

Piotr WOJCIECHOWSKI, Artur BAL
POLITECHNIKA ŚLĄSKA, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice

Metoda znajdowania komórek i zliczania ognisk występowania histonu γ -H2AX w obrazach na potrzeby detekcji dwuniciowych pęknięć DNA

Inż. Piotr WOJCIECHOWSKI

Student Politechniki Śląskiej kierunku Biotechnologia o specjalizacji Bioinformatyka. Jego zainteresowania badawcze dotyczą przetwarzania i analizy obrazów biomedycznych.



e-mail: piotr.k.wojciechowski@gmail.com

Dr inż. Artur BAL

Absolwent Politechniki Śląskiej, gdzie pracuje na stanowisku adiunkta w Instytucie Automatyki. Jego zainteresowania badawcze dotyczą m.in. przetwarzania i analizy obrazów, a w szczególności: analizy obrazów biomedycznych, obszarowej segmentacji obrazów, wizualnej archiwizacji obiektów, odwzorowania barw. Jest kierownikiem Laboratorium Wizualnej Archiwizacji Cyfrowej utworzonego w Instytucie Automatyki Politechniki Śląskiej.



e-mail: artur.bal@polsl.pl

Streszczenie

Niniejsza praca opisuje algorytm automatyzujący proces zliczania ognisk histonu γ -H2AX w obrazach mikroskopowych. Ogniska te są miejscami, w których doszło do fosforylacji białka histonu H2AX w pozycji seryny 139 wskutek dwuniciowych pęknięć DNA. Proponowana metoda działa dwuetapowo. Najpierw w obrazie mikroskopowym selekcjonowane są obiekty uznawane za komórki, a następnie na obszarze tych obiektów poszukiwane są miejsca wyznaczone barwnikiem fluorescencyjnym związanym z przeciwciałem anti- γ -H2AX — miejsca te wskazują na lokalizację ognisk γ -H2AX.

Słowa kluczowe: γ -H2AX, dwuniciowe pęknięcia DNA, przetwarzanie obrazów, obrazy biomedyczne, segmentacja wododziałowa.

Method for cell finding and histone γ -H2AX foci counting in images for detecting DNA double-strand breaks

Abstract

This paper describes an algorithm for automating the process of counting foci of histone γ -H2AX in microscope images. Foci are the places where there occurred H2AX protein phosphorylation on Ser139 site in response to DNA double-strand breaks (DSBs). In a γ -H2AX genotoxic test the number of foci per a single cell is counted. The proposed method works in two stages. The first stage is segmentation of a microscopic image (Fig. 1a) for selecting cell regions. For this purpose fusion of binarization methods is used – for each pixel the result is obtained by comparison of the results from the Otsu method, the triangle method and the method in which the threshold is equal to the image average brightness. The pixel is classified as an object's pixel when at least two methods give such results. For improving segmentation results a morphological filter is used. The results (Fig. 1b) usually comprise regions representing single cells (Fig. 1c) and a set of agglomerated cells (Fig. 1d). A modified watershed segmentation and region classify method is used for separation of agglomerated cells into regions representing only one cell. The final result (Fig. 1e) contains only regions representing single cells. In the second stage for each single cell region the foci (which are marked with a fluorescent indicator joined with anti- γ -H2AX antibody) are found (Fig. 3) with use of watershed segmentation on the pseudogradient image (which is obtained by aggregation of the results of cell image binarization with different thresholds; Fig. 2). The final results in form of foci number as a function of time after irradiation (Fig. 4) are similar to the test results of non-lethal DNA damages founded in the literature (e.g. [5]) – this allows stating that the presented method gives good results.

Keywords: γ -H2AX, double-strand breaks (DSB), image processing, biomedical images, watershed segmentation.

1. Wprowadzenie

1.1. Tło biologiczne

Choroby nowotworowe są bardzo rozpowszechnione we współczesnym świecie. W krajach rozwiniętych stanowią one, po

chorobach układu krążenia, drugą w kolejności przyczynę zgonów. Jednym z groźniejszych egzogennych czynników nowotworowych jest promieniowanie jonizujące. Prowadzi ono do uszkodzenia DNA w sposób zarówno bezpośredni jak i pośredni. Działanie bezpośrednie polega na bombardowaniu nici DNA przez wiązkę promieniowania, jednak poziom uszkodzeń wywołanych przez nie jest stosunkowo niewielki w porównaniu z działaniem pośrednim, polegającym na działaniu wolnych rodników powstających w wyniku radiolizy cząsteczek wody. To właśnie wolne rodniki indukują szereg reakcji destruktywnie wpływających na komórkę.

Medycyna również wykorzystuje promieniowanie jonizujące, które aktualnie, obok chirurgii i chemioterapii, jest jedną z najszerzej stosowanych metod leczenia nowotworów. Całkowitą dawkę promieniowania niszczącą komórki nowotworowe podaje się w wielu seansach (są to tzw. dawki frakcjonowane), żeby nie narażać pacjenta na nadmierną ekspozycję. Poważnym problemem w radioterapii jest jednak ryzyko wystąpienia odczynów popromiennych u pacjentów po zakończeniu terapii. Ryzyko to ogranicza wysokość podawanej dawki promieniowania. Obecnie, pomimo wielu badań, nie ma testu predykcyjnego, który pozwalałby na rozpoznanie pacjentów o wysokim poziomie ryzyka wystąpienia odczynu popromiennego. Uszkodzenia DNA indukowane przez promieniowanie jonizujące mogą prowadzić do śmierci komórki (co jest celem radioterapii) lub mogą wywołać zmiany cytogenetyczne, w tym mutacje [7, 12]. Aby im zapobiec specyficzne białka sprawdzają poprawność kodu genetycznego, a w wypadku wykrycia nieprawidłowości uruchamiają mechanizmy naprawcze. W zależności od rodzaju uszkodzeń inicjowane są różne rodzaje tych mechanizmów.

Najbardziej powszechne uszkodzenia DNA to uszkodzenie pojedynczych zasad (ang. *base damage*, BD) poprzez różnego rodzaju mutacje punktowe (substytucja, insercja, delecja) oraz jednoniciowe pęknięcia DNA (ang. *single-strand break*, SSB). W tym wypadku odpowiednie enzymy wycinają uszkodzony element nici i odbudowują ją na podstawie matrycy komplementarnej nici DNA przez co naprawa ta jest bardzo szybka i wiernie odwzorowuje stan sprzed uszkodzenia.

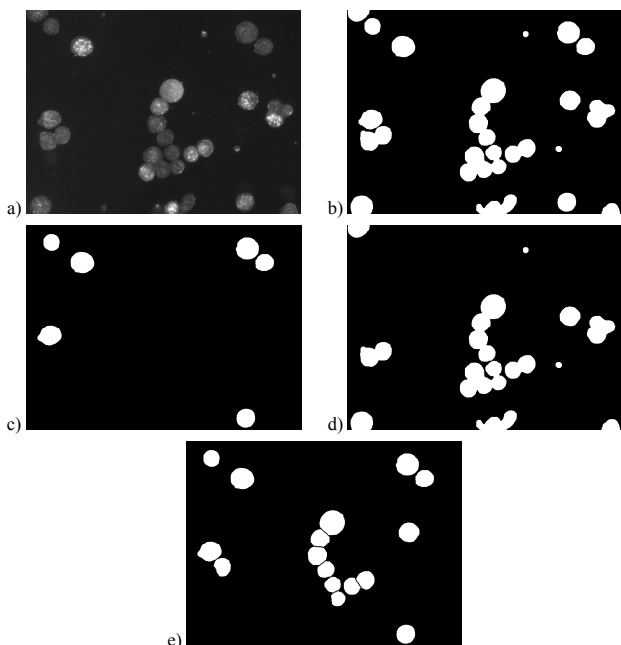
Dwuniciowe pęknięcia DNA (ang. *double-strand break*, DSB) to uszkodzenie materiału genetycznego podczas którego dwie komplementarne nici DNA ulegają pęknięciu w miejscach położonych blisko siebie [7, 9]. Już nawet pojedyncze nienaprawione DSB może spowodować komórkę na szlak apoptozy, dlatego uszkodzenia te często klasyfikowane są jako jedne z najmniejbezpieczniejszych. Mogą one zostać naprawione w procesach homologicznej rekombinacji (HR) polegającej na użyciu chromatydy siostrzanej jako matrycy oraz poprzez niehomologiczne łączenie końców (NHEJ), które „skleja” rozdzielone nici DNA. Obie metody są zasadniczo powolne jednak pierwsza z metod naprawczych jest dość dokładna, podczas gdy w drugiej mogą występować błędy. Nieprawidłowo naprawione lub nie wykryte uszkodzenie w najlepszym wypadku spowoduje komórkę na szlak apoptozy.

Jeśli tak się nie stanie, nastąpi mutacja, która wywoła nowotwór lub w przypadku komórek płciowych spowoduje wady wrodzone lub choroby dziedziczne u potomstwa.

1.2. Test γ -H2AX

Do niedawna ilościowa ocena DSB w komórce prowadzona była za pomocą metod takich jak [7]: elektroforeza żelowa w zmiennym polu magnetycznym (PFGE), test elucji DNA oraz test kometowy (SCGE) jednak były to metody o małej czułości nie pozwalające na ocenę lokalizacji uszkodzeń DNA w jądrze. Dopiero kilka lat temu odkryto, że podczas powstawania DSB dochodzi również do fosforylacji białka histonu H2AX w pozycji seryny 139 (po fosforylacji histon ten oznaczany jest jako γ -H2AX), który bierze udział w tworzeniu kompleksu naprawczego dwuniciowych przerw DNA. Połączenie tej wiedzy z metodami immunocytochemicznymi wiązania ufosforylowanego histonu z odpowiednimi przeciwciałami znakowanymi fluorochromami i mikroskopią fluorescencyjną pozwoliło na obserwowanie pojedynczych ognisk γ -H2AX równoważnych obecności DSB w jądrze.

Istotą testu bazującego na ogniskach γ -H2AX jest ustalenie liczby tego typu ognisk w każdej komórce (typowy obraz uzyskiwany w trakcie tego testu przedstawia rysunek 1a). Manualne ich rozpoznawanie i zliczenie jest długotrwałe oraz obciążone dużym błędem. Z tego powodu coraz częściej próbuje się rozwiązać ten problem wykorzystując metody cyfrowego przetwarzania i analizy obrazów, jednakże ponieważ test γ -H2AX powstał stosunkowo niedawno w literaturze nie ma zbyt wielu propozycji rozwiązania tego zadania. Proponowane rozwiązania najczęściej sprowadzają się do zastosowania w tym zadaniu metod opracowanych na potrzeby innych zastosowań. Jedną z głównych wad takiego podejścia jest odrzucanie z procesu analizy komórek, które się ze sobą stykają (tak połączone komórki często stanowią dużą część komórek widocznych na obrazie) co przekłada się na konieczność dostarczenia odpowiednio większej liczby obrazów do analizy.



Rys. 1. Kolejne etapy przetwarzania obrazu biomedycznego przedstawiającego skupiska komórek: a) obraz oryginalny, b) obraz po binaryzacji i operacjach morfologicznych, c) obszary wstępnie zaklasyfikowane jako komórki, d) obszary pierwotnie odrzucone, e) obszary zaklasyfikowane jako komórki po zastosowaniu metody działów wodnych i ponownej klasyfikacji obszarów odrzuconych

Fig. 1. Steps of biomedical image processing with agglomerated cells (regions joined to each other): a) original image, b) the image after binarization and postprocessing operations, c) regions originally classified as cells, d) rejected regions, e) regions classified as cells after the watershed method and reclassification of the rejected regions

Jedną z nielicznych dedykowanych propozycji rozwiązania tego zadania jest metoda przedstawiona w pracy [1]. W pracy tej zwrócono także uwagę na to, że istniejące metody w mało efektywny sposób wykorzystują komórki tworzące zgrupowania. Zaproponowane rozwiązanie tego problemu wykorzystuje transformację Hougha - wadą tego podejścia jest duży nakład obliczeniowy.

W niniejszej pracy przedstawiono nową metodę lokalizacji ognisk γ -H2AX, przy czym problem nieuwzględniania komórek zagregowanych został rozwiązany przy zastosowaniu metody bazującej na transformacji wododziałowej.

2. Opis opracowanej metody

2.1. Etap selekcji obszarów reprezentujących pojedyncze komórki

W obrazach biomedycznych najczęściej należy oddzielić obiekt od tła, aby przejść do dalszej analizy. Histogramy mają więc rozkład bimodalny, gdzie występują dwa główne piki: jeden odpowiedzialny za tło, drugi zaś za obiekty. Niestety w większości przypadków oba te rozkłady zachodzą na siebie sprawiając, że nie można jasno sprecyzować, które piksele w nachodzących na siebie częściach histogramu należą do tła, a które do obiektu. Często stosowaną w takim przypadku metodą binaryzacji jest metoda Otsu [4, 6, 11].

W przypadku obrazów komórek z wyznakowanymi wspomnianą metodą immunocytochemiczną ogniskami histonu γ -H2AX istnieje również niewielki trzeci rozkład odpowiadający właśnie tym ogniskom. W wypadku segmentacji takich obrazów metodą Otsu uzyskuje się wartość progu binaryzacji przesuniętą nieco w stronę ciemniejszych pikseli obrazu, co skutkuje zwykle rozrostem obszarów wokół komórek o jaśniejsze piksele tła. Aby rozwiązać ten problem zastosowano fuzję wyników uzyskanych kilkoma metodami binaryzacji tj. metodami: Otsu, trójkąta [13] oraz średniej (wartość progu binaryzacji równa jest średniej jasności obrazu) — wynik binaryzacji uzyskano poprzez wybór pikseli, które przynajmniej przez dwie metody zaklasyfikowane są jako piksele reprezentujące obiekt. Dzięki temu rozwiązaniu udało się poprawić wynik binaryzacji.

Po zastosowaniu powyższych metod uzyskujemy jednak nieco poszarpane krawędzie obszarów oraz niewielkie punkty, które są artefaktami obrazu i mimo ich stosunkowo dużej jasności powinny się zaklasyfikować do tła. Aby skutecznie rozwiązać ten problem zastosowano proste operacje morfologiczne pozwalające na usunięcie niewielkich obszarów. Dodatkowo działania te pozwoliły również na „wygładzenie” kształtu komórki.

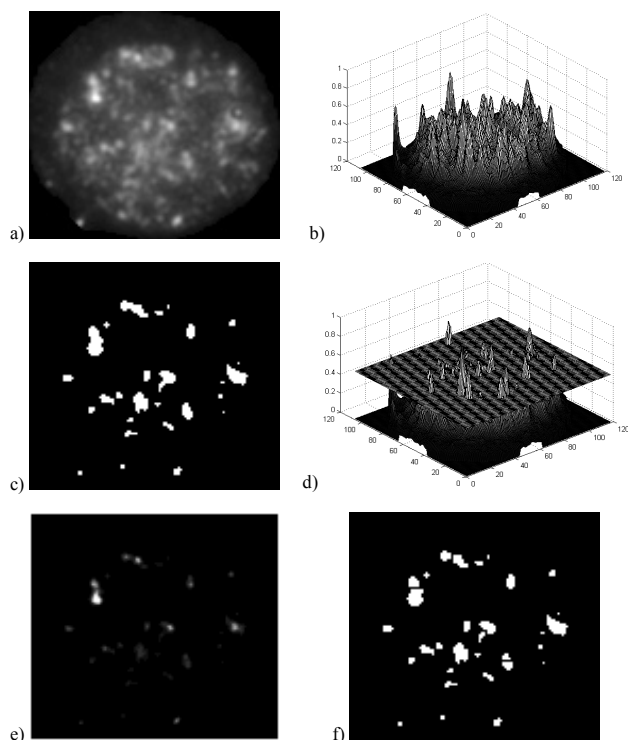
W idealnej sytuacji, po zastosowaniu segmentacji powstałby obraz binarny, w którym każdy obszar reprezentowałby jedną komórkę. Jednak często uzyskane obszary reprezentują złączone ze sobą komórki, bądź też inne artefakty pochodzące np. od zastosowanego źródła światła (rys. 1b). Nawet w wypadku idealnych warunków przeprowadzania doświadczenia i akwizycji obrazów, nie można uniknąć tego typu przypadków. Dlatego algorytm został wyposażony w kilka dodatkowych funkcji pozwalających na zwiększenie liczby znajdujących w obrazach obszarów reprezentujących pojedyncze komórki.

Realizacja tego zadania polegała na opracowaniu odpowiedniego klasyfikatora [3, 9]. Jako pierwszą cechę klasyfikującą obszary wybrano następujący współczynnik kształtu

$$\kappa = 3,25\pi \cdot A \cdot L^{-2}, \quad (1)$$

gdzie A to pole powierzchni obszaru, a L to jego obwód; jako dopuszczalny zakres przyjęto $\kappa \in \langle 0,95; 1,05 \rangle$. Wybór tej cechy wynika z tego, że jeżeli kształt obszaru jest zbliżony do koła to istnieje duże prawdopodobieństwo, że jest to pojedyncza komórka, a nie ich skupisko (rys. 1c). W przypadku obszarów o innym kształcie obszary te są najczęściej „zlepionymi” ze sobą komórkami (rys. 1d).

Aby nie odrzucać całego tego zbioru obszarów (a tym samym znacznie zmniejszyć liczbę branych pod uwagę komórek) opracowana metoda została uzupełniona o etap rozdzielania takich obszarów za pomocą zmodyfikowanej metody segmentacji wododziałowej [8] (oryginalna metoda została zaproponowana przez Beuchera i Lantuejou w 1979 [2]). Jeżeli stopień złączenia komórek nie jest zbyt duży takie rozwiązanie jest wystarczające. W prezentowanej metodzie obszar uzyskany po binaryzacji i reprezentujący połączone komórki poddawany jest erozji morfologicznej, a następnie wyznaczana jest transformacja odległości euklidesowych każdego piksela danego obszaru do jego krawędzi. Dzięki temu powstaje mapa poziomicowa, na podstawie której możliwe jest wyznaczenie działów wodnych rozdzielających poszczególne obszary. Kolejnym krokiem jest ponowne sprawdzenie współczynnika kształtu (1) tak otrzymanych obszarów - tym razem dopuszczalne odchylenie przyjęto jako $\pm 10\%$ wartości idealnej. Pozwala to na uwzględnienie w dalszej analizie obszarów, których kołowość została zniekształcona podczas segmentacji wododziałowej. Dodatkowo ostatecznie usunięto również obszary stykające się z krawędzią obrazu gdyż nie dają one pełnej informacji o komórkach. Obszary spełniające te wymagania dopisywane są do zbioru obszarów potencjalnie reprezentujących pojedyncze komórki (rys. 1e).



Rys. 2. Poglądowe przedstawienie działania algorytmu lokalizującego ogniska histonów w pojedynczych komórkach: a) obraz komórki i b) jego prezentacja w 3D (oś OZ reprezentuje jasność), c) wynik binaryzacji dla pewnej wartości progu i d) wykres 3D z zaznaczonym progiem, e) pseudogradientowy obraz będący złożeniem wyników binaryzacji z różnymi wartościami progu, f) wynik poszukiwania ognisk histonów

Fig. 2. Presentation of exemplary results obtained from the algorithm for histone foci extraction from a single cell: a) image of single cell and b) its presentation as a 3D chart (axis OZ represents brightness), c) results of image binarization for one threshold value and d) 3D chart with threshold presentation, e) pseudogradient image obtained by the aggregation of the binarization results with different threshold values, f) results of the foci finding

Współczynnik kołowości niestety nie pozwala na usunięcie artefaktów np. pochodzących od źródła światła czy zanieczyszczeń znajdujących się preparacie. Dlatego też w proponowanej metodzie wprowadzono dodatkowe warunki. Po pierwsze sprawdzane jest pole powierzchni obszarów, które zaklasyfikowano do komórek właściwych. Wielkość ta dla konkretnego rodzaju komórek i przy podobnych warunkach akwizycji jest zbliżona. Wartość odniesienia \bar{A} została ustalona jako mediana powierzchni obsza-

rów wybranych przez eksperta jako obszary reprezentujące pojedyncze komórki. Jeżeli powierzchnia A_O obszaru O nie spełnia warunku

$$0,5 \leq A_O \cdot \bar{A}^{-1} \leq 2 \quad (2)$$

to obszar ten jest przenoszony do grupy obszarów odrzuconych.

Dodatkowo sprawdzono homogenność fotometryczną obszarów. Ponieważ odbłaski pochodzące od podświetlenia preparatu w mikroskopie mają podobną jasność na całej swojej powierzchni, więc obszary O nie spełniające warunku

$$\max_{p \in O} (I_p) - \min_{p \in O} (I_p) > 60/255 \quad (3)$$

są przyjmowane jako obszary nie reprezentujące komórek; I_p to jasność piksela p należącego do obszaru O .

Zastosowane warunki (1) - (3) są na tyle restrykcyjne, że można przyjąć, iż wszystkie obszary spełniające te wymagania reprezentują komórki. Natomiast wprowadzenie metod rozdziału zgrupowań komórek znacząco zwiększa liczbę komórek analizowanych na kolejnym etapie. W przypadku wykorzystania tej metody w praktyce laboratoryjnej rozwiązanie takie pozwoli na zmniejszenie ilości pobieranego materiału i liczby koniecznych do przygotowania preparatów mikroskopowych co przekłada się na skrócenie czasu potrzebnego do przeprowadzenia badań oraz na zmniejszenie kosztu ich wykonania.

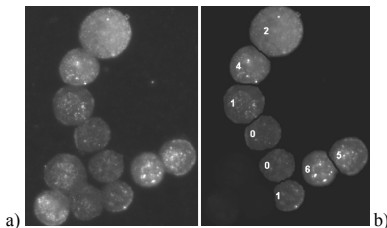
2.2. Etap zliczania ognisk histonowych

Duża lokalna zmienność jasności poszczególnych pikseli reprezentujących punkty komórki uniemożliwiła stosowanie binaryzacji z jednym globalnym progiem dla całej komórki. Rozwiązaniem tego problemu okazało się sporządzenie mapy poziomicowej i wykorzystanie segmentacji wododziałowej.

Tab. 1. Algorytm zliczania ognisk histonowych zapisany w pseudokodzie
Tab. 1. Algorithm of the histon foci counting written in pseudocode

ALGORYTM	Algorytm zliczania ognisk histonowych
DANE:	oryginalny obraz achromatyczny I o poziomach szarości z zakresu $\langle 0; 1 \rangle \in \mathbf{R}$, obraz binarny B
PARAMETRY:	początkowa wartość progu binaryzacji t_0 , krok zmiany progu Δt
1.	Ponumeruj od 1 do L obszary w B reprezentujące pojedyncze komórki, gdzie L to liczba takich obszarów.
2.	for $O = 1 : L$
3.	Określ współrzędne W pikseli należących do obszaru O w B , odnotuj powierzchnię PO tego obszaru, wykorzystując W z obrazu oryginalnego I pobierz piksele tworzące obraz komórki reprezentowanej przez O .
4.	for $t = t_0 : \Delta t : 1$
5.	Dokonaj binaryzacji obszaru komórki z progiem t ; w kolejnych iteracjach dodawaj wyniki tworząc pseudogradientowy obraz G (rys. 2).
6.	end
7.	Na otrzymany obraz G podziałaj zmodyfikowaną segmentacją wododziałową (opis w rozdziale 2.1.)
8.	Zlicz liczbę powstałych obszarów F oraz ich całkowitą powierzchnię PF
9.	if $PF > PO^* 15\%$
10.	Odnotuj, że liczba ognisk histonowych wskazuje na to, że komórka znajduje się na szklaku apoptotycznym i ich liczba może przekłamywać wynik, odrzuć komórkę w procesie zliczania ognisk w obrazie, dodaj do zbioru komórek apoptotycznych.
11.	end
12.	end

Mapa poziomicowa tworzona jest z poziomicy będących wynikami kolejnych binaryzacji pikseli należących do danej komórki uzyskiwanych dla coraz to większej wartości progu. Takie rozwiązanie ograniczyło ilość informacji o obszarze do poziomu niezbędnego do znalezienia ognisk γ -H2AX. Wartość kolejnych progów wyznaczana jest od wartości minimalnej ustalonej przez użytkownika i z określonym przez niego krokiem do maksymalnej wartości jasności. Każda poziomicca zawiera tylko piksele, które dla danej komórki mają poziom jasności wyższy niż wartość progu. Przez dodanie do siebie tak otrzymanych poziomicy tworzone jest mapa poziomicowa, która mogła zostać posegmentowana przy wykorzystaniu wspomnianej wcześniej metody wododziałowej. Zastosowanie takiego podejścia pozwala na prawidłową segmentację ognisk histonowych nawet wówczas gdy dla niższych wartości progu binaryzacji kilka obiektów zlewało się w jeden (rys. 2c i f).



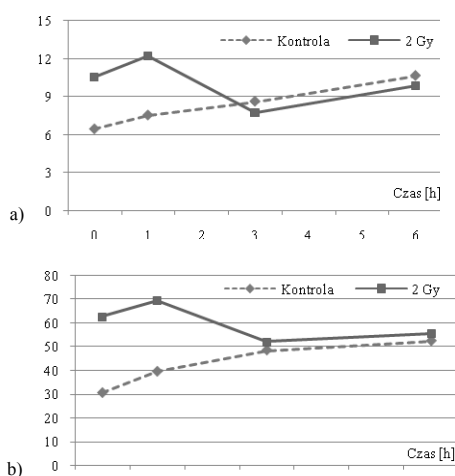
Rys. 3. Przykładowe wyniki poszukiwania ognisk γ -H2AX; a) oryginalny obraz, b) wynik pracy algorytmu: na obszarze każdej znalezionej pojedynczej komórki wpisana jest informacja o liczbie znalezionych ognisk (zaznaczone jasnymi punktami)

Fig. 3. Exemplary result of histone γ -H2AX foci finding; a) original image, b) result obtained from the algorithm: on each cell the number of its γ -H2AX foci is presented (foci are depicted as bright spots)

Po wyznaczeniu w każdej pojedynczej komórce pikseli należących do poszczególnych ognisk γ -H2AX, wystarczy je jedynie zaindeksować i w efekcie uzyskać informację o liczbie ognisk w każdej komórce. Wartość ta jest wynikiem testu γ -H2AX.

3. Wyniki i podsumowanie

Testując algorytm wykorzystano dane pochodzące z eksperymentu, w którym traktowano komórki raka okrężnicy (HTC116) promieniowaniem jonizującym o dawce 2 Gy. Serie obrazów wykonywane były w różnym czasie po napromienieniu.



Rys. 4. Wykresy ilustrujące zmianę liczby ognisk γ -H2AX w zależności od czasu po napromienieniu: a) wykres średniej liczby ognisk w komórkach, b) wykres zależności odsetka komórek mających powyżej 4 ognisk

Fig. 4. Chart illustration of number change of histone γ -H2AX foci as a function of time after irradiation: a) chart of the average foci number in cells, b) time graph of the percentage of cells having more than 4 foci

Na wykresach przedstawionych na rysunkach 4 i 5 można zauważyć charakterystyczną zależność zgodnie, z którą w komórkach poddanych promieniowaniu jonizującemu w ciągu pierwszej godziny poziom uszkodzeń mierzonych liczbą ognisk ufosforylowanego histonu H2AX rośnie, a następnie spada do wartości ustalonej pokrywając się z wykresem kontroli. Wzrost liczby ognisk może być spowodowany zarówno uszkodzającym działaniem napromienienia, zwłaszcza reakcjami powstałymi wolnych rodników, jak i początkiem procesów naprawczych, podczas których również dochodzi do dwuniciowych nacięć, które ostatecznie powodują fosforylację histonu H2AX. Należy zwrócić uwagę, że w komórkach kontrolnych również następuje dość znaczny wzrost liczby ognisk γ -H2AX, co można tłumaczyć pojawianiem się nacięć nici DNA w wyniku tworzenia się widełek replikacyjnych w intensywnie proliferujących komórkach.

Analizując wyniki otrzymywane po każdym etapie działania metody oraz porównując uzyskane wykresy (rys. 4) z podobnymi wykresami prezentowanymi w literaturze (np. w [5]) można stwierdzić, że przedstawiona metoda pozwala na prawidłową realizację zadania znajdowania ognisk γ -H2AX.

Autorzy pracy składają serdeczne podziękowania Pani prof. Marii Wideli za inspirację, cenne uwagi oraz udostępnienie wyników badań laboratoryjnych. Praca została częściowo sfinansowana ze środków na działalność statutową Instytutu Automatyki Politechniki Śląskiej (BK 214/RAu1/2011 temat 4). Część badań wykorzystanych w pracy została przeprowadzona w Centrum Biotechnologii, Bioinżynierii i Bioinformatyki ŚLĄSKA BIO-FARMA w Gliwicach (<http://www.biofarma.polsl.pl/>).

4. Literatura

- [1] Barber P. R., Locke R. J., Pierce G. P., Rothkamm K., Vojnovic B.: Gamma-H2AX foci counting: image processing and control software for high-content screening, Proc. SPIE 6441, 2007.
- [2] Beucher S., Lantuéjoul Ch.: Use of watersheds in contour detection, w International Workshop on Image Processing: Real-time Edge and Motion Detection/Estimation, Rennes, Francja, wrzesień 1979.
- [3] Bow S.T.: Pattern recognition and image preprocessing. CRC Press, 2002.
- [4] Gonzales R. C., Woods R. E.: Digital Image Processing, Prentice Hall, 2007.
- [5] Marti T. M., Hefner E., Feeney L., Natale V., Cleaver J. E.: H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks, PNAS 2006, vol. 103, no. 26, str. 9891–9899.
- [6] Otsu N.: A threshold selection method from gray-level histograms, IEEE Trans. Sys., Man., Cyber. 9, 1979, str. 62–66.
- [7] Podhorecka M.: γ -H2AX jako marker dwuniciowych pęknięć; Postępy Hig Med Dosw. 63, 2009, str. 92–98.
- [8] Soille P.: Morphological Image Analysis: Principles and Applications, Springer-Verlag New York, Inc., 2003.
- [9] Wojewódzka M., Szumiel I.: Ogniska histonu γ -H2AX – marker pęknięć podwójnoniciowych DNA, Post. Techn. Jąd. 49, 2006, str. 15–18.
- [10] Tadeusiewicz R., Flasiński M.: Rozpoznawanie obrazów, Seria: Problemy Współczesnej Nauki i Techniki. Informatyka., PWN, Warszawa 1991.
- [11] Tadeusiewicz R., Korohoda P.: Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów, Seria: Społeczeństwo Globalnej Informacji., Wydawnictwo Fundacji Postępu Telekomunikacji, Kraków, 1997.
- [12] Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A. A. F., Levine M., Losick R. M.: Molecular Biology of the Gene, Benjamin Cummings, 2007.
- [13] Zack G. W., Rogers W. E., Latt S. A.: Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency, Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 25, no. 7., 1977.

otrzymano / received: 16.01.2012

przyjęto do druku / accepted: 02.03.2012

artykuł recenzowany / revised paper