3.

After applying the algorithm, the knocked-out rows finally disappear (Fig. 3).

Using the Select Objects function we can also prepare a detailed analysis of particle morphology, for example, for CaP particles we can obtain data on the geometry of each particle (Fig. 4): measure perimeter, area, volume, form factor, roughness, average and maximum height.



интересующие детали (рис.2а) и удаляем их. Далее дублируем кадр без объектов (рис.2b) и воспользуемся функцией "Выровнять по строкам", получим второе изображение с выровненным фоном. Теперь вычитаем из изображения без объектов (рис.2b) кадр с выровненной подложкой. Разность двух изображений представлена на рис.2с. Полученный результат вычитаем из третьего изображения. Итоговый кадр можно сравнить с исходным на рис.3.

После применения алгоритма выбивающиеся строки окончательно исчезают (рис.3).

С помощью функции "Выделить объекты" также можно подготовить подробный анализ морфологии частиц, например, для CaP-частицы можем получить данные о геометрии каждой частицы (рис.4): измерить периметр, площадь, объем, форм-фактор, шероховатость, среднюю и максимальную высоту.

Зеленым контуром автоматически выделена частица на подложке, пороговые параметры выделения можно изменять. На основе выделения ПО формирует таблицу с данными (табл.1):

- P – периметр, длина границы объекта в плоскости XY;
- S – площадь, занимаемая объектом в проекции на плоскость XY;
- RMS – дисперсия высоты объекта (шероховатость);
- форм-фактор 1 (FF1) – отношение радиуса окружности эквивалентной площади к радиусу окружности эквивалентного периметра. Для круглого объекта этот форм-фактор равен единице. Чем сильнее изрезан периметр объекта, тем ближе его значение к нулю;
- форм-фактор 2 (FF2) – отношение удвоенной длины скелета объекта к его периметру. Для тонкой нити это отношение равно единице, для окружности оно равно нулю;
- H – максимальная высота объекта,
- H<sub>av</sub> – средняя высота объекта.

Собрав такую статистику по достаточной выборке частиц, можно сформировать морфометрический портрет образца, который в дальнейшем позволит идентифицировать объекты при измерении частиц разных размеров.

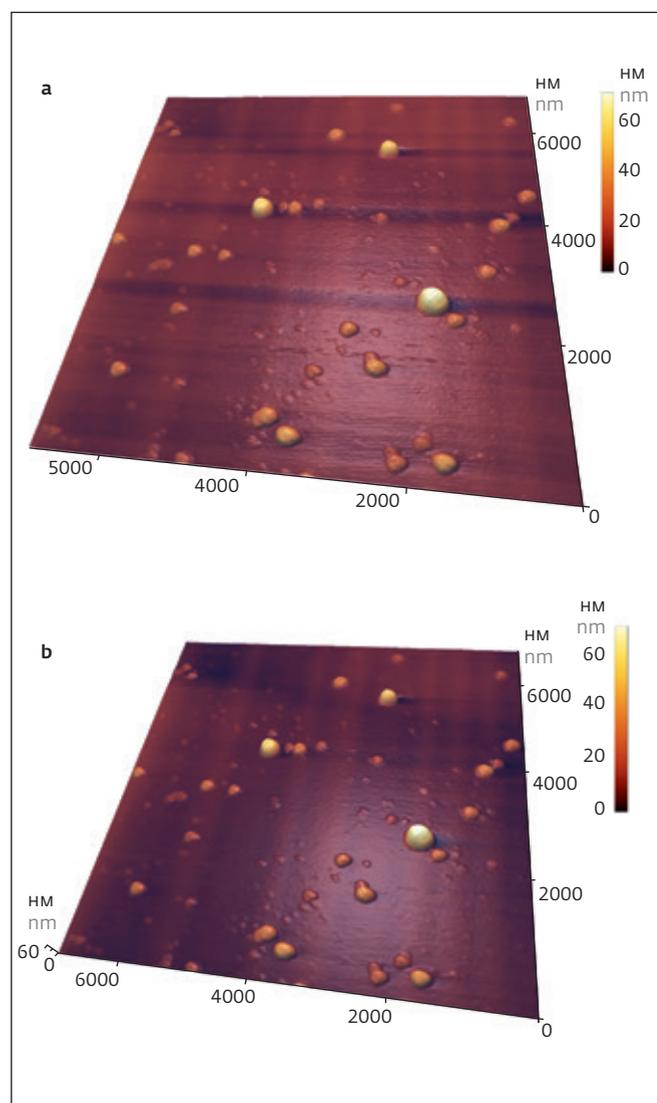


Рис.3. 3D-изображения CaP-частиц: а – до; б – после применения алгоритма выравнивания подложки

Fig.3. 3D images of CaP particles: a – before; b – after application of the substrate alignment algorithm

A particle on the substrate is automatically selected with a green contour, the threshold parameters of selection can be changed. On the basis of selection the software generates a table with data (Table 1):

Таблица 1. Данные о размере частицы

Table 1. Particle size data

P, нм   nm	S, нм <sup>2</sup>   nm <sup>2</sup>	V, нм <sup>3</sup>   nm <sup>3</sup>	RMS, нм   nm	FF_1	FF_2	H, нм   nm	H <sub>av</sub> , нм   nm
1227	114524	3·10 <sup>6</sup>	14	0,07	0,2	51,5	32

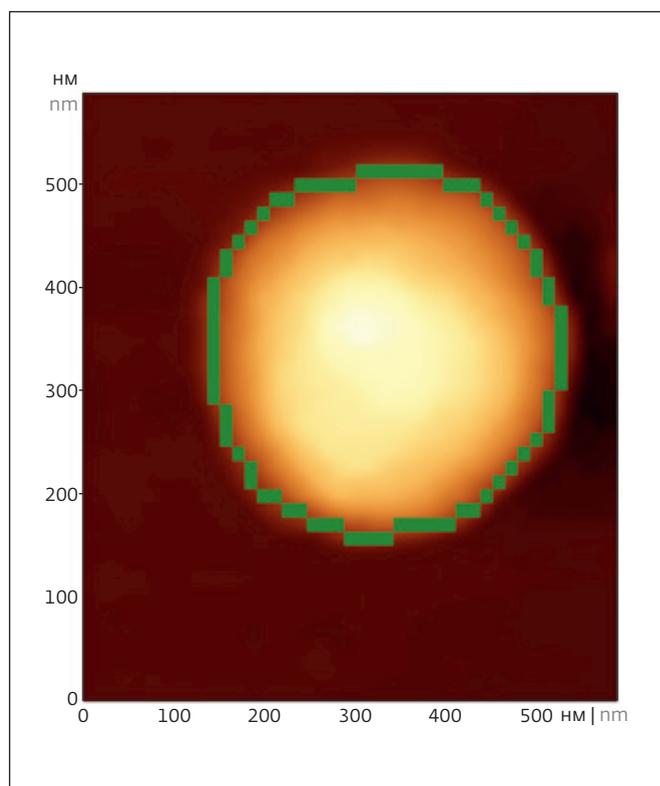


Рис.4. Измерение геометрических параметров одиночной СаР-частицы

Fig.4. Measurement of geometrical parameters of a single CaP particle

## ВЫВОДЫ

Программное обеспечение играет существенную роль в интерпретации данных зондовой микроскопии. С помощью АСМ можно оценивать чистоту образцов, характерные геометрические размеры частиц, склонность частиц к разрушению в зависимости от используемой подложки. Понимание алгоритмов работы ПО, а также использование различных функций позволяют получить максимальное количество данных с помощью этого метода.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по госзаданию при финансовой поддержке физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Регистрационная тема 122091200048-7).

ПО "ФемтоСкан Онлайн" предоставлено ООО НПП "Центр перспективных технологий", [www.nanoscopy.ru](http://www.nanoscopy.ru).

Авторы благодарны Фонду содействия инновациям и правительству Москвы за всестороннюю поддержку деятельности ЦМИТ "Нанотехнологии".

- P – perimeter, the length of the object boundary in the XY plane;
- S – area occupied by the object in projection to the XY plane;
- RMS – dispersion of the object height (roughness);
- Form Factor 1 (FF1) is the ratio of the radius of the circle of equivalent area to the radius of the circle of equivalent perimeter. For a circular object, this Form Factor is equal to one. The more rugged the perimeter of the object, the closer its value is to zero;
- Form Factor 2 (FF2) is the ratio of the doubled length of the object's skeleton to its perimeter. For a thin thread this ratio is equal to one, for a circle it is zero;
- H is the maximum height of the object;
- H\_av – average height of the object.

Having collected such statistics on a sufficient sample of particles, it is possible to form a morphometric portrait of the sample, which will further allow to identify objects when measuring particles of different sizes.

## CONCLUSIONS

Software plays an essential role in the probe microscopy data interpretation. With the help of AFM it is possible to evaluate the purity of samples, characteristic geometric dimensions of particles, and propensity of particles to fracture depending on the substrate used. Understanding the algorithms of the software, as well as the use of various functions, maximises the amount of data that can be obtained using this method.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed under the state order with the financial support of the Physical Department of Lomonosov Moscow State University (Registration subject 122091200048-7).

FemtoScan Online software is provided by Advanced Technologies Center, [www.nanoscopy.ru](http://www.nanoscopy.ru)

The authors are grateful to the Innovation Promotion Foundation and the Moscow City Government for all-round support of the activities of YIC "Nanotechnologies".

## PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

**Declaration of Competing Interest.** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



### ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

*Декларация о конфликте интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. Femto-Scan Online software in virus research. NANOINDUSTRY. 2021. Vol. 14, no. 1(103), PP. 62–67. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2021.14.1.62.67>
2. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Maksimova N.E. Software for scanning probe microscopy of bacterial cells. Medicine and high technology. 2022. Vol. 4. PP. 5–8. <https://dx.doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-4-5-8>
3. Sinitsyna O.V., Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. Atomic force microscopy of erythrocytes: new diagnostic capabilities. Medicine and High Technologies. 2022. Vol. 1. PP. 9–12. <https://doi.org/10.34219/2306-3645-2022-12-1-9-12>
4. Akhmetova A.I., Sovetnikov T.O., Tikhomirova M.A., Gukasov V.M., Rybakov Yu.L., Shimanovskii N.L., Yaminsky I.V. Scanning capillary microscopy in the study of the effect of cytotoxic agents on the biomechanical and physicochemical properties of tumor cells. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02770-4>
5. Zhdanov G., Nyhrikova E., Meshcheryakova N., Kristavchuk O., Akhmetova A., Andreev E., Rudakova E., Gambaryan A., Yaminsky I., Aralov A., Kukushkin V., Zavyalova E. A combination of membrane filtration and raman-active DNA ligand greatly enhances sensitivity of SERS-based aptasensors for influenza a virus. Frontiers in Chemistry. 2022. Vol. 10. P. 937180. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.937180>



## ИЗДАТЕЛЬСТВО «ТЕХНОСФЕРА» ПРЕДСТАВЛЯЕТ КНИГУ:



Юрген Бёккер  
**СПЕКТРОСКОПИЯ**

Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2021. – 528 с., ISBN 978-5-94836-220-5

Цена 760 руб.

Спектроскопия как средство описания атомов, ионов и молекул с помощью типовых длин волн, измеряемых при возбуждении, принадлежит сегодня к важнейшим и самым распространенным методам инструментальной аналитики. Специальные измерительные устройства, в том числе абсорбционные и эмиссионные спектрометры, обеспечивают точное определение количественного и качественного состава газообразных, жидких и твердых веществ.

В книге дается обзор разных методов атомной и молекулярной спектрометрии и рассматриваются многие аналитические проблемы, решаемые в лабораториях промышленных предприятий, в естественнонаучных и технических учреждениях, а также проблемы изучения и защиты объектов окружающей среды. В книге представлена широкая гамма существующих методов исследования, а также перечень приборов с руководством по их применению.

### КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

125319, Москва, а/я 91; тел.: +7 495 234-0110; факс: +7 495 956-3346; e-mail: [knigi@technosphere.ru](mailto:knigi@technosphere.ru); [sales@technosphere.ru](mailto:sales@technosphere.ru)