

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77>

ОПТИМИЗАЦИЯ ОКРАШИВАНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ И ГЕПАТОЛИЕНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ

БОГДАНОВ Л.А., КУТИХИН А.Г. *

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Оптимизировать протокол окрашивания гематоксилином и эозином для элементов системы кровообращения (миокард, аорта) и гепатолиенальной системы (печень, селезенка).

Материалы и методы. В качестве эталонных объектов исследования были выбраны сердце (желудочки), аорта (брюшной отдел), печень (правая доля) и селезенка (левая часть). После фиксации в 10% забуференном формалине производилась вырезка репрезентативных сегментов тканей с дальнейшим промыванием в проточной воде, обезвоживанием с использованием этанола возрастающей концентрации (70%, 80%, 95%) и изопропанола, пропитыванием и заключением в парафин и серийной резкой (5 мкм) замороженных парафиновых блоков на микротоме. При регрессивном окрашивании время инкубации в гематоксилине (Гарриса) составляло 5 или 10 минут, дифференцирующем растворе (1% HCl в 70% этаноле) – 2 или 10 секунд, 1% водно-спиртовом эозине – 1 или 2 минуты. При прогрессивном окрашивании время инкубации в гематоксилине (Карацци) и эозине было аналогичным, однако не требовалось применения дифференцирующего раствора.

Результаты. Окрашивание прогрессивным гематоксилином во всех исследованных тканях позволяло сохранить целостность ткани и ускорить протокол окрашивания по сравнению с регрессивным в силу отсутствия необходимости экспозиции в агрессивном кислотно-спиртовом дифференцирующем растворе. Наилучшим протоколом

в случае как регрессивного, так и прогрессивного окрашивания для миокарда, аорты и печени было признано воздействие гематоксилина в течение 10 минут, а эозина – в течение 2 минут, при этом время воздействия дифференцирующего раствора при регрессивном окрашивании (2 или 10 секунд) определялось желаемым оттенком. В случае с селезенкой наилучшим протоколом было окрашивание гематоксилином в течение 5 минут и эозином в течение 2 минут, а при регрессивном окрашивании – воздействие дифференцирующего раствора в течение 10 секунд.

Заключение. Применение прогрессивного гематоксилина при окраске тканей миокарда, аорты, печени и селезенки гематоксилином и эозином предпочтительнее и проще в сравнении с регрессивным гематоксилином.

Ключевые слова: гематоксин, эозин, миокард, печень, селезенка.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Для цитирования:

Богданов Л.А., Кутихин А.Г. Оптимизация окрашивания элементов системы кровообращения и гепатолиенальной системы гематоксилином и эозином. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019. Т.4, №4. С. 70-77. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77>

*Корреспонденцию адресовать:

Кутихин Антон Геннадьевич, Россия, 650002, г. Кемерово, б-п Сосновый, д. 6; E-mail: antonkutikhin@gmail.com
©Кутихин А.Г. и др.

ORIGINAL RESEARCH

OPTIMIZATION OF HEMATOXYLIN AND EOSIN STAINING OF HEART, BLOOD VESSELS, LIVER, AND SPLEEN

LEO A. BOGDANOV, ANTON G. KUTIKHIN*

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract

Aim. To optimize hematoxylin and eosin staining protocol for heart, blood vessels, liver, and spleen.

Methods. Heart (ventricles), abdominal aorta, liver (right lobe), and spleen (left part) of the Wistar rats were excised, fixed in 10% neutral phosphate buffered formalin for 24 h, washed in tap water for 2 h, dehydrated in ascending ethanol series (70%, 80%, and 95%) and isopropanol, embedded into paraffin and then sectioned (5 µm) using rotary microtome. For regressive staining, incubation time in Harris hematoxylin was 5 or 10 minutes, time of exposure to differentiation alcoholic-aqueous eosin was 1 or 2 minutes. For progressive staining, incubation time in Carazzi's hematoxylin and eosin was the same but the differentiation solution was not utilized.

Results. Progressive staining retained tissue integrity and accelerated staining protocol as compared to regressive staining due to absence of exposure to aggressive acid alcohol differentiation solution. The optimized protocol for heart, aorta and liver, similar for regressive and progressive staining, included incubation in hematoxylin for 10 minutes

and eosin for 2 minutes. Time of exposure to differentiation solution (2 or 10 seconds) was defined by the desirable shade. For spleen, however, the optimized protocol included staining in hematoxylin for 5 minutes and eosin for 2 minutes, with 10 seconds in differentiation solution for regressive staining.

Conclusion. Progressive hematoxylin is preferable over regressive hematoxylin for staining of heart, aorta, liver, and spleen.

Keywords: hematoxylin, eosin, heart, liver, spleen.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Funding

This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0546-2015-0011 "Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors".

◀ English

For citation:

Leo A. Bogdanov, Anton G. Kutikhin. Optimization of hematoxylin and eosin staining of heart, blood vessels, liver, and spleen. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019; 4 (4): 70-77. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77>

****Corresponding author:**

Dr. Anton G. Kutikhin, Sosnovy Boulevard 6, Kemerovo, 650002, Russian Federation. E-mail: antonkutikhin@gmail.com
© Kutikhin A.G. et al.

Введение

Наиболее распространенным видом окрашивания на протяжении всего времени развития гистологии является сочетанное окрашивание тканей основным красителем гематоксилином и кислым красителем эозином [1,2,3]. Кроме того, гематоксиллин также используется для контрастирования ядер при сочетании с другими красителями [1,4,5]. Гематоксиллин получают из сердцевины кампешового дерева (семейство

бобовые), произрастающего в Центральной и Южной Америке, Африке и Азии [1]. Сам по себе гематоксиллин бесцветен, однако при окислении на воздухе в сочетании с протравой (как правило, алюминиевыми квасцами) он переходит в гематеин, имеющий красновато-коричневый цвет [1].

Окрашивание гематоксилином можно условно разделить на прогрессивное (при котором ткань постепенно окрашивается до опреде-

ленного уровня) и регрессивное (при котором ткань преднамеренно перекрашивается с дальнейшим вымыванием излишнего окрашивания дифференцирующим раствором – как правило, 0,5% или 1% раствором соляной кислоты в 70% этаноле) [6-9]. При регрессивном окрашивании наиболее широко применяется гематоксилин Гарриса, в то время как для прогрессивного окрашивания, как правило, используются доступные на российском рынке гематоксилины Майера, Джилла и Карацци. Время окрашивания гематоксилином, как правило, составляет от 5 до 15 минут, хотя некоторые источники указывают на возможность более быстрого окрашивания тканей гематоксилином Карацци [2]. Гематоксилин Гарриса по классическому протоколу изготовления содержит оксид ртути, и поэтому ввиду токсичности его заменяют на иодат калия или натрия [8,10].

Эозин (2,4,5,7-тетрабромфлюоресцеин) представляет собой синтетический краситель, окрашивающий цитоплазму и внеклеточные структуры ткани [6-9]. В зависимости от растворителя выделяют спиртовой и водный растворы эозина, имеющие различный pH; достаточно часто применяется также их концентрированная смесь, доступная на российском рынке и в дальнейшем разбавляемая бидистиллированной водой или 20-25% этанолом в зависимости от желаемого pH.

Результатом окрашивания гематоксилином и эозином является окрашивание ядер в цвета от фиолетового до синего (оттенок зависит от вида гематоксилина и длительности окрашивания), цитоплазмы и внеклеточного матрикса – в цвета от розового до красного (оттенок зависит от pH эозина и длительности окрашивания) [1-3,6-9]. Интенсивность окраски также может изменяться в зависимости от преобладания базофильных или ацидофильных структур в ткани, что обуславливает различную склонность тканей к окрашиванию гематоксилином или эозином [1-3,6-9]. Стоит отметить, что стандартные протоколы окрашивания гематоксилином и эозином предоставляются их производителями, однако они предназначены скорее для рутинной гистологической и патологоанатомической работы, чем для научных публикаций, требующих окрашивания и микрофотографий максимально возможного качества. Данная проблема достаточно актуальна для более или менее всех видов тканей [11]; в последние годы предпринимаются попытки усовершенство-

вать протокол окрашивания гематоксилином и эозином для трехмерных тканей (без предварительной резки) [12], разработать алгоритмы для автоматизированного анализа воспалительных инфильтратов при окрашивании гематоксилином и эозином [13], а также оптимизировать окрашивание гематоксилином и эозином для цифрового анализа [14, 15]. Таким образом, проблема стандартизации получения высококачественных изображений при окрашивании гематоксилином и эозином представляется достаточно актуальной. Существует необходимость подбора наиболее подходящего типа гематоксилина для каждой ткани и времени окрашивания гематоксилином и эозином (а также, при необходимости, времени воздействия дифференцирующего раствора), что приобретает особую актуальность на фоне постоянно ужесточающихся требований к качеству получаемых изображений.

Цель исследования

Оптимизировать протокол окрашивания гематоксилином и эозином для тканей элементов системы кровообращения (миокард, аорта) и гепатолиенальной системы (печень, селезенка).

Материалы и методы

Для эксперимента использовали биоптаты 6 самцов крыс линии Wistar (возраст 6 месяцев, масса тела 400-450 г): сердце (желудочки), аорта (брюшной отдел), печень (правая доля) и селезенка (левая часть). Крысы содержались в одной и той же устланной опилками полипропиленовой клетке при комнатной температуре, нормальной влажности воздуха и 12-часовом световом дне и имели неограниченный доступ к корму и воде. Мониторинг состояния крыс проводился ежедневно. Вывод крыс осуществлялся при помощи их помещения в герметичную камеру с атмосферой, перенасыщенной углекислым газом. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (номер протокола № 06234-ЛБ).

Органы фиксировали в 10% забуференном формалине (БиоВитрум, Россия) в течение 24 часов, с одной сменой формалина через первые 4 часа. Далее производили вырезку необходимого сегмента образца, укладывали его в ги-

стологические кассеты и промывали под проточной водой в течение 2 часов. Образцы затем обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации (70%, 80%, 95%) и 100% изопропанолем (1 час на каждую смену), пропитывали парафином (три смены по 1 часу, Paraplast REGULAR (Bulk), температура плавления 56°C, Leica, Германия) и далее заключали в парафин (1 час при комнатной температуре). После этого образцы помещали в холодильник при температуре +4°C на ночь и далее замораживали при температуре -20°C в течение суток. Резку парафиновых блоков производили на ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США) равномерно по всей длине (аорта) или толщине (миокард, печень, селезенка) образца; толщина срезов составляла 5 мкм. Срезы были расправлены на водяной бане при температуре 52°C и перенесены на предметные стекла с поли-L-лизинным покрытием (Thermo Scientific, США). В пилотном эксперименте было приготовлено 3 партии тканей (одна партия на крысу) по 8 стекол для регрессивного окрашивания и 3 партии тканей по 4 стекла для прогрессивного окрашивания. В основном эксперименте было приготовлено 3 партии тканей (одна партия на крысу) по 12 стекол (8 для регрессивного окрашивания и 4 для прогрессивного окрашивания). На каждое стекло помещалось от 6 до 12 срезов в зависимости от размера органа (миокард – 6 срезов, печень и селезенка – по 10 срезов, аорта – 12 срезов). После сушки на нагревательной плитке при 50°C образцы переносились в термостат для хранения при температуре 30°C.

Для окрашивания использовали свежеприготовленные гематоксилины Гарриса и Карацци (БиоВитрум, Россия), окрашивание производилось по следующему протоколу:

- Депарафинизация в ксилоле, 3 раза по 5 минут
- Отмывка в 95% этаноле, 3 раза по 5 минут
- Быстрая промывка в бидистиллированной воде
- Окрашивание гематоксилином Гарриса или Карацци (5 или 10 минут)
- Быстрая промывка в бидистиллированной воде
- Подсинение в водопроводной воде в течение 5 минут
- Дифференцировка в 1% раствором HCl в 70% этаноле (в случае с гематоксилином Гарриса, 2 или 10 секунд)

- Подсинение в водопроводной воде, 30 минут
- Быстрая промывка в бидистиллированной воде
- Окрашивание 1% водно-спиртовым эозином (1 или 2 минуты)
- Быстрая промывка в бидистиллированной воде
- Обезвоживание в этаноле (70%, 95%, 95%) по 10 секунд
- Просветление в ксилоле, 3 минуты
- Заключение в монтирующую среду (Витрогель, БиоВитрум) под покровное стекло.

Готовые микропрепараты анализировались при помощи светового микроскопа (Axio Imager A1, Carl Zeiss, Германия) и объектива EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27 (Carl Zeiss, Германия) на увеличении x200. Результаты оценивались тремя гистологами независимо друг от друга и в разное время.

Результаты и обсуждение

При регрессивном окрашивании миокарда было замечено, что изменение времени воздействия как гематоксилина, так и эозина не влияло на качество окрашивания, однако увеличение времени воздействия дифференцирующего раствора до 10 секунд приводило к повышению контрастности ядер, осветляя цитоплазму и внеклеточный матрикс (**рисунок 1а**). При прогрессивном окрашивании независимо от протокола ядра имели темно-синий цвет и хорошо визуализировались, в то время как цитоплазма кардиомиоцитов и внеклеточный матрикс при окрашивании эозином в течение 1 минуты имели светло-розовый цвет, а в течение 2 минут – темно-розовый цвет (**рисунок 1б**). При использовании прогрессивного гематоксилина качество окрашивания было в целом выше, чем при применении регрессивного гематоксилина – ткань миокарда характеризовалась более высокой целостностью и более сбалансированной окраской.

В случае с окрашиванием аорты регрессивным гематоксилином воздействие гематоксилина в течение 10 минут, дифференцировка в течение 2 секунд и окрашивание эозином в течение 1 минуты позволили достичь высокой контрастности ядер (**рисунок 2а**). В случае воздействия дифференцирующего раствора в течение 10 секунд и окрашивании эозином в течение 1 минуты средняя и внешняя оболочки аорты были

Рисунок 1.

Сравнительное окрашивание миокарда крысы гематоксилином и эозином с различным временем инкубации в гематоксиле (5 или 10 минут), эозине (1 или 2 минуты) и дифференцирующем растворе (2 или 10 секунд). Увеличение x200.

Figure 1.

Comparative staining of rat myocardium with hematoxylin and eosin with different incubation times in hematoxylin (5 or 10 minutes), eosin (1 or 2 minutes) and differentiating solution (2 or 10 seconds). x200 magnification.

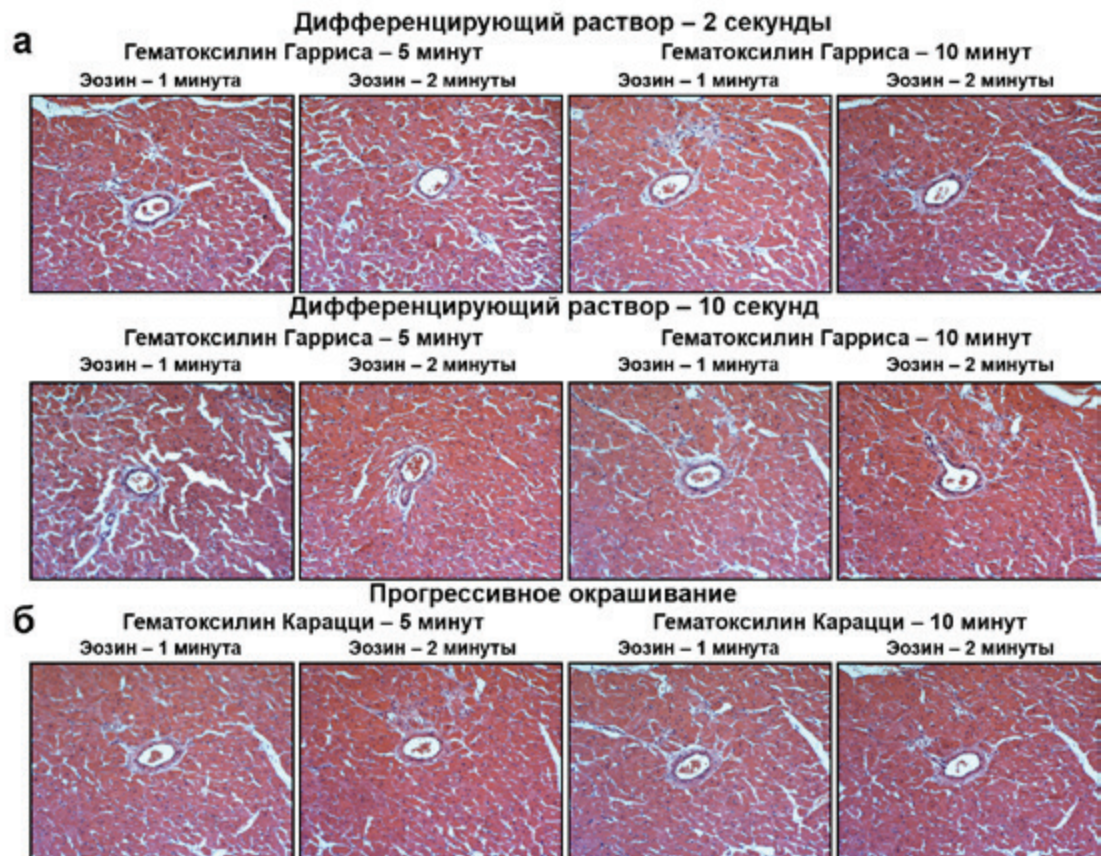
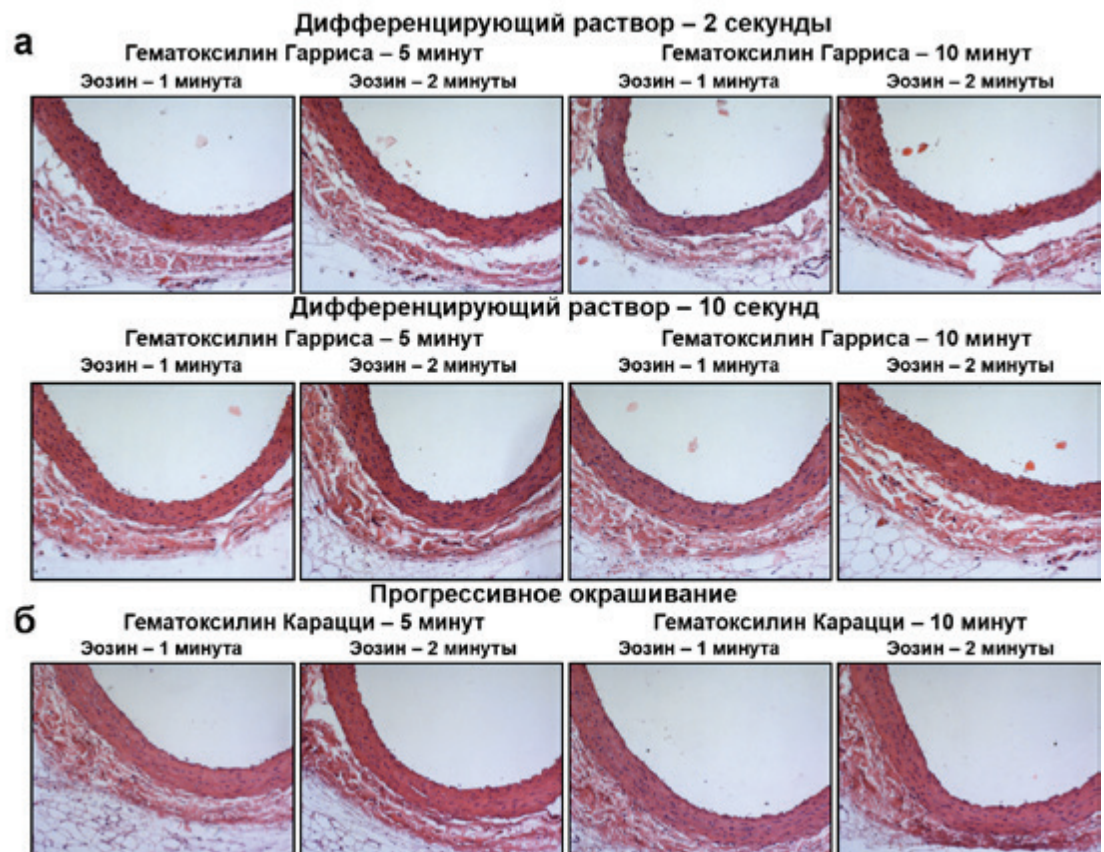


Рисунок 2.

Сравнительное окрашивание аорты крысы гематоксилином и эозином с различным временем инкубации в гематоксиле (5 или 10 минут), эозине (1 или 2 минуты) и дифференцирующем растворе (2 или 10 секунд). Увеличение x200.

Figure 2.

Comparative staining of the rat aorta with hematoxylin and eosin with different incubation times in hematoxylin (5 or 10 minutes), eosin (1 or 2 minutes) and differentiating solution (2 or 10 seconds). x200 magnification.



окрашены относительно слабо (**рисунок 2а**). Увеличение времени инкубации в эозине до 2 минут увеличивало контрастность цитоплазмы и внеклеточного матрикса, однако ядра в этом случае выглядели менее информативно, как и при окрашивании гематоксилином в течение 5 минут независимо от протокола (**рисунок 2а**). При окрашивании аорты прогрессивным гематоксилином заметных различий при повышении времени воздействия как гематоксилина, так и эозина выявлено не было (**рисунок 2б**). Средняя оболочка аорты была окрашена в розовый цвет независимо от времени инкубации в эозине; повышение времени воздействия гематоксилина оказывало лишь минимальное влияние на качество визуализации ядер (**рисунок 2б**).

Регрессивное окрашивание печени гематоксилином Гарриса показало, что сочетанное увеличение времени воздействия гематоксилина и эозина приводило к оптимальному контрастированию ядер (**рисунок 3а**). Интенсивность окраски как ядер, так и цитоплазмы гепатоцитов несколько снижалась при увеличении времени инкубации в дифференцирующем растворе (**рисунок 3а**). По аналогии с миокардом (**рисунок 1**) и аортой (**рисунок 2**) окрашивание печени прогрессивным гематоксилином со-

храняло целостность ткани и увеличивало яркость окрашивания в сравнении с использованием регрессивного гематоксилина (**рисунок 3б**). Независимо от протокола ядра имели темно-фиолетовый цвет (**рисунок 3б**). Цитоплазма гепатоцитов была окрашена в светло-розовый цвет при воздействии эозина в течение 1 минуты (**рисунок 3б**), при увеличении времени окрашивания эозином до 2 минут цитоплазма становилась темнее (**рисунок 3**).

При окрашивании селезенки регрессивным гематоксилином было обнаружено, что увеличение времени воздействия гематоксилина приводило к эффекту слияния ядер вследствие их большой концентрации в фолликулах, в то время как увеличение времени инкубации в эозине, напротив, улучшало контрастирование за счет повышения яркости цитоплазмы и внеклеточного матрикса (**рисунок 4**). Увеличение времени дифференцировки до 10 секунд в некоторой степени снижало интенсивность окрашивания как базофильных, так и эозинофильных структур (**рисунок 4а**). Как и в случаях с предыдущими тканями (**рисунки 1-3**), качество окрашивания селезенки при использовании прогрессивного гематоксилина (**рисунок 4б**) было выше, чем при применении регрессивно-

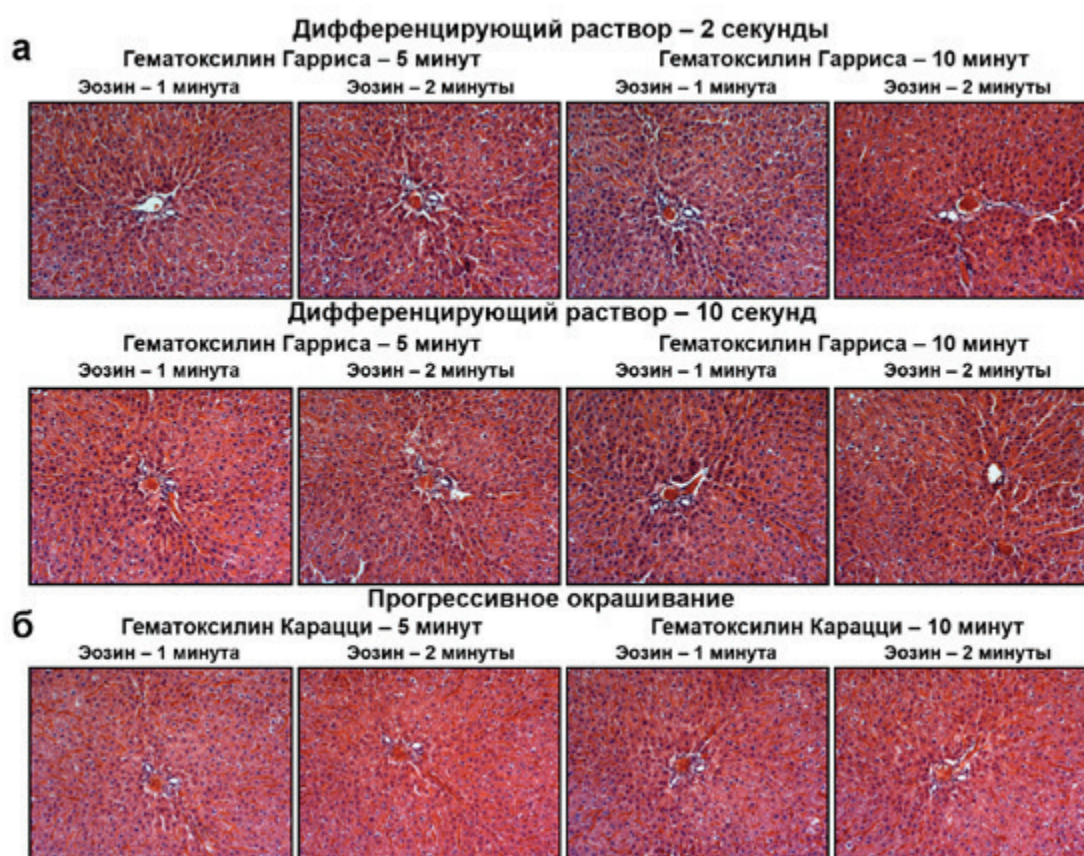


Рисунок 3.

Сравнительное окрашивание печени крысы гематоксилином и эозином с различным временем инкубации в гематоксилине (5 или 10 минут), эозине (1 или 2 минуты) и дифференцирующем растворе (2 или 10 секунд). Увеличение x200.

Figure 3.

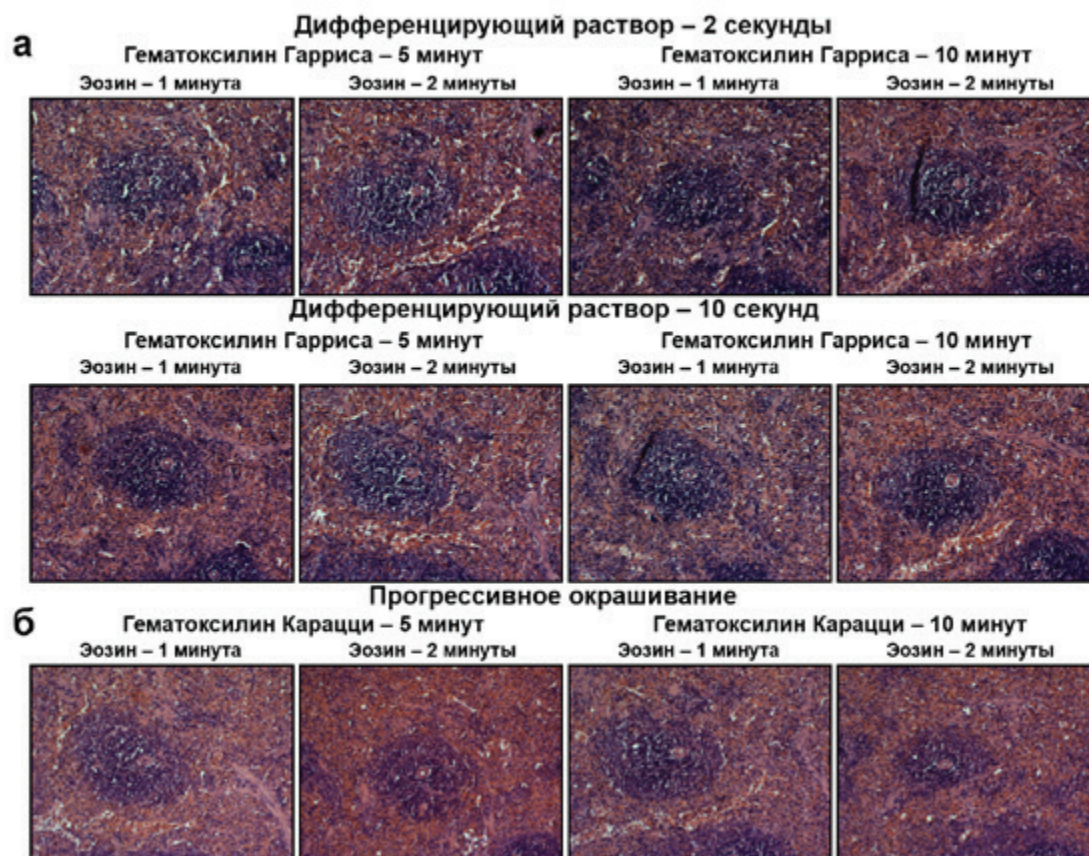
Comparative staining of rat liver with hematoxylin and eosin with different incubation times in hematoxylin (5 or 10 minutes), eosin (1 or 2 minutes) and differentiating solution (2 or 10 seconds). X200 magnification.

Рисунок 4.

Сравнительное окрашивание селезенки крысы гематоксилином и эозином с различным временем инкубации в гематоксилине (5 или 10 минут), эозине (1 или 2 минуты) и дифференцирующем растворе (2 или 10 секунд). Увеличение x200.

Figure 4.

Comparative staining of rat spleen with hematoxylin and eosin with different incubation times in hematoxylin (5 or 10 minutes), eosin (1 or 2 minutes) and differentiating solution (2 or 10 seconds). X200 magnification.



го (рисунок 4а), хотя увеличение времени воздействия гематоксилина также в ряде случаев вызывало появление артефактов в виде эффекта слияния ядер (рисунок 4б).

Таким образом, наилучшим протоколом в случае как регрессивного, так и прогрессивного окрашивания для миокарда, аорты и печени было признано воздействие гематоксилина в течение 10 минут, а эозина – в течение 2 минут, при этом время воздействия дифференцирующего раствора при регрессивном окрашивании (2 или 10 секунд) определялось желаемым оттенком – в случае с 10 секундами осветлялись как ядра, так и цитоплазма с внеклеточным матриксом. В случае с селезенкой вследствие ско-

пления ядер в фолликулах во избежание гистологических артефактов рекомендуется применять окрашивание гематоксилином в течение 5 минут и эозином в течение 2 минут, а при регрессивном окрашивании – дифференцирующий раствор в течение 10 секунд.

Заключение

При сравнительном анализе результатов регрессивного и прогрессивного окрашивания было установлено, что прогрессивная схема окрашивания позволяет сохранить целостность ткани вследствие отсутствия агрессивного воздействия спиртового раствора HCl, а также повысить степень воспроизводимости окрашивания.

Литература / References:

1. Avwioro G. Histochemical uses of haematoxylin. *JPCS*. 2011;1(5):24-34.
2. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*. 2008;2008:prot4986. DOI: 10.1101/pdb.prot4986
3. Titford M. The long history of hematoxylin. *Biotech Histochem*. 2005;80(2):73-78. DOI: 10.1080/10520290500138372
4. Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(1):12-32. DOI: 10.1177/1066896913517939
5. Senturk GE, Canillioglu YE. Which histochemical staining technique should I choose for biological specimens. In: Mendez-Vilas A, ed. *Microscopy: advances in scientific research and education*. Formatex Research Center. 2014:769-775.
6. Коржевский Д.Э. Применение гематоксилина в гистологической технике. *Морфология*. 2007;132(6):77-81. [Korzhhevskiy DE. Application of hematoxylin in histological technique. *Morfologiya*. 2007;132(6):77-81. (In Russ.).]
7. *Морфологическая диагностика: подготовка материала для*

- морфологического исследования и электронной микроскопии: руководство. Под ред. Д.Э. Коржевского. СПб.: СпецЛит; 2013. [*Morfologicheskaja diagnostika: podgotovka materiala dlja morfologicheskogo issledovaniya i jelektronnoj mikroskopii: rukovodstvo*. Korzhevskogo DJe, ed. Sankt-Peterburg : SpecLit; 2013. (In Russ.).]
8. Bancroft JD, Layton C. The hematoxylin and eosin. In: Suvarna K, Layton C, Bancroft J, ed. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier; 2019:126-139.
 9. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43. DOI: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3
 10. Коржевский Д.Э. Приготовление гематоксилина Гарриса без использования оксида ртути. *Морфология*. 2003;128(4):93-94. [Korzhevskii DE. Preparation of Harris hematoxylin without use of mercury oxide. *Morfologiya*. 2003;124(4):93-94. (In Russ.).]
 11. Прокопьев Ю.А., Фоменко Д.В., Кизиченко Н.В., Кудрявцева Ю.А., Борисов В.В., Попова А.П., Михайлова Н.Н. Методические подходы к изучению антракосиликоза, как фактора риска морфологических нарушений сосудов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2015;4(3):23-27. [Prokopyev YA, Fomenko DV, Kizichenko NV, Kudryavtseva YA, Borisov VV, Popova AP, Mikhailova NN. Methodical approaches to study of the anthracosilicosis as a factor of risk to morphological diseases of blood vessels. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases = Kompleksnye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2015;4(3):23-27. (In Russ.).]
 12. Li Y, Li N, Yu X, Huang K, Zheng T, Cheng X, Zeng S, Liu X. Hematoxylin and eosin staining of intact tissues via delipidation and ultrasound. *Sci Rep*. 2018;8(1):12259. DOI: 10.1038/s41598-018-30755-5
 13. Turkki R, Linder N, Kovanen P, Pellinen T, Lundin J. Identification of immune cell infiltration in hematoxylin-eosin stained breast cancer samples: texture-based classification of tissue morphologies. *Proc. SPIE*. 2016;9791:979110. DOI: 10.1117/12.2217040
 14. Martina JD, Simmons C, Jukic DM. High-definition hematoxylin and eosin staining in a transition to digital pathology. *J Pathol Inform*. 2011;2:45. DOI: 10.4103/2153-3539.86284
 15. Zarella MD, Yeoh C, Breen DE, Garcia FU. An alternative reference space for H&E color normalization. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174489. DOI: 10.1371/journal.pone.0174489

Сведения об авторах

Богданов Лев Александрович – младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (б-р Сосновый, д. 6, г. Кемерово, 650002, г. Кемерово, Россия.)

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, анализ и интерпретация данных.

ORCID: 0000-0003-4124-2316

Кутихин Антон Геннадьевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (б-р Сосновый, д. 6, г. Кемерово, 650002, г. Кемерово, Россия).

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, статистическая обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Authors

Mr. Leo A. Bogdanov, BSc, Junior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: concept, study design, wrote the manuscript, material collection and processing.

ORCID: 0000-0002-5558-3229

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: concept, study design, wrote the manuscript, data analysis.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Статья поступила: 02.09.2019г.

Принята в печать: 29.11.2019г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 02.09.2019

Accepted: 29.11.2019

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.