



ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ "ФЕМТОСКАН ОНЛАЙН" В ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСОВ

FEMTOSCAN ONLINE SOFTWARE IN VIRUS RESEARCH

И.В.Яминский^{1,2,3,4}, д.ф.-м.н., проф. физического и химического факультетов МГУ имени М.В.Ломоносова, вед. научн. сотр. ИНЭОС РАН, директор Энергоэффективных технологий, (ORCID: 0000-0001-8731-3947), А.И.Ахметова^{1,2,3}, инженер НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, ведущий специалист Центра перспективных технологий и Энергоэффективных технологий (ORCID: 0000-0002-5115-8030) / yaminsky@nanoscopy.ru

I.V.Yaminskiy^{1,2,3,4}, *Doct. of Sc. (Physics and Mathematics), Prof. of Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, Director of Energy Efficient Technologies, Leading Sci. of INEOS RAS, A.I.Akhmetova^{2,3}, Engineer of A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leading Specialist of Advanced Technologies Center and of Energy Efficient Technologies*

DOI: 10.22184/1993-8578.2021.14.1.62.67

Получено: 05.02.2021 г.

Исследование вирусов стало особенно актуальной задачей на сегодняшний день. Сканирующая зондовая микроскопия позволяет получать уникальную информацию о морфологии и свойствах вирусов, недоступную другими методами, и может объяснить, например, способность вирусов противостоять многим внешним факторам среды, приспосабливаться к условиям. Механические и геометрические свойства, адгезия, склонность к агрегации, способность кристаллизоваться – эти данные можно получать с помощью зондовой микроскопии. В этих исследованиях специализированное программное обеспечение является важным инструментом для обработки и анализа полученных результатов.

Nowadays, virus research has become an especially urgent task. Scanning probe microscopy allows one to obtain unique information about the morphology and properties of viruses, which are inaccessible by other methods, and may explain, for example, the ability of viruses to withstand many external environmental factors and adapt to external conditions. Mechanical and geometrical properties, adhesion, tendency to aggregation, ability to crystallize can be obtained using the probe microscopy. In these studies, specialized software is an important tool for processing and analyzing the results obtained.

В статье мы подробно рассматриваем, как обработать полученные после сканирования изображения. В большинстве случаев от правильной визуализации во многом зависит и восприятие, и интерпретация полученных результатов [1].

Полученное изображение может иметь общий наклон или общую кривизну, вызванные температурным дрейфом или нелинейностью пьезокерамического манипулятора. Первое, что следует сделать при обработке изображения

в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" – это удалить средний наклон, рассчитанный методом наименьших квадратов или с помощью сплайнов.

На изображении зачастую присутствует шумовая составляющая. Чтобы избавиться от нее, можно применить полезную опцию – выравнивание всех строк изображения по среднему уровню. Эта опция заменяет значение в каждой точке средним арифметическим значений всех точек в ближайшей окрестности от нее.

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический и химический факультеты, НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical and Chemical departments, A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia.

² ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia.

³ ООО "Энергоэффективные технологии", Москва, Россия / Energy Efficient Technologies.

⁴ ИНЭОС РАН, Москва, Россия / INEOS RAS, Russia.

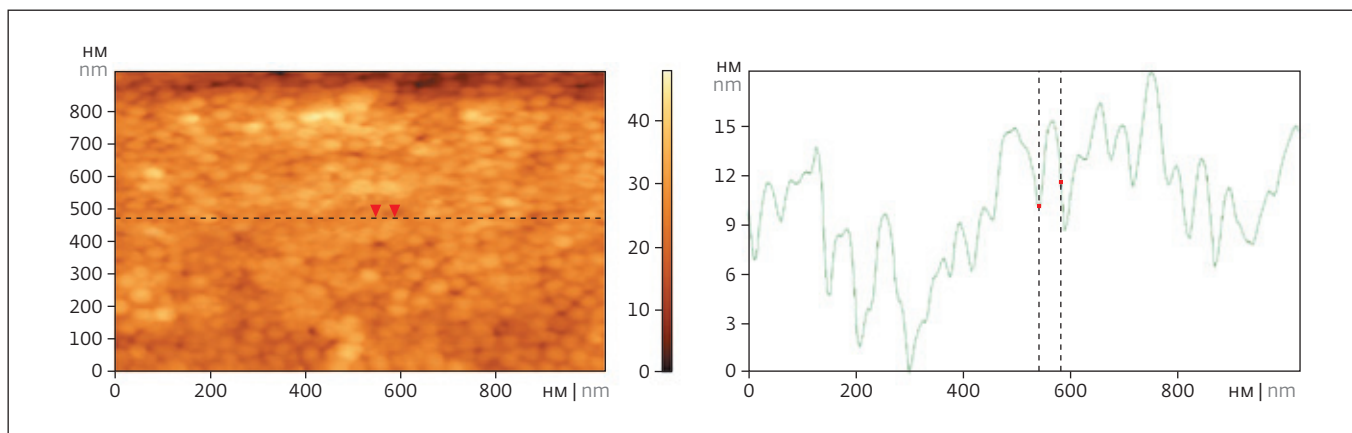


Рис.1. Вверху – двумерное изображение вируса клещевого энцефалита, внизу – профиль сечения вдоль пунктирной линии на верхнем изображении. По данным сечения диаметр одной вирусной частицы составляет 40 нм

Fig.1. Above – a two-dimensional image of the tick-borne encephalitis virus, below – a sectional profile along the dotted line in the upper image. According to the sectional data, the diameter of one viral particle is 40 nm

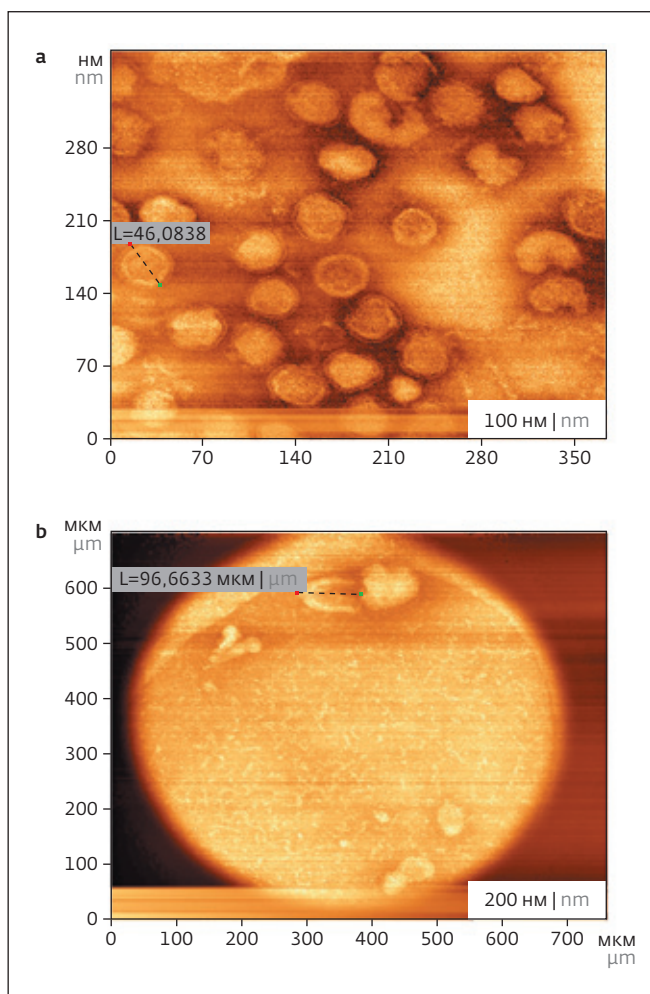


Рис.2. Обработка данных просвечивающей электронной микроскопии: а – образец вируса клещевого энцефалита, б – вирус бешенства

Fig.2. Transmission electron microscopy data processing: a – tick-borne encephalitis virus sample, b – rabies virus

Этот метод подходит для удаления шума и сбоев по линиям скана. Усреднение по строкам можно применить ко всему изображению либо по выбранной области.

С помощью инструмента "Сечение" можно получить профиль рельефа вдоль выбранной линии и оценить перепад высот (рис.1).

ИЗМЕРЕНИЕ УГЛОВ, РАССТОЯНИЙ, ДЛИН ЛОМАНЫХ ЛИНИЙ

С помощью линейки можно измерить расстояние или размер интересующего объекта, а также при помощи меток посчитать количество частиц в поле зрения (рис.2 и 3). В программном

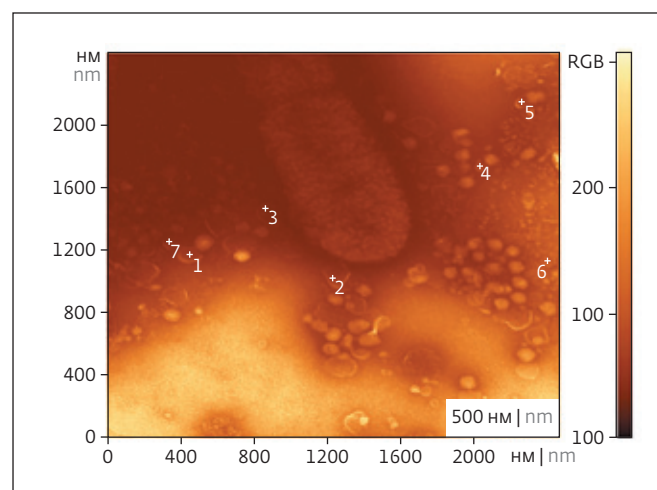


Рис.3. Подсчет числа вирусных частиц в образце вакцины против бешенства

Fig.3. Count of the number of viral particles in a rabies vaccine sample

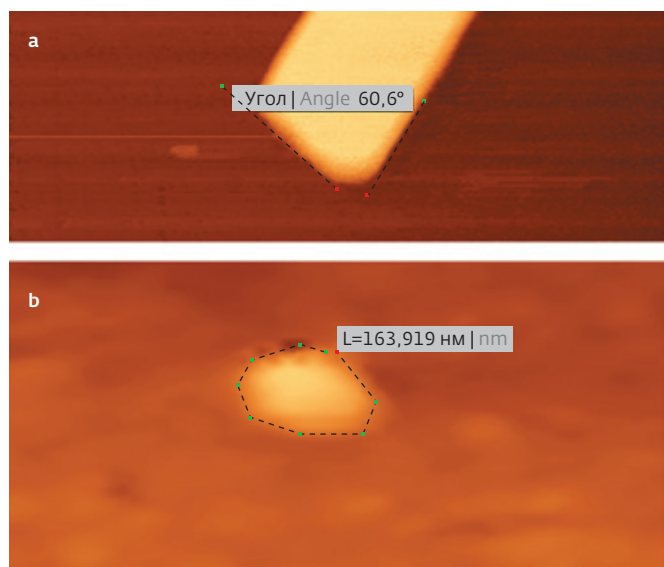


Рис.4. Атомно-силовая микроскопия: а – измерение угла кристалла NaCl, б – измерение контурной длины вируса клещевого энцефалита

Fig.4. Atomic force microscopy: a – measurement of the NaCl crystal angle, b – measurement of the contour length of the tick-borne encephalitis virus

обеспечении возможна обработка данных, полученных с помощью других видов микроскопии, например просвечивающей электронной микроскопии.

При работе с изображением можно использовать различные виды фильтрации. Боковая подсветка позволяет повысить контраст изображения и сделать мелкие детали более явными без потери информации о крупных объектах (рис.5).

Фильтр Винера позволит осуществить фильтрацию выбранной области с маской произвольного размера. Данная команда позволяет избавиться от случайного шума на изображении. Медианная фильтрация позволяет сгладить резкие выбросы на изображение и, в отличие от усреднения, сохраняет ступеньки. Фильтр Медиана X в качестве маски использует конфигурацию в виде X размером 3×3 пикселя (рис.6).

АНАЛИЗ ШЕРОХОВАТОСТИ ПОВЕРХНОСТИ

В простейшем случае шероховатость (а именно R_a , средняя шероховатость) – это среднее арифметическое отклонение профиля сечения от прямой его общего наклона. Для того чтобы

The article addresses in detail how to process the images obtained after scanning. In most cases, the perception and interpretation of the obtained results largely depend on correct visualization [1].

The resulting image can have a general tilt or a general curvature caused by temperature drift or non-linearity of the piezoceramic manipulator. The first thing to do when processing an image in FemtoScan Online software is to remove the average slope calculated by the least squares method or using splines.

There is often a noise component in the image. In order to eliminate it, you can use a useful option – alignment of all lines of the image to the average level. This option replaces the value at each point with the arithmetic mean of

all points in its immediate vicinity. This method is suitable for removing noise and glitches along scan lines. Line averaging can be applied to the entire image or a selected area.

Using the Section tool, you can get a relief profile along the selected line and estimate the elevation difference (Fig.1).

MEASUREMENT OF ANGLES, DISTANCES, LENGTHS OF BROKEN LINES

Using the ruler, you can measure the distance or size of the object of interest, and also use the marks to count the number of particles in the field of view (Fig.2 and 3). The software can process data obtained using other types of microscopy, for example, transmission electron microscopy.

When working with an image, you can use various types

of filtering. Side illumination allows you to increase the contrast of the image and make small details more pronounced without losing information about large objects (Fig.5).

The Wiener filter will filter the selected area with a mask of an arbitrary size. This command allows you to get rid of random noise in the image. Median filtering allows you to smooth out sharp outliers on the image and, unlike averaging, preserves steps. The Median X filter uses a 3×3 pixel X configuration as a mask (Fig.6).

SURFACE ROUGHNESS ANALYSIS

In the simplest case, the roughness (namely, R_a , the average roughness) is the arithmetic mean deviation of the cross-sectional profile from the straight line of its total slope. In order to determine the average surface

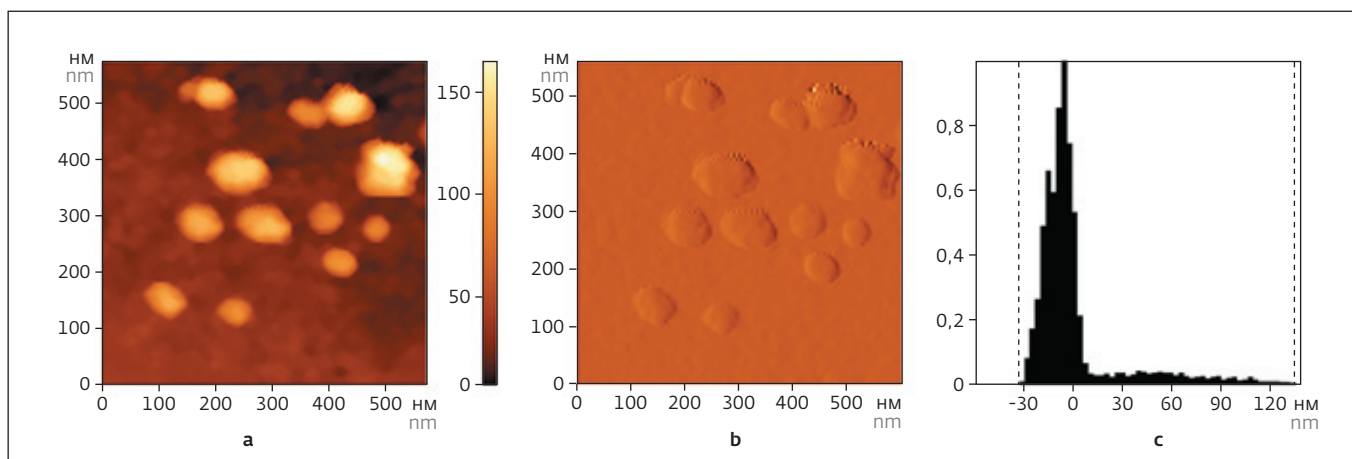


Рис.5. *a* и *b* – изображения вирусных частиц клещевого энцефалита с боковой подсветкой и без; *c* – гистограмма распределения по высоте указанной поверхности

Fig.5. *a* and *b* – images of viral particles of tick-borne encephalitis with and without side illumination; *c* – histogram of the distribution along the height of the indicated surface

определить среднюю шероховатость поверхности, строят несколько сечений. В диалоговом окне "Параметры" можно выбрать количество сечений и расстояние между сечениями, длину и угол наклона к горизонтали (рис.7). Угол наклона можно задавать вручную. Если поверхность представляет

собой слоистую структуру, лучше использовать автоматическое определение угла.

Также можно использовать функцию анализ зерен, она позволяет определить истинные геометрические характеристики объектов на поверхности: площадь, высоту, периметр, объем (рис. 8).

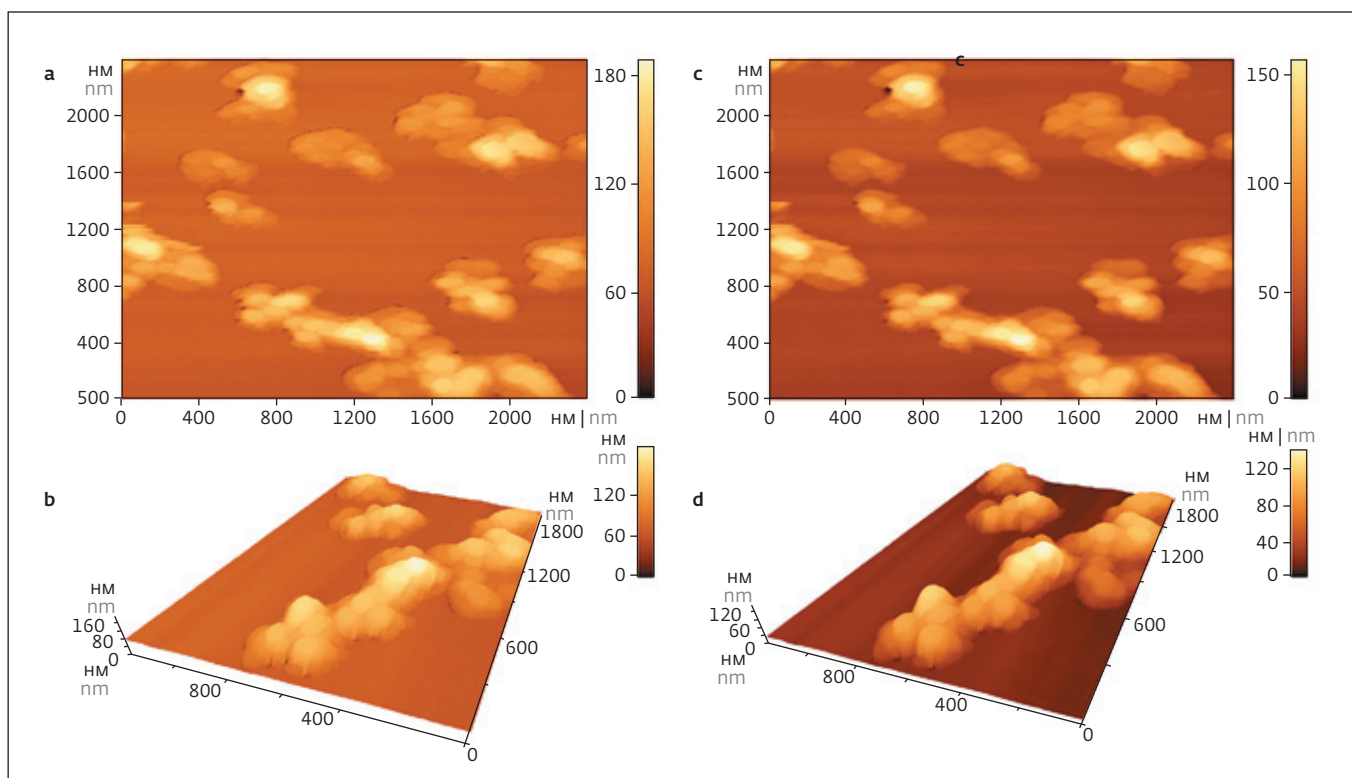


Рис.6. *a*, *b* – изображения вируса гриппа после удаления среднего наклона; *c*, *d* – после применения фильтра Медиана X

Fig.6. *a*, *b* – images of the influenza virus after removing the mean slope; *c*, *d* – after applying the Median X filter

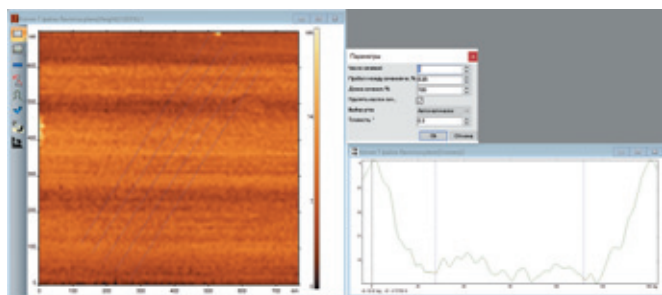


Рис.7. Анализ шероховатости поверхности формируется по пяти сечениям, в диалоговом окне можно скорректировать параметры

Fig.7. Analysis of surface roughness is generated by 5 sections, the parameters are adjustable in the dialog box

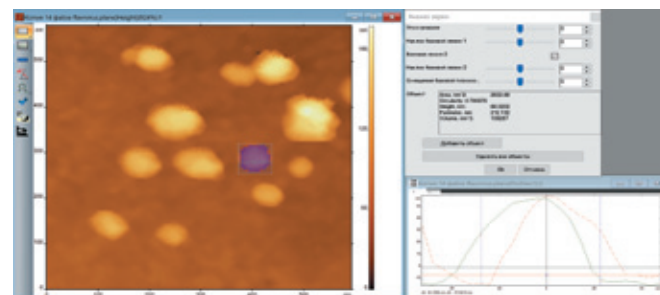


Рис.8. Пример функции анализа зерен. Можно увидеть площадь объекта, высоту, периметр (длина контурной линии в проекции на плоскость XY), объем объекта. В диалоговом окне можно скорректировать уровень базисной линии, по которой строится сечение

Fig.8. An example of a grain analysis function. You can see the area of the object, height, perimeter (length of the contour line in projection onto the XY plane), and the object volume. In the dialog box you can adjust the baseline level along which the section is built

Снятие силовых кривых позволяет не только измерять кривую силы в каждой точке поверхности, но и фактически контролировать взаимодействие зонда и образца.

Наиболее интересной и художественной задачей является выбор цветовой палитры и создание 3D-изображений.

Еще одной удобной функцией является возможность синхронного перемещения выделенной области, детального изображения, участка сечения и изображения Фурье (рис.9).

"ФемтоСкан Онлайн" распознает изображения, полученные в других форматах, в том числе микроскопов других компаний, которые уже не выпускаются. Программа осуществляет допечатную подготовку и подготовку изображений: подсветку, настройку

цветов и шрифтов, создание 3D-изображений и видео с полетом над поверхностью, стереорежим для 3D-изображений и многое другое [2-9].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Лондонского Королевского Общества №21-58-10005, РФФ (проект № 20-12-00389) и РФФИ (проект № 20-32-90036).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B. Online software and visualization of nanoobjects in

roughness, several sections are built. In the Parameters dialog box, you can select the number of sections and the distance between sections, the length and angle of inclination to the horizontal (Fig.7). The tilt angle can be set manually. If the surface is a layered structure, it is better to use automatic angle detection.

You can also use the function of grain analysis, it allows you to determine the true geometric characteristics of objects on the surface - area, height, perimeter, and volume (Fig.8).

Taking off force curves allows not only to measure the force curve at each point of the surface, but also to actually control interaction of the probe and the sample.

The most interesting and artistic challenge is choosing a color palette and creating 3D images.

Another convenient function is the ability to synchronously move the selected area, detailed image, section area and Fourier image (Fig.9).

FemtoScan Online software recognizes images received in other formats, including

microscopes of other companies that are no longer available. The program carries out prepress preparation and image preparation: backlighting, setting colors and fonts, creation of 3D images and videos including a fly over the surface, stereo mode for 3D images and much more [2-9]. ■

The research was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research and the Royal Society of London No. 21-58-10005, the Russian Science Foundation, project No. 20-12-00389, and the Russian Foundation for Basic Research, project No. 20-32-90036.

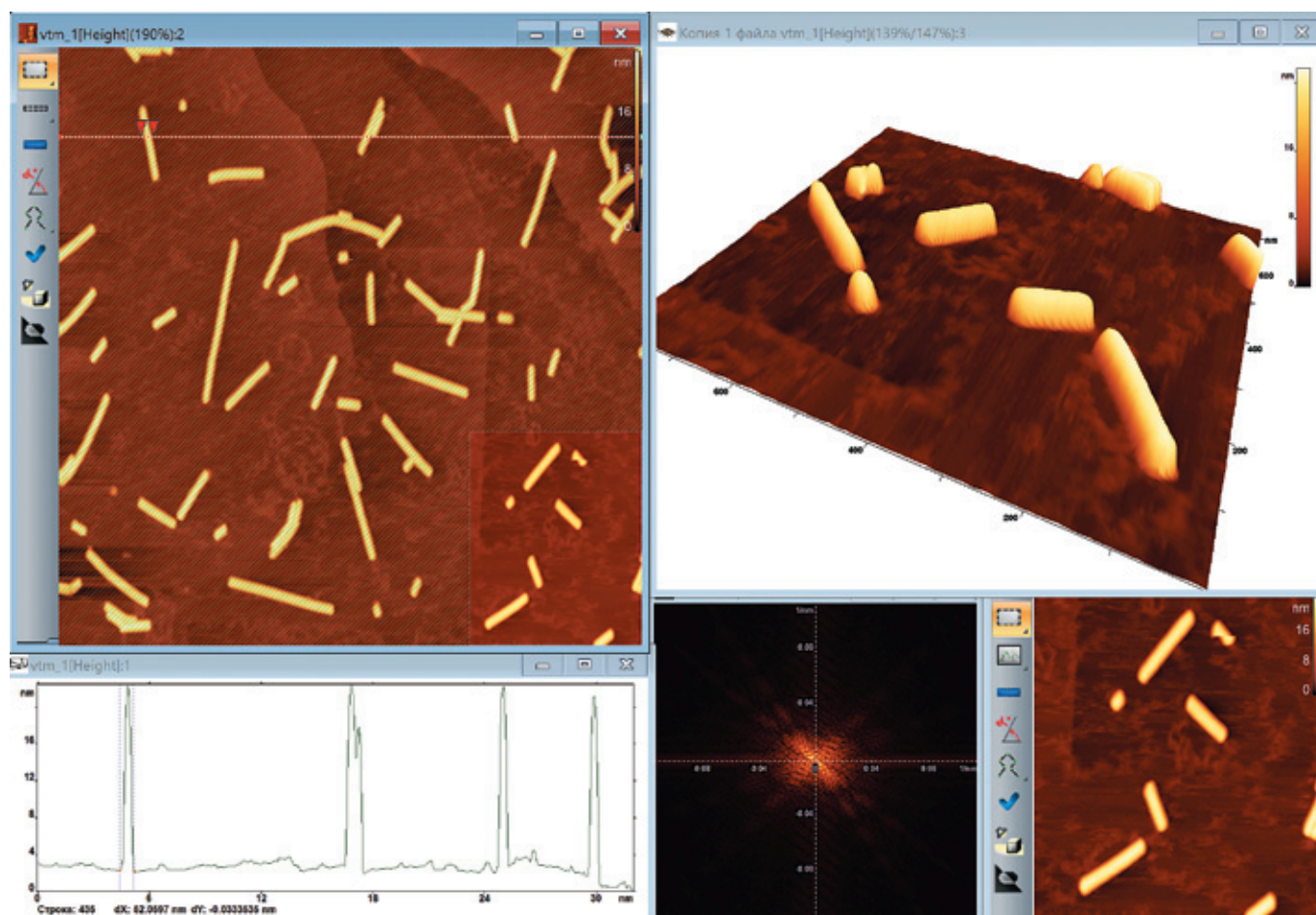


Рис.9. Одновременное отображение вируса табачной мозаики: обзорное изображение со "скользящей" областью, детальное изображение, участок сечения и изображение Фурье. Благодарим за предоставленное изображение к.х.н. Синицыну О.В.
 Fig.9. Simultaneous display of the tobacco mosaic virus: overview image with "sliding" area, detailed image, sectional area and Fourier image. We express our thanks to O.V. Sinitsyn, Cand. of Sc. (Chemistry) for the provided image

- high-resolution microscopy. *Nanoindustry*, 11, 6 (85), (2018), 414-416.
2. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. FemtoScan Online software platform for biomedical applications and materials science // *Medicine and high technologies*, 2, (2018), 10-13.
 3. Filonov A.S., Yaminsky I.V., Akhmetova A.I., Meshkov G.B. FemtoScan Online! Why? *NANOINDUSTRY*, 84 (5), (2018), 339-342.
 4. Yaminsky I.V., Filonov A.S., Sinitsyna O.V., Meshkov G.B. Software FemtoScan Online. *Nanoindustry*, 2 (64), (2016), 42-46.
 5. Электронный ресурс http://en.nanoscopy.ru/software/femtscan_online/
 6. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. Scanning probe microscopy in solving problems of virology // *Nanoindustriya*. 13, 6 (100), (2020), 340-345.
 7. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. The role of scanning probe microscopy in bacteria investigations and bioremediation, in: P.Singh, A.Kumar, A.Borthakur (Eds), *Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies*, Elsevier, (2020), pp. 287-312. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00014-X>
 8. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. Experimental possibilities of bionanoscopia in solving practical problems of biology and medicine // *Medicine and high technologies*. 4, (2019), 15-18.
 9. Shugunov L.Zh., Shugunov T.L., Yaminsky I.V. Choice of a method for processing the results of surface investigation by a scanning probe microscope FemtoScan Online // *Nano and microsystem technology*. 22, 4, (2020), 190-193.