Histology Lecture (1)

- من أشهر التقنيات المستخدمة في علم Histology ← الميكروسكوب الضوئي (Light microscope) ← ظهرت عدة تقنيات بعد اختراعه (قبل 200 سنة تقريباً) ← أضافت مزيد من المعرفة في العلم لكنها لم تستطع استبدال Light microscope

- Histology ← micro anatomy (علم تشريح ميكروسكوبي)

- virtual microscope ← جهاز بيعمل scan للslide من كاميرات ليها high resolution ويتم مشاهدتها على الكمبيوتر
فائدتها: عدة أشخاص من أماكن مختلفة ممكن يفحصوا السلايد بنفس الوقت للوصول للنتيجة المتفق عليها

- electron microscope: قديم نوعاً ما، وعمل revolution في علم الHistology عندما تم اكتشافه

• Light microscope: ⇒ Resolution
يصل ← 0,1 - 0,2 μm (10^{-6}) = جزء من الألف من الـ mm

* قوة التكبير 1000x - 2000x ← لأنه يعتمد على موجات الضوء والتي لها طول معين عندما يمر بين جسمين المسافة بينهم أقل من حجم الضوء وبالتالي نقدر

* Since the Light microscope uses visible light which has a set range of wavelengths. The microscope can't produce the image of an object that's smaller than the length of the light wave.

← غالبية أنواع Light microscopes لا تصل لـ 2000x
← نشوف الجسم في Resolution لا تتخطى هذه الأبعاد

• electron microscope: يعتمد على تصميمها على الكترونات والتي لها negative charge فبالتالي نتحكم فيها من خلال electromagnetic lenses (ليست Lense زجاجية)
← عبارة عن ملفات تتحكم في حركة، تجميع وتركيز الالكترونات وهتمر من خلال النسيج

Resolution للـ electron microscope ← n.m ← جزء من الألف جزء من μm
10^{-9}
يصل ← 0,1 / 0,2 n.m

نستطيع تكبير الجسم من نصف لمليون مرة

أ/ أحمد الكو

- أحد أنواع electron microscope ← ① transmission electron (TEM) ~~Scanning~~ microscope
يكون في مقطع وتنزل الصورة على شكل ↳
2dimensional structure

SEM scanning electron microscope ← object يعمل مسح للسطح لل

SEM	TEM
creates an image by detecting reflected ē (scans the surface of specimen) provide a 3D image	ē are transmitted through a specimen to form an image provide a 2D image

* Light microscope بسيط
تعتمد فكرته على وجود
tube و Lenses
Lense مواجهة للobject
objective ← lense
- العدسة المواجهة للعين، ocular lense (eyepiece)
objective lense و eyepiece بتكبير
Resolution و تعتمد بشكل أساسي على جودة

- Histochemistry : يعني عنا نسيج وتفاعل (يعني نستخدم النسيج في البحث عن مركب معين) e.g : لما بدنا نشخص مريض
لازم نعرف إذا enzyme / protein معين موجود أو لا ← peroxidase
enzyme له substrate، اللي هي مادة يتم التفاعل معها ← موجود بعض خلايا
ويتم تفكيكها أو تكوين مركب آخر (فرضًا substrate تصبح مادة ملونة
عند التفاعل) و نفحصها تحت الميكروسكوب ونرى إذا موجود enzyme أو لا

- immunohistochemistry : ← antigen + antibody هاد التفاعل نستخدمه في البحث عن substances معينة e.g : يتم حقن بروتين بحيوان وبعد فترة أخذ الدم
واستخلاص antibody حيث أنه reaction بين antibody + antigen
(حيث antibody يرتبط مع antigen معين فقط) very specific ↳
نفترض أننا نريد أن نبحث عن antigen معين بالنسيج، مسبقًا نحضر له antibody
وربطنا antibody بمادة ملونة أو radioactive substance fluorscent
وو ضعنا المحلول اللي فيه antibody على النسيج فلو antigen موجود
هيرتبطوا ففي حالة وجود signal معينة ← ∴ antigen موجود
(أكثر تقنيات popular)

- hybridization : Nucleic acids - DNA وتتضاد تتكون من ← Nucleotides (لا نسميها نسبة nitrogen base فيها)
والجين يتكون من تسلسل معين من نيوكليوتيدات وله أيضًا جزء
مكمل complementary ← بدنا نعرف إذا الجين موجود أو لا عشان تشخيص المرض
إلخ...

فنحن بنكون عارفين تسلسل gene فلو أخذنا جزء مكمل وربطناه بإشارة لون أو فلورسنت أو radioactive substance وبصير اسمه probe (مسبار كاشف) لأنه بيبحث عن قطعة ب DNA

نسيج ← محلول فيه probe ← لو حين موجود فبيرتبط ← washing ← microscope ← signal لو موجود

∴ موجود جين وإذا لا probe هيروح أثناء washing ← بالتالي لن يوجد signal

ارتباط القواعد (اللي بيعطي signal) اسمه hybridization

- لو عنا قطعة من النسيج وتم تطبيق نفس الخطوات عليه بكون اسمه

in-situ hybridization

~~(used for identifying specific mRNA species within individual cells in tissue sections)~~ according to wikipedia

- لو كان Label ← fluorscent material كإشارة حنضيف حرف F (بعض المواد الطبيعية عندما تتعرض لل ultraviolet light تصدر لون معين ← fluorsein)

← FISH technique very popular

- autoradiography: يبحث في الوظائف (physiology) أي عملية حيوية (بكر تستخدمه الخلية مثلاً) لو نعرف material معينة شو خط سيرها داخل الخلية ممكن نحط بالوسط الموجودة فيه الخلايا جزيء السكر وعليه إشارة بحيث نعمل tracking للجزيء، ومن خلال هذه التقنية نحصل له صاره

- tissue culture: بدل ما نعمل دراسة على one cell نعملها تكاثر بالمختبر من خلال وضعها بوسط معين وبالتالي نزيد sensitivity (قدرة على التقاط signal)

← لو اللي نبحث عنه موجود بكمية قليلة والـ technique المستخدم sensitivity منخفضة فلن نرى شيء تحت Limit معين (نعتبره negative غير موجود) لكن techniques بتزود sensitivity هتخلينا نعرف إذا المادة موجودة أو لا (على الرغم من وجودها بكميات قليلة)

- centrifuge (الطرد المركزي): نعمل ترسيب للنسيج، الخلايا cell nucleus + organelles

كل جزء بالخلية كثافته تختلف عن الآخر وبالتالي بجهاز centrifuge هيكون داخل tube مترسبين عطبقات مختلفة } ← فنأخذ طبقة معينة من المحلول حيث تحتوي على جزء معين بشكل مكثف ويتم دراسته الخ ....

- مع كل التطور فش microscope حل محل Light microscope
لكن كل نوع له فائدة ووظائفه بمجال معين

- لما نأخذ مقطع من نسيج ونحطه ع slide (شريحة زجاجية) ←
المقطع لما نطلع عليه هيكون 2D structure (لحتى هو من 3D object)
- التقنيات المرتبطة بال Light microscope ← مثلاً نحضر النسيج حتى نحطه عالميكروسكوب في processing معين نعامل النسيج بمحاليل معينة عشان نأخذ مقطع من النسيج سمكه تقريباً 2 or 4 µm

← اختصار العمليات التي يتم استخدامها عشان نحصل ع المقطع من النسيج

FFPE
Formaline-fixed paraffin embeded
↓ عبارة عن محلول تركيز 10% للفورمالدهيد — ↓ الشمع
بنسميه نسيج FFPE tissue
النسيج تعرض لل fixation بواسطة المحلول ومن ثم ينغمر بالشمع ويتحول لقالب شمع

- H & E: Hematoxylin and Eosin
بعدما نحصل ع المقطع يكون colorless and transparent ← بالتالي نحتاج dye (وهذه هي الصبغة المعتادة H & E)
(Basic) Hemotaxylin → Blue / e.g: nuclei + أجزاء تركيبها مشابه للنواة
(acidic) Eosin → pink / e.g: cytoplasm
← شو الأجزاء اللي بنصبغها باستخدام الصبغة

① - Fixation: فائدة ① Permanent preservation
- autolysis → تحلل ذاتي للخلايا
الخلايا تحتوي ع lysosomes فيها كل أنواع الإنزيمات للتحلل وهضم
- الأجزاء المختلفة

(لو تركنا النسيج دون Fixation)

تتعفن من الميكروبات
preservation يتم عن طريق cross links أو روابط بين various molecules
حيث تعمل هذه الخطوة fixation ع إنشاء روابط قوية بين الجزيئات المختلفة وبالتالي يبقى كل شيء ع حاله
- لما ينفصل النسيج عن جسم الإنسان لازم عدل نحطه ب formalin حتى نحافظ عليه

② terminate metabolism : الخلية مليئة بالتفاعلات الحيوية والفورمالين عن طريق الروابط اللي بيعملها بين الأجزاء , البروتينات والإنزيمات حيوقف العمليات الحيوية

③ prevent autolysis : يوقف عمل lysosome وعمل الإنزيمات

④ hardening of the tissue + disinfiction (فلازم تكون في تالب صلبة من البارافين عشان نقدر ناخذ المقطع بالسمك الذي نريده)

← فمضادة للميكروبات حيث أن الفورمالين مادة مطهرة أو معقمة

- كله يتم من خلال denaturation of ~~enzymes~~ proteins and and cross linking ← (تحدث بين aminogroups)

- بروتين يتكون من amino acids (تسلسل للأمينو أسيد) حيث أنه بعد أن يتم تصنيعه في رايبوسوم ينتقل لل Golgi apparatus ويأخذ شكله النهائي له علاقة ب folding of proteins أو convelution , ويأخذ شكله النهائي في الفضاء

convelution مهم لأنه ممكن أن يبرز أو يخفي أجزاء من السلسلة وبدورة يتحكم في التفاعلات والخصائص المختلفة

- التقنيات التي تطورت فيما بعد تعتمد على FFPE tissue حيث أنه نفس المقاطع تستخدم للتقنيات الأحدث فمهم جداً أنه ما نخرب قدرة الجزيء على التفاعل

DOES NOT AITER 3D STRUCTURE AND RETAIN THE ABILITY TO REACT

- نفاذ formalin داخل النسيج بطيء نسبياً (بمتوسط 24h حتى يكتمل دخول الفورمالين لكل جزء من أجزاء النسيج)

cell membrane ← Lipid و structure تاعه ف الـ fixation ما يكون بالمستوى المطلوب

← مش منفصل لأنه عنا نسيج صلب (بعدما تم وضعه بالفورمالين) بقدر أقطع منه السمك اللي بدي إياه عشان هيك بنمرر النسيج بمجموعة من المحاليل فقط و بنحط فيه قطعة النسيج وبنعطيه كود بنكتب بالرصاص (عشان المحاليل تمسح أنواع تانية من وسائل الكتابة)

درجة الصلابة اللي بتعطيها للنسيج غير كافية لأخذ المقطع ← لازم يكون أكثر صلابة + مرونة بنفس الوقت

لا يتأثر بالمحاليل المستخدمة

cassette : فيه فتحات بنحط فيه النسيج ثم يتم تمريره بالمحاليل المختلفة (عشان نسيج يتعرض بشكل كافي للمحلول)

← النسيج غني بالماء، الشمع لا يمتزج مع الماء

∴ أول خطوة : dehydration (يتم عن طريق تعريض النسيج للكحول بتركيزات متصاعدة - ascending - 70% ← 80% ← 90% ← 100%

(بشكل متدرج عشان لو حطينا 100% من أول مرة فيحصل shrinkage وخلل بالنسيج)

- التدرج في المحاليل سوف ينزع الماء من النسيج حيث أنه لما نصل 100% يكون استبدل كل الماء في النسيج بالكحول

(الكحول أيضاً بيتفاعل مع الشمع) ففي محلول آخر اسمه

* ~~xylene~~ (clearing agent)

نوع من الكحول ← OH جزيء يحتوي على مجموعات

- xylene : وسيط بين الكحول والشمع (فهيستبدل الكحول في النسيج)

وهيصبح النسيج فيه كحول و xylene، وبعدها ناخذ النسيج ونضع عليه شمع ويتخلل الشمع النسيج ويصبح نسيج يصبح من المشبع بـ xylene

جواته وبراته شمع فيكون محفوظ في قالب من الشمع

① dehydration (alchol) ② clearing (xylene) ③ embeding (wax)

← بعد ها نستطيع الحصول على المقطع {المقطع فيكون مدفون بالشمع وسمكه من (2-4 Mm) ← مدى نتعامل معها

- يكون في water bath حرارته قريبة حد ذوبان الشمع وهنحط فيه المقطع الذي تم قطعه باستخدام الـ microtome ← ونضع هذا المقطع في waterbath

The ribbon(المقطع) is floated on warm water bath to remove any compressions and wrinkles in the tissue caused by the cutting action in the desired section and then they're picked up on a slide

وبعدها هنشيل المقطع من warm water bath باستخدام slide

* microtome له clamps (head) بيمسكوا بـ cassette وبعدها head بيكون بينزل وبيطلع أمام شفرة حادة وبدأنا نأخذ المقاطع

- المقطع الآن موجود على slide وهو colorless, transparent فنستخدم صبغات H & E (لكنها تحتاج لوسط مائي) فهنرجع بالخطوات العكس ← هنحط المقطع في xylene (فنزيل الشمع) ← الكحول وتركيزاتها المتدرجة بطريقة descending كما نحط المقطع بأنبوب مادة تركيز 100%، وبعدها ممكن نعمل أي تفاعل من علي للمنخفض على مقطع النسيج هذا

⊕ charge غالباً ← substance

hemotoxylin كصبغة مواصفاتها أقرب للـ basic ∴ هذه الصبغة ترتبط مع جزيئات ⊖ units, زي مثلاً : DNA (بيحتوي على مجموعات فوسفات لها شحنة ⊖)

- eosin : شحنة ⊖ (acidic) ∴ هترتبط بـ cationic structures زي بروتين (له طرفين carboxyl ⊖ وهيرتبط مع صبغة basic بينما amino هيرتبط مع (negative

← الأجزاء أو العناصر التي ترتبط مع basic dye اسمها basophilic 56:00

- واللي بترتبط مع acidic dye اسمها acidophilic / acidophils

Nucleolus - DNA

Basophilic : التي ترتبط مع basic dye ← chromatin, ribosome

تحتوي على glycose aminoglycan ← cartilage , عشان تحتوي RNA (يعني فوسفات ⊖)

جزيئات كربوهيدرات ضخمة نسبياً netcharge ⊖

acidophilic : cytoplasmic structures (cytoplasm داخل organelles)

extracellular matrix (باستثناء cartilages تكون معظمها acidophilic)

تتلون بالأحمر ورجاته

الأنوية تكون باللون الأزرق

- المقطع قد نكون فقدنا بعض محتوياته أثناء processing مثلاً fat droplet هيدوب فمش هنشوف fat تحت الميكروسكوب إنما هنشوف الفراغ اللي تركه في الكحول و xylene

والنيتروجين بيذوب أثناء processing

عشان هيك هادي المقاطع لو بنشتغل عليها دراسة (مثلاً نشوف تفاعلات مع fat) بتنفعش ← الحل: نستخدم تقنيات اسمها frozen section

حيث نستخدم جهاز اسمه frozen microtome, cryostat 1:00-1:03

← أحياناً قد يكون هناك granularity لصورة وذلك يرجع للـ resolution

حيث أن Light microscope بيعطي Resolution منيح للخلايا لكن ما هو موجود داخل cytoplasm مثلاً تتخطى حدود Resolution (حيث المسافة اللي بين الجزيئات أقل من 0,1 μm, 0,2) (للتفاصيل جوا سيتوبلازم نستخدم e microscope)

- شكل الخلية مرتبط بوظيفتها مثلاً : الخلية العضلية ← عشان elongted spindle بيسر لها contraction

* الخلايا اللي بتعمل phagocytosis بتكون واسعة وضخمة عشان تقدر تدخل material لداخلها

* Pas stain ، تتميز بارتباطها بالكربوهيدرات ، مهم لتحديد نوع الخلية ومن دين مصدرها وعشان نعرف مثلاً في glycogen أو لا (أحمر)

* enzyme diastazse : قبل ما نصبغ النسيج بـ pas عشان نعرف في glycogen أو لا (لو قبلها مررنا النسيج كمحلول فيه diastase (إنزيم يهضم الكربوهيدرات) وبعدها حطينا pas هتكون نتيجة negative) pas لا تعطيها

:. لو Pas لحالها ← هتكون نتيجة Postive ومشوف اللون
لكن لو استخدمنا تقنية Pas D (pas diastase) هتكون negative مش هتشوف اللون
← لو كان عندنا بروتين مثلاً فيه وحدة أو ٣ من glycogen هيتصبغ بـ Pas
و Pas D (عشان diastase تهضم فقط ↓ كربوهيدرات
(pure carbohydrates
← من خلال هذه الصبغتين Pas stain و PasD بنقدر نعرف هل الموجود هو glycogen أو other substance containing some degree of carbohydrates

- silver impregnation : محلول يحتوي على الفضة silver nitrate وبتميز الفضة بقدرتها على الترسيب على أجزاء معينة من الخلايا، حيث من خلالها بنعرف إذا كان الجزء هو أو لا [طريقة للاستدلال على المركبات المختلفة من خلالها (حيث يتم إفرازها)]

- histochemistry : تقنيات نستغل وجود إنزيمات معينة أو substance معين داخل النسيج فنضع substrate وبيصير تفاعل ويظهر لون معين وبستدل على وجود أو عدم وجود material (أمثلة peroxidase, ~~alkaline phos phatase~~, ~~ATPase~~)

- immunohisto chemistry : نحقن الأنسجة مسبقاً بالـ antigen في الحيوان وبعدين نستخلص plasma أو serum، ونحصل على antibody ولو طبقنا هذا الـ antibody على نسيج معين وتركناه فترة كافية للتفاعل
antigen ← موجود هيتم تفاعل ويرتبط antigen + antibody بشكل specific وقوي
/ أو غير موجود
وبعدين washing
① direct   ② indirect
- لو عندنا antigen، حقناه، واستخلصنا antibody وحطيناه على النسيج، وارتبط antibody اللي عليه إشارة
⇐ Direct immunohistochemistry
مسبقاً هيظل مرتبط ويوجد إشارة على antibody (مفيد مثلاً لمعرفة نوع cancer)

downsides : sensitivity منخفضة لأنه لكل antigen في signal واحد
وبالتالي إذا الـ antigen موجود بمستوى أقل من معين Level ← هتكون النتيجة negative and it won't be detected
وممكن يكون antigen بنفس الوقت
- antibody عبارة عن بروتين فلو حقنا حيوان فيه هيكون هيكون antibody للـ antigen في هذه الحالة بكون اسمه secondary antibody و antibody المستخلص من الحيوان بعد الحقن اسمه tertiary antibody.

tertiary antibody يتميز بقدرته على الارتباط بأجزاء مختلفة من antibody
فهيكون هنا أكثر من جزيء مرتبط بال secondary antibody
وكل واحد عليها إشارة ∴ antigen واحد يعطي signal أقوى
وبالتالي نستطيع عمل detection لكميات الضئيلة من antigen
⇐ indirect immunohistochemistry

- Label — fluorscent material (نتاج مكروسكوب خاص) — أكثر وبالتالي popularity
/ radioactive substance (نحتاج protection من المواد المشعة)
ومستخدمة في histochem ندمجها ب indirect immunohistochem
مادة ملونة اسمها chromogen
نربط tertiary antibody ب enzymes اسمه peroxidase
وهاد إنزيم نضيف عليه مادة ملونة ~~...~~ chromogen اسمها DAB
DAB إذا حصل التفاعل, ارتبط secondary antibody و tertiary
∴ فيكون موجود peroxidase و ال peroxidase هيعمل تفاعل مع substrate
system: كله موجود secondary tertiary antigen
وهيعطي مادة ~~...~~ بنية اللون DAB هيترسب عالنسيج في المكان
الموجود فيه antigen (يعني بنقدر نحدد مكان ال antigen)

* هذه الطريقة لها فائدتان — موجود antigen أو لا
/ Localization