

Применение программы ImageJ для картирования химических элементов методом рентгеновского микроанализа на сканирующем электронном микроскопе

С.В. Буравков^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Резюме. Введение. Картирование химических элементов методом рентгеновского микроанализа на сканирующем электронном микроскопе дает возможность получить информацию о химическом составе в каждой точке изображения, однако программное обеспечение электронных микроскопов не позволяет детально анализировать карты распределения химических элементов.

Целью исследования являлась разработка алгоритмов применения программы ImageJ для анализа карт распределения химических элементов шлифов бедренной кости крысы, полученных с помощью энергодисперсионного микроанализа на сканирующем электронном микроскопе.

Материалы и методы. Работа выполнена на бедренных костях крыс Вистар, фиксированных в 10% формалине и обезвоженных в спиртах возрастающей концентрации. Эпидиофизарные области монтировали на углеродной ленте и заливали цианометакрилатным клеем, после чего шлифовали анализируемую поверхность. Для построения калибровочной кривой внешние стандарты не использовались. Программное обеспечение микроскопа JSM-7000 позволяет определять процентное содержание элемента по прямоугольной площади изображения на карте распределения (среднее). Это же изображение использовалось в ImageJ для определения его средней яркости (уровня серого). Таким образом, набрав определенное количество изображений с разными концентрациями кальция и фосфора, строили калибровочную кривую, где определенной концентрации элемента соответствовала яркость. В этом случае концентрация элементов может варьироваться от 0 до 100 процентов, а яркость от 0 до 255 градаций (в случае 8-битного изображения).

Результаты. Показано, что, используя калибровочную кривую, можно преобразовать карту распределения элементов из интенсивности яркости в концентрацию и, применяя пакет анализа изображений ImageJ, автоматизировать измерения, а также получить данные по колокализации нескольких химических элементов и их корреляции.

Заключение. Реализация алгоритмов, описанных в данной статье с применением программы ImageJ при картировании химических элементов методом рентгеновского микроанализа на шлифах костной ткани, значительно расширяет возможности программного обеспечения сканирующего электронного микроскопа и позволяет получить дополнительную информацию.

Ключевые слова: программное обеспечение ImageJ, рентгеновский микроанализ, картирование химических элементов, сканирующая электронная микроскопия, бедренные кости крыс

Для корреспонденции: Сергей Валентинович Буравков. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru

Для цитирования: Буравков С.В. Применение программы ImageJ для картирования химических элементов методом рентгеновского микроанализа на сканирующем электронном микроскопе. Клини. эксп. морфология. 2025;14(5):78–84. DOI: 10.31088/CEM2025.14.5.78-84.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

Статья поступила 14.04.2025. Получена после рецензирования 17.06.2025. Принята в печать 27.06.2025.

ImageJ software for elemental mapping using X-ray microanalysis on a scanning electron microscope

S.V. Buravkov^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Elemental mapping with X-ray microanalysis on a scanning electron microscope gives the information about the chemical composition at each point in the image, but the software of electron

microscopes does not provide detailed analysis of the elemental maps. The study aimed to develop algorithms applying the ImageJ freeware program to analyze X-ray maps of rat femur sections obtained using energy-dispersive microanalysis on a JCM-7000 scanning electron microscope (Japan).

Materials and methods. The research was performed on femurs of Wistar rats, fixed in 10% formalin and dehydrated in a graded series of alcohols. The epidiaphyseal bone regions were mounted on carbon tape and embedded in cyanomethacrylate glue; having been polymerized, the samples were polished and analyzed. No external standards were used for calibration curve construction. The microscope software enabled determination of the average elemental percentage within a rectangular area of the image on the distribution map. The same image was processed in ImageJ to determine average brightness (gray level). Thus, having collected a certain number of images with different calcium and phosphorus concentrations, I constructed a calibration curve, where a certain elemental concentration corresponded to a specific brightness value. Elemental concentrations ranged from 0 to 100%, while brightness values ranged from 0 to 255 grayscale units (in 8-bit images).

Results. Application of the calibration curve allows to convert the element distribution map from brightness intensities to concentrations levels. Using the ImageJ software package, this approach allows automation of measurements and provides data on the colocalization and correlation of several chemical elements.

Conclusion. The algorithms described here can be effectively applied in ImageJ for elemental mapping in bone tissue sections using X-ray microanalysis. This approach significantly expands the functionality of scanning electron microscope software and provides additional essential information.

Keywords: ImageJ software, X-ray elemental mapping, electron probe microanalysis, scanning electron microscopy, rat femur

Corresponding author: Sergey V. Buravkov. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru

For citation: Buravkov S.V. ImageJ software for elemental mapping using X-ray microanalysis on a scanning electron microscope. Clin. exp. morphology. 2025;14(5):78–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM 2025.14.5.78-84.

Funding. The study was conducted under the State Assignment of Lomonosov Moscow State University.

Received 14.04.2025. **Received in revised form** 17.06.2025. **Accepted** 27.06.2025.

Введение

Рентгеновский микроанализ – это метод аналитической электронной микроскопии, который осуществляется с помощью электронного микроскопа. Он основан на генерации характеристических рентгеновских лучей в атомах образца при взаимодействии с падающими электронами пучка. В результате такого взаимодействия генерируются рентгеновские лучи, являющиеся характеристическими, то есть содержащими информацию о том, какие элементы присутствуют в данном образце. Существует множество электронных оболочек и подоболочек, каждая из которых обладает своей определенной энергией, поэтому имеется множество потенциально возможных переходов электронов. Если электрон срывается с К-оболочки, результирующий рентгеновский пик называется К-линией в спектре; если с L-оболочки, то L-линией, и так далее. Кроме того, падающие электроны генерируют фоновые или сплошные рентгеновские лучи. Эти рентгеновские лучи являются тормозными, возникающими из-за взаимодействия падающих первичных электронов с ядром атома.

Как и у любого другого метода, у рентгеновского микроанализа существует минимальный детектируемый порог, определяемый интенсивностью падающих электронов и чувствительностью детектора. Самая низкая концентрация элемента, которую можно

обнаружить, составляет порядка нескольких миллимолей на килограмм или несколько сотен частей на миллион, а наименьшее количество элемента – 10–18 г. Пространственное разрешение анализа зависит от толщины образца. Наилучший результат достигается в тонких срезах, где, как правило, диаметр анализируемого объема равен примерно половине толщины среза. При анализе объемных образцов в сканирующем электронном микроскопе пространственное разрешение и минимальная детектируемая концентрация химического элемента зависят от ускоряющего напряжения и состава образца. Типичное значение для анализа лиофилизированного биологического материала при ускоряющем напряжении 20 кВ – приблизительно 10 мкм [1].

Скорость и точность анализа с использованием энергодисперсионной спектроскопии в сканирующем электронном микроскопе значительно повысились за последние 10 лет благодаря увеличению отношения сигнал/шум за счет улучшения сбора и обработки сигналов.

Энергодисперсионная спектроскопия может проводиться в трех режимах: анализ химических элементов в точке, распределение элементов по линии и, наконец, анализ распределения по площади, или картирование. Последний режим наиболее интересен, поскольку в каждой точке имеется полный спектр, то есть все

присутствующие элементы. Тем не менее программное обеспечение электронных микроскопов не позволяет детально анализировать карты распределения химических элементов.

В настоящее время при анализе различных изображений применяются многочисленные пакеты, в том числе свободно распространяемые. К последним относится и широко используемая научными сотрудниками программа для анализа изображений ImageJ (NIH, США), написанная на языке Java, благодаря чему она является кроссплатформенной, то есть может быть задействована в среде разных операционных систем. Благодаря свободному распространению программы многие пользователи написали к ней различные макросы и плагины, значительно расширяющие ее возможности. Изначально программа была разработана W. Rasband в 1987 году для пользователей Macintosh и называлась NIH Image [2], в 1997 году она была переделана под Java и названа ImageJ [3].

В связи с этим целью исследования являлась разработка алгоритмов применения программы ImageJ для анализа карт распределения химических элементов в шлифах бедренной кости крысы, полученных с помощью энергодисперсионного микроанализа на сканирующем электронном микроскопе JCM-7000 (JEOL, Япония).

Материалы и методы

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г. При проведении исследований автор руководствовался положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Исследование одобрено комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 515 от 10.06.2019).

Животных под изофлурановым наркозом декапировали, извлекали бедренную кость и фиксировали в 10% формалине. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации ее высушивали на воздухе при комнатной температуре. Эпифизарно-диафизарную часть кости монтировали на углеродную ленту с помощью цианометакрилатного клея, после чего шлифовали серией абразивной наждачной бумаги (марки 3М до P2500 с размером зерна 3–5 мкм) в продольном направлении до срединной части, используя микропылесос для удаления мелких остатков. Как показало проведение предварительного микроанализа, цианометакрилатный клей не вносит дополнительных химических элементов, кроме углерода и азота. Для снятия электростатического заряда использовали незначительное напыление золотом, которое не детектировалось при анализе.

Подготовленные таким образом образцы (рис. 1 А) анализировали в настольном сканирующем электрон-

ном микроскопе JCM-7000, оснащенном энергодисперсионным спектрометром, при ускоряющем напряжении 15 кВ. Карты распределения химических элементов (углерод, кальций, фосфор, сера) регистрировали при накоплении 20 кадров и разрешении 512×384 точек (8 или 16 бит на точку). Количественный анализ проводили без применения стандартов с использованием ZAF-коррекции, встроенной в программное обеспечение микроскопа.

Для построения калибровочной кривой внешние стандарты не использовались. Программное обеспечение микроскопа позволяет определять процентное содержание элемента по прямоугольной площади изображения на карте распределения (среднее). Это же изображение использовалось в ImageJ для определения его яркости. Таким образом можно было набрать определенное количество изображений с разными концентрациями кальция и фосфора и построить калибровочную кривую, где определенной концентрации элемента будет соответствовать яркость. В этом случае концентрация элементов может варьировать от 0 до 100%, а яркость – от 0 до 255 градаций (в случае 8-битного изображения).

Статистический анализ и анализ колокализации кальция и фосфора проводили встроенными в программу ImageJ средствами. Для вычисления коэффициентов линейной регрессии использовали Excel (Microsoft, США).

Результаты

Сбор и обработка результатов картирования химических элементов на сканирующем электронном микроскопе JCM-7000 осуществляются с использованием программы SMILE VIEW™ Lab (JEOL, Япония), однако ее возможности в анализе карт сильно ограничены. Представление результатов концентрации элементов производится с 8-битной (256 градаций) или 16-битной (65 536 градаций) шкалой яркости.

В настоящее время программа ImageJ и ее клон FIJI являются самой распространенной свободной программой для анализа изображений, имеющей более 31 тысячи публикаций в PubMed.

В данной работе использовались 8-битные карты распределения кальция и фосфора, полученные на шлифах эпифизарно-диафизарных частей бедренных костей крыс. На рисунке 1 В показано, что концентрация кальция значительно различается в разных участках кости, и это отражается по разной интенсивности яркости на изображении. С помощью макросов можно сегментировать определенные зоны для получения количественных данных по содержанию кальция в этих областях (рис. 1 С). Эти макросы включают в себя сегментирование по уровню яркости, подсчет частиц с ограничением по площади и расчет концентрации в соответствии с полученной калибровкой. Необходимо отметить, что калибровочные кривые должны соответствовать битности изображений: 8-битные калибровки

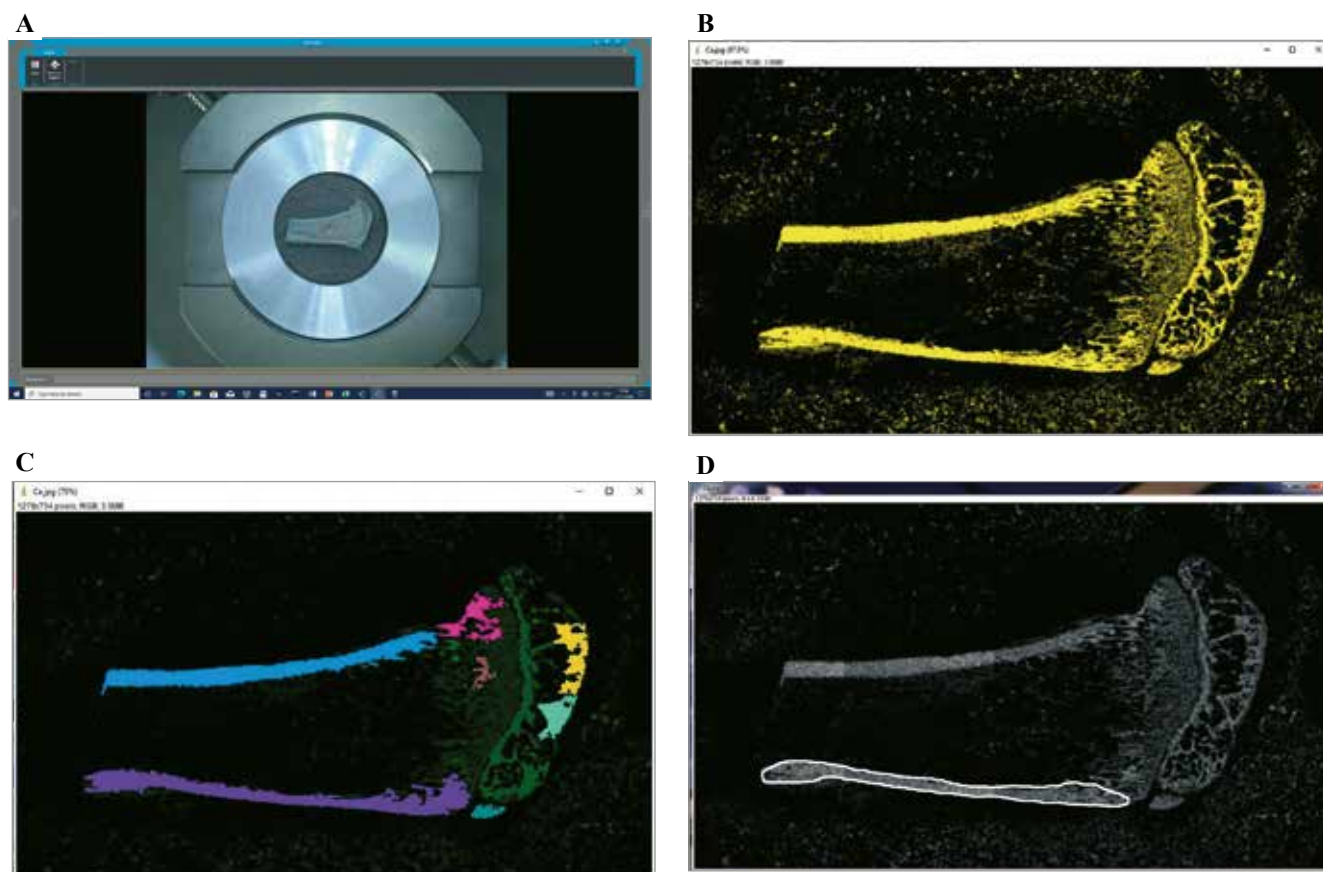


Рис. 1. Картирование кальция в шлифах бедренной кости крыс.

А – общий вид смонтированной кости на предметном столике в микроскопе, В – количественное распределение кальция в процентах, выводимое на микроскопе, С – сегментирование распределения кальция в программе ImageJ для выделения и расчета концентраций кальция в определенных областях кости, D – ручное выделение необходимой области.

Длина маркерной линии – 5 мм (А) и 1 мм (В)

Fig. 1. Calcium mapping in rat femur polished surface.

А – general view of the mounted bone on the microscope stage, В – quantitative calcium distribution (in percents) displayed on the microscope, С – segmentation of calcium distribution map in the ImageJ program to define and calculate calcium concentrations in certain bone areas, D – manual selection of the required area. Scale line – 5 mm (A) and 1 mm (B)

должны использоваться для 8-битных изображений, а 16-битные – для 16-битных изображений. Для сегментирования кальциевых карт распределения использована следующая последовательность операций:

File→Open→Image→Adjust→Color
Threshold→Brightness→Analyze→
Analyze→Particles→(size pixel, show (overlay
masks)→Results→Edit→Apply Macro (ConcCa.txt)

Результаты, полученные в единицах яркости, в конце преобразовывались коротким макросом в концентрацию:

ConcCa.txt

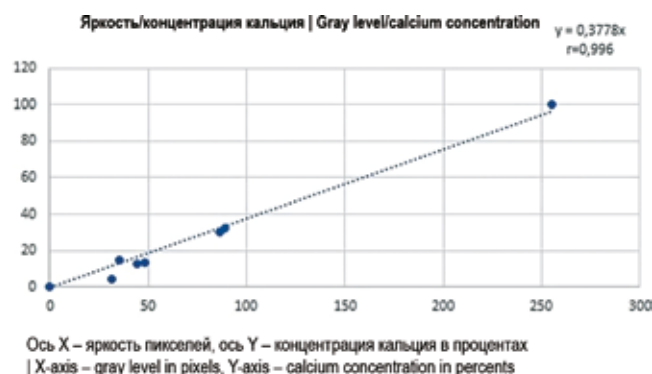
```
Conc=0.38*Mean(row*0.1);
StdDevConc=0.38*StdDev(row*0.1);
MinConc=0.38*Min;
MaxConc=0.38*Max;
```

После сегментирования изображения и выполнения макроса при заданных параметрах выделяются семь областей (рис. 1 С). Интересующую зону можно выделять и вручную, как это представлено на рисунке 1 D, однако сделать это труднее, особенно если она имеет сложную конфигурацию.

На рисунке 2 А представлена калибровочная кривая для 8-битного варианта, где показана зависимость значения яркости от процентной концентрации кальция. Можно видеть линейную зависимость ($r=0,996$) вида $y = 0,3778 \times x$, где y – концентрация кальция в процентах, а x – уровень яркости, соответствующий этой концентрации. Таким образом, простым перерасчетом можно переходить от яркости на концентрацию (рис. 2 В). Сравнивая результаты ручного и автоматического выделения, можно видеть, что показатели очень близки (рис. 2 С).

Использование плагина колокализации (Colocalization Finder) дает возможность получить данные о

А



В

Results								
	Mean	StdDev	Min	Max	Conc	StdDevConc	MinConc	MaxConc
1	69.261	20.424	41	149	26.319	7.761	15.580	56.620
2	71.119	17.462	41	135	27.025	6.636	15.580	51.300
3	69.958	17.309	41	125	26.584	6.577	15.580	47.500
4	86.808	21.640	41	165	32.987	8.223	15.580	62.700
5	58.780	10.888	43	103	22.337	4.130	16.340	39.140
6	71.415	17.994	41	130	27.138	6.838	15.580	49.400
7	82.954	22.335	41	162	31.523	8.487	15.580	61.560
8	67.506	12.136	42	100	25.652	4.612	15.960	38.000

С

Results								
	Mean	StdDev	Min	Max	Conc	StdDevConc	MinConc	MaxConc
1	83.660	25.666	0	162	31.791	9.753	0	61.560

Рис. 2. Преобразование уровней яркости в концентрации кальция с использованием программы ImageJ.

А – калибровочная кривая, построенная на областях с известными концентрациями кальция, В – результаты преобразования уровней яркости в концентрации в областях, выделенных с помощью программы ImageJ на рис. 1 С, С – результаты ручного выделения области 7

Fig. 2. Transformation of gray levels into calcium concentrations using the ImageJ software.

А – calibration curve constructed on the areas with known calcium concentrations, В – results of transforming brightness levels into concentrations in the areas selected using the Image J software in Fig. 1C, С – results of manual selection of area 7

взаимной локализации двух химических элементов. Так, например, на рисунках 3 А и В представлены карты распределения фосфора и кальция в шлифе бедренной кости крыс. Композитное изображение распределения фосфора и кальция свидетельствует о высокой степени наложения обоих химических элементов (рис. 3 С), что наглядно видно на графике рассеяния (рис. 3 D). Можно отметить, что точки группируются вдоль оси под углом 45°, и это свидетельствует о высокой степени наложения обоих химических элементов. Количественные данные (рис. 3 Е) также указывают на прямую связь между распределением фосфора и кальция (коэффициент Пирсона равен 0,929).

Все карты в рентгеновской энергетической спектроскопии регистрируются одновременно точка за точкой, поэтому они являются инцидентными и представлены двумерной матрицей концентрации. Это дает возможность проводить корреляционные исследования распределения различных химических элементов. Одна из ранних работ по обработке изображений в рентгеновском микроанализе появилась в 1989 году [4]. Первые коммерческие анализаторы изображений (IBAS, Kontron, ФРГ) позволили расширить аналитические возможности рентгеновского микроанализа в электронной микроскопии, однако элементные карты регистрировались на фотопленке, что требовало совмещения их при вводе в компьютер

через телекамеру. Кроме того, они представляли собой только качественные бинарные изображения, где плотность расположения точек соответствовала большей или меньшей концентрации.

В настоящем исследовании были использованы количественные карты распределения химических элементов, полученные на микроскопе JEOL, JCM-700, оснащенный рентгеновским спектрометром. Программное обеспечение ImageJ позволило реализовать алгоритмы сегментирования изображений для выделения и измерения интересующих областей, а также провести оценку колокализации и корреляции двух карт распределения между собой. Кроме того, использование сторонних программ для обработки карт дает возможность разнести сбор данных и их обработку. Такой же подход был реализован А. LeFurgey et al. [5] в 1991 году. Это дает возможность исследовать микрохимический состав клеток в сфере клеточной физиологии с прицелом на ионную (элементную) компартментализацию, то есть морфофункциональную корреляцию структуры и функции на клеточном и субклеточном уровне.

Схожий с нашим подход был применен К. V. Dahl et al. [6] в 2007 году для построения количественных профилей химических элементов. Авторы использовали данные, полученные из калибровочной кривой для преобразования яркости на элементных картах в концентрацию.

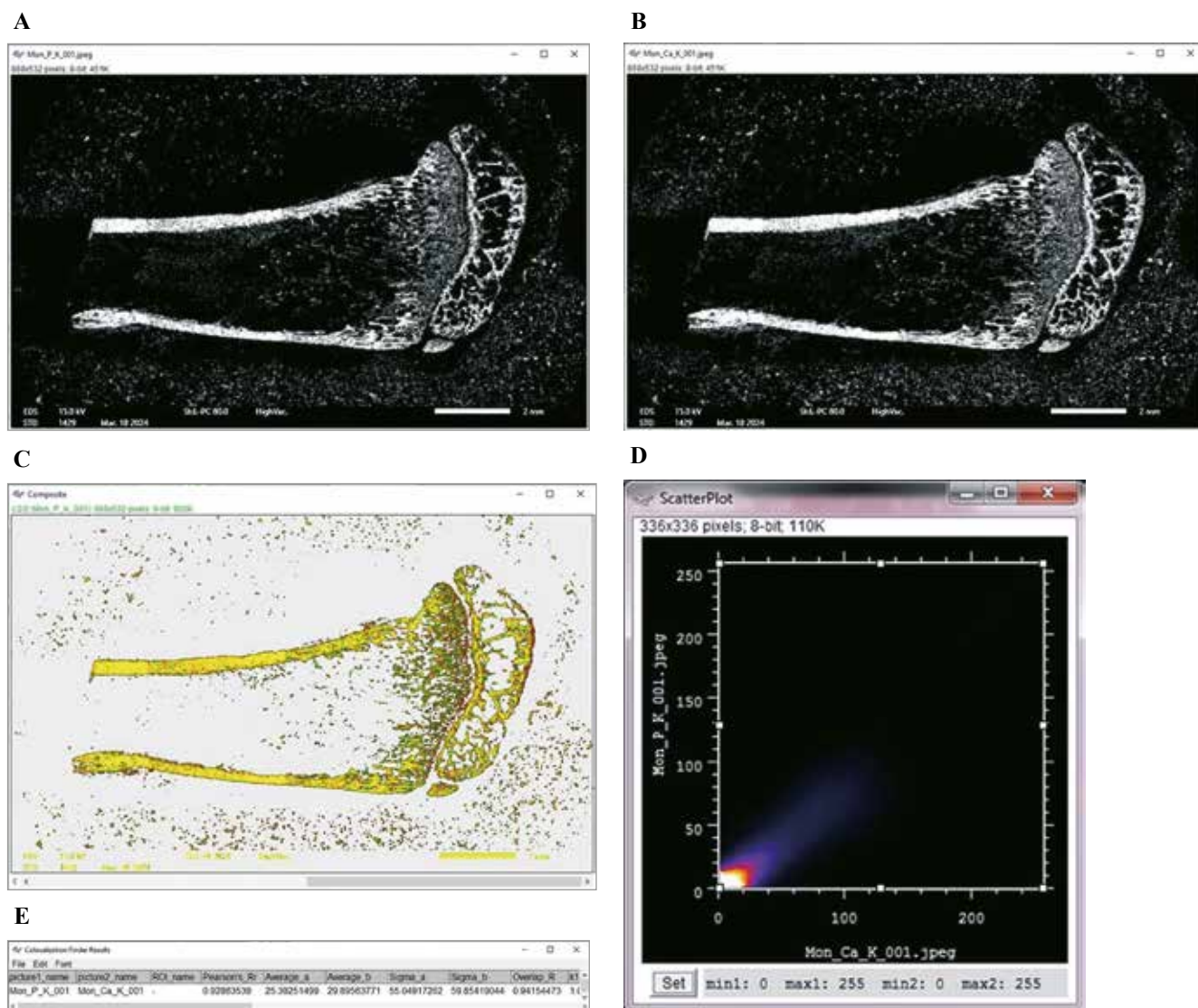


Рис. 3. Колокализация распределения фосфора и кальция в шлифах бедренной кости крыс.

А – карта распределения фосфора, В – карта распределения кальция, С – совместные места распределения фосфора и кальция на карте (совместные места присутствия фосфора и кальция представлены желтым цветом), D – диаграмма рассеяния колокализации фосфора и кальция, Е – количественные данные критерия Пирсона для колокализации фосфора и кальция. Длина маркерной линии – 2 мм

Fig. 3. Colocalization of phosphorus and calcium distribution in rat femur sections.

А – phosphorus distribution map, В – calcium distribution map, С – joint locations of phosphorus and calcium distribution on the map (joint locations of phosphorus and calcium presence are shown in yellow), D – scatter plot of phosphorus and calcium colocalization, Е – quantitative data of Pearson's test for phosphorus and calcium colocalization. Scale line – 2 mm

Закключение

Реализация алгоритмов, описанных в статье, при картировании химических элементов методом рентгеновского микроанализа на шлифах костной ткани значительно расширяет возможности программного обеспечения сканирующего электронного микроскопа. Сегментирование рентгеновских изображений элементных карт при этом может быть проведено как в ручном, так и в автоматическом режиме, что делает измерение концентрации в изучаемых областях более точным и быстрым. Больше возможностей при использовании свободного программного обеспечения ImageJ открывается и при корреляционном

анализе распределения двух и более химических элементов, а также при анализе их колокализации.

Предлагаемые алгоритмы могут быть использованы для картирования химических элементов не только на шлифах костной ткани, но и на гистологических срезах, подготовленных криогенными методами для сохранения нативного содержания и распределения химических элементов и ионов.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The author declares no conflict of interest.

Литература/References

1. Roomans GM, Dragomir A. X-ray microanalysis in the scanning electron microscope. *Methods Mol Biol.* 2014;1117:639–61. DOI: 10.1007/978-1-62703-776-1_28.
2. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
3. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Georges Uzan G et al. Angiogenesis analyzer for ImageJ – a comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Sci Rep.* 2020;10(1):11568. DOI: 10.1038/s41598-020-67289-8.
4. Буравков С.В. Цифровая обработка изображений в рентгеновском микроанализе. *Цитология.* 1989;31(10):1251–1255. Buravkov SV. Digital image processing in X-ray microanalysis. *Tsitologiya = Cytology.* 1989;31(10):1251–1255.
5. LeFurgey A, Davilla SD, Kopf DA, Sommer JR, Ingram P. Real-time quantitative elemental analysis and mapping: microchemical imaging in cell physiology. *J Microsc.* 1992;165(Pt 2):191–223. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1992.tb01481.x.
6. Dahl KV, Hald J, Horsewell A. Grey-scale conversion X-ray mapping by EDS of multielement and multiphase layered microstructures. *J Microsc.* 2007;225(Pt 1):31–40. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01713.x.

Информация об авторе

Сергей Валентинович Буравков – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Author information

Sergey V. Buravkov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Cell Structures Image Analysis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University; Leading Researcher, Laboratory of Muscle Activity Physiology, Institute of Biomedical Problems. <https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>