VEIN BATCH 2027

Sub: Histology المادة:

Lecture: 1 المحاضرة:

By: Mohammad alomari إعداد:

Edited: تعديل:

Histology - Introduction

Dr. Mustafa Saad

(2022)

تفريغ: محمد العمري

It’s one of the most important aspects of histology.. because tissues are too small

وشكل هذا النسيج تحت المجهر مرتبط بخصائصه, حيث يمكنني توقع شكله اذا عرفت خصائصه, ويمكنني توقع خصائصه اذا رأيت شكله

- ***Histology*** is the study of the various tissues of the body: how these tissues appear, how they interact with each other and how they are arranged to constitute an organ.

- Features of tissues cannot be seen by the un-aided eye. Therefore, their study is done by using a magnifying tool – the *Microscope*.

Components of Tissues

Cells

Extracellular Matrix

Substances that could be found outside the cell

- Fibers
- Organic and Inorganic molecules
- Water

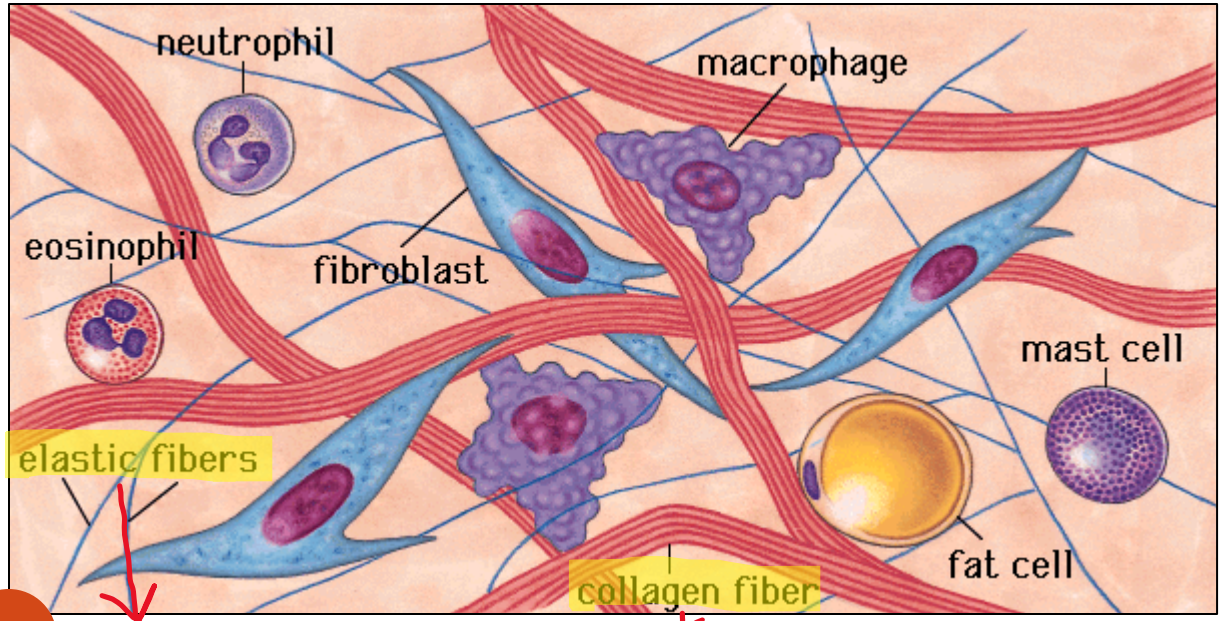


Fig.1: Image showing various components of tissues.

Thin blue lines

thick red lines

* Before putting the tissue under the microscope I must prepare it.

Preparation of tissues for study

1. ***Fixation***: To prevent tissues from being degraded by tissue or bacterial enzymes, a suitable ***fixative*** must be added. These prevent the protein enzymes from functioning. The most famous fixative used is ***Formalin*** (an aqueous solution of formaldehyde) which is used to preserve cadavers in anatomy labs. (رائحته قوية جدا ومعروفة) ← جثث

زي ما ترك الأكل برا الثلاجة يسبب العفن.. ترك الأنسجة دون حفظ بدمرها

After some time

بحط النسيج بمادة صلبة لتحفظه, لأن الخطوة القادمة رح تكون تقطيع النسيج, ولو اجيت اشتغل عليه زي ما هو رح يتمزق

2. ***Embedding***: To facilitate the cutting process, the soft tissues must be first placed into a suitable hard medium (usually ***paraffin wax***). → Used at low temperature

* المبدأ الرئيسي في دراسة الأنسجة بالمجهر هو عبور الضوء أو الأشعة عبر النسيج

3. ***Sectioning***: The thick tissues do not allow light to pass through them. Therefore they must be cut into thin slices. This is usually done with a device called the ***microtome***.

قديما كانت السكين هي وسيلة التقطيع.. بس حاليا يُستخدم جهاز المايكروتوم

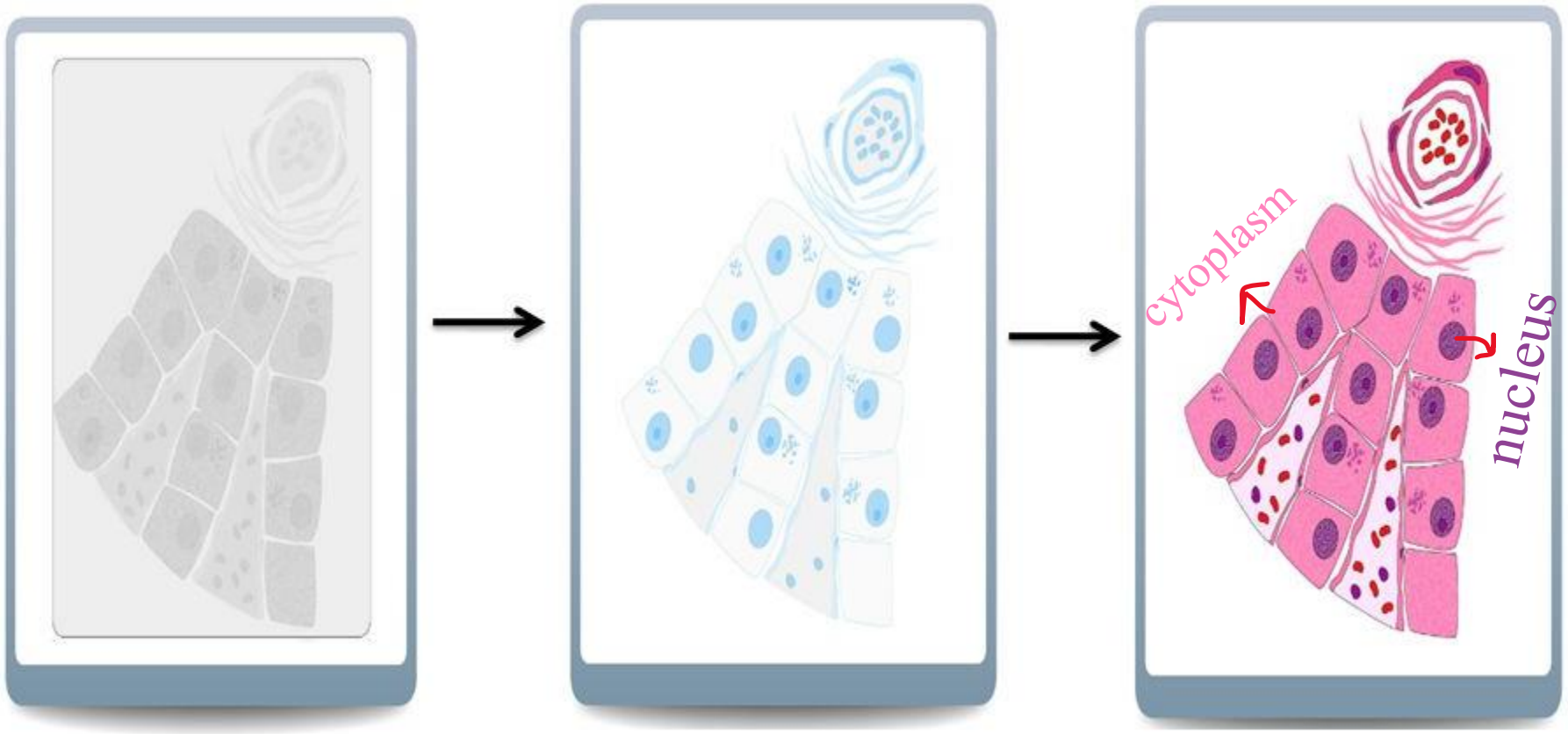
4. ***Staining***: Most tissues are colorless. To make them easily visible, they must be stained.

دايما بستخدم قد ما أقدر من الصبغات للتفريق بين الأنسجة المختلفة, بس صعب أوصل لمرحلة إني أصبغ كل أجزاء الأنسجة المختلفة بألوان مختلفة. عادة يُستخدم صبغتين أو ثلاث صبغات

Unstained

Stain 1

Stain 1 + Stain 2



The Main Principle of staining:

Acid + Base → Salt + Water

- Components of cells with a ***net negative charge*** react with ***basic dyes*** (which are positively charged and usually blue). These components are, thus, called ***Basophilic***. Examples: ***DNA*** and ***RNA***, ***Glycosaminoglycans***, and others.

Not always

In extracellular matrix

Seen in nucleus

Seen in rough endoplasmic reticulum

وهاض سبب ظهورهم ب لون أزرق تقريبا في مجسمات الخلايا

- Components of cells with a ***net positive charge*** react with ***acidic dyes*** (which are negatively charged and usually red). These components are, therefore, called ***Acidophilic***. Examples: ***proteins (as in collagen fibers and mitochondria)*** and others.

In extracellular matrix

ممكن تكون موجبة أو سالبة

تحتوي على إنزيمات

*باختصار.. اذا كانت المادة المُكَوِّنة للخلية أو النسيج سالبة الشحنة بتتفاعل مع صبغات قاعدية.
وإذا كانت موجبة الشحنة بتتفاعل مع صبغات حمضية.

Microscopes and Microscopy

- Several types of microscopes are used in histology.

- They can be generally divided into 2 types:
  - ***Light microscopes***: which use the ordinary beam of light

  - ***Electron microscopes***: which use a narrow beam of electrons

The Light Microscope

1) Bright-Field Microscope

* It's the most common type of microscopes, used in schools, collages , research centers and many places.
It's the Simplest , and just uses an ordinary beam of visible light

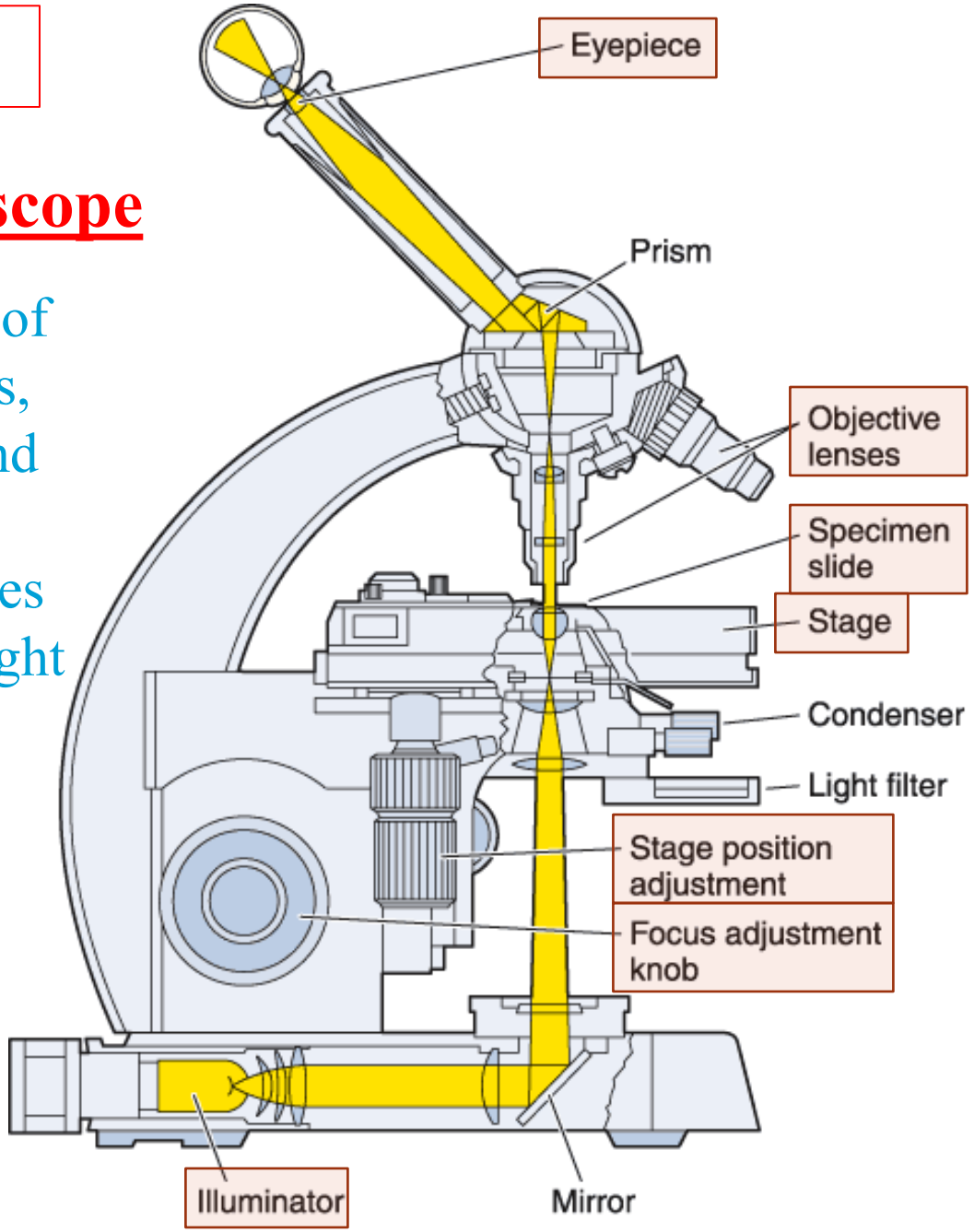
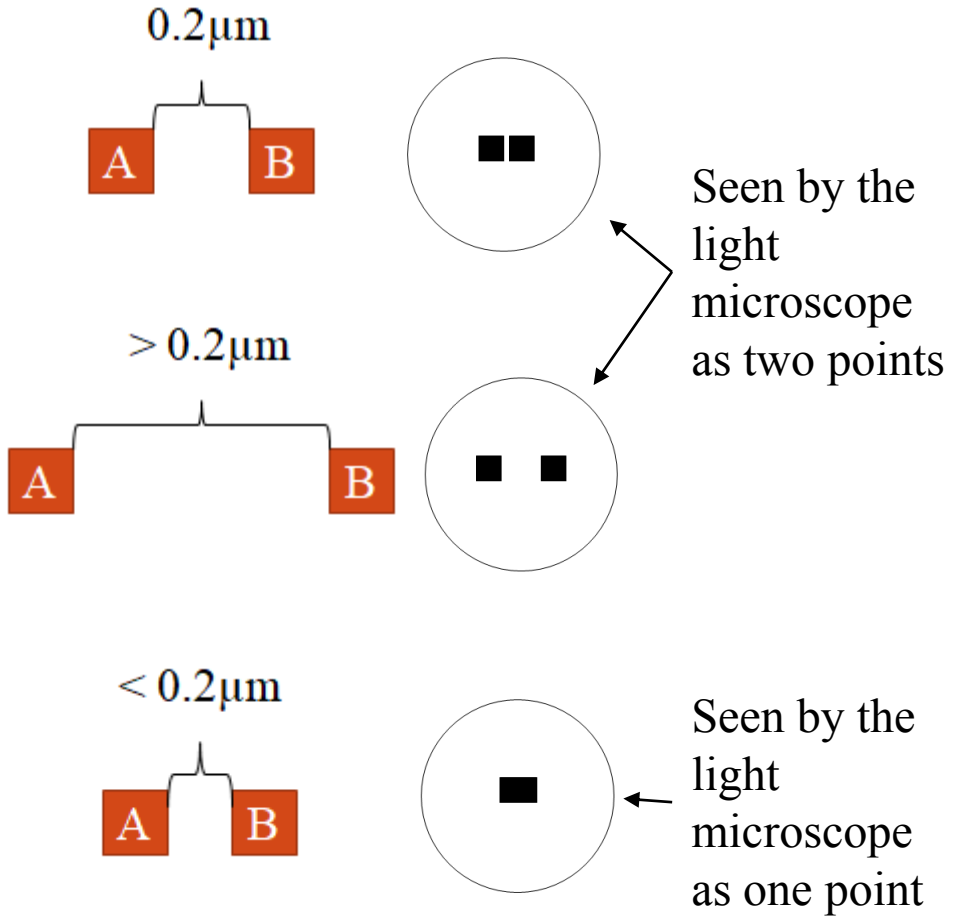


Fig.2: Image showing various parts of a Bright-field light microscope.

أقل مسافة ممكنة بين نقطتين بتسمحلي أشوفهم نقطتين منفصلات.
(لو المسافة أقل رح أشوفهم نقطة أو قطعة وحدة)

- The Resolving power of the light microscope is about 0.2µm.

- ***Resolving power***: the minimum distance between two points that enable the device to recognize them as two points*.



* This same definition of resolving power can be used for cameras, television sets, computer monitors, and the human eye.

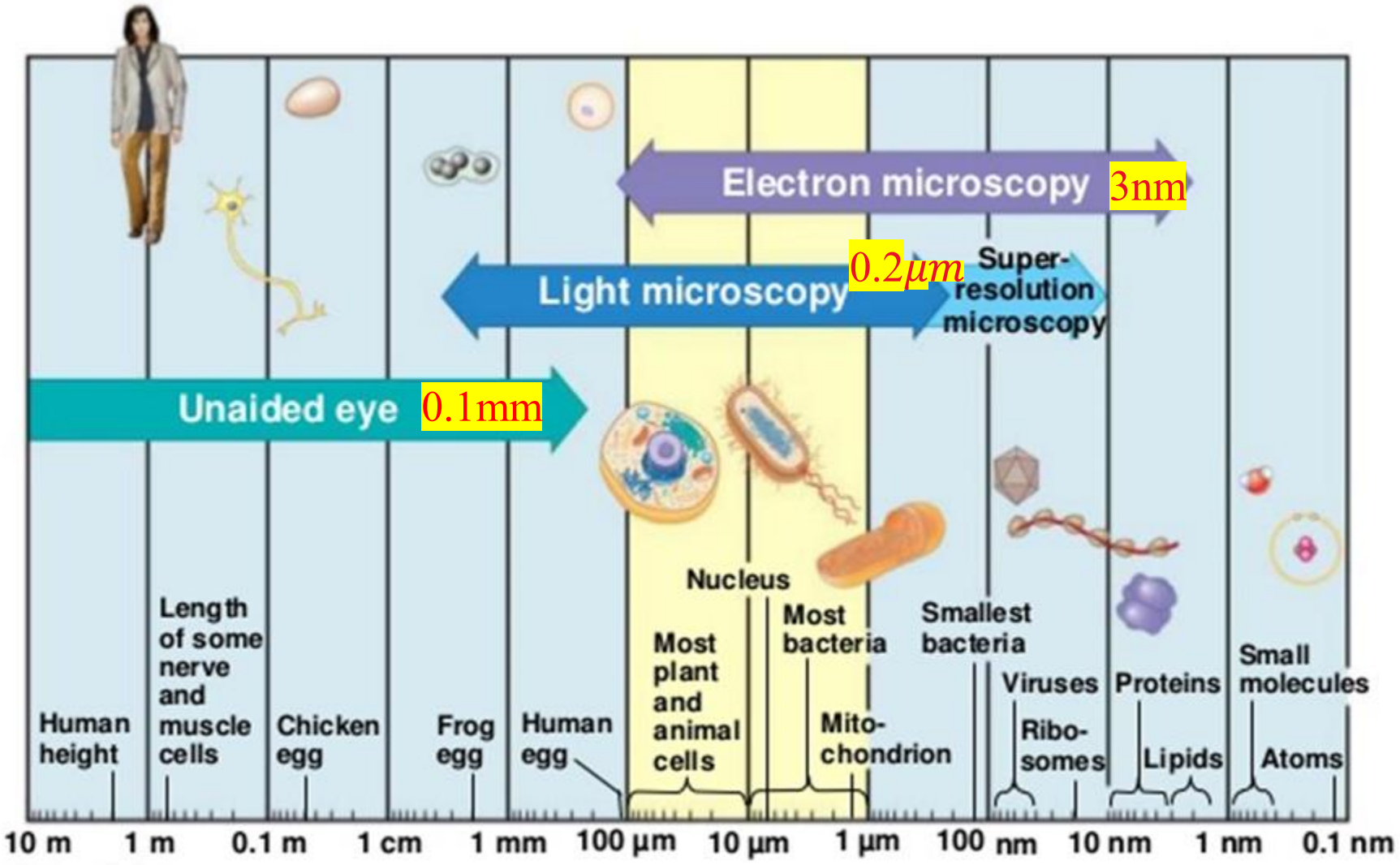


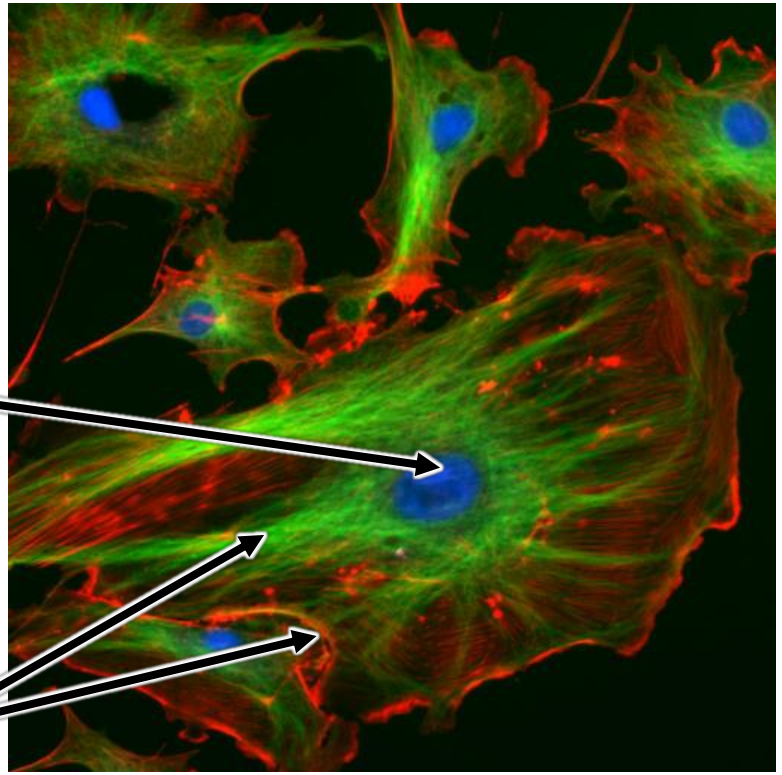
Fig.3: Resolving power of various optical devices.

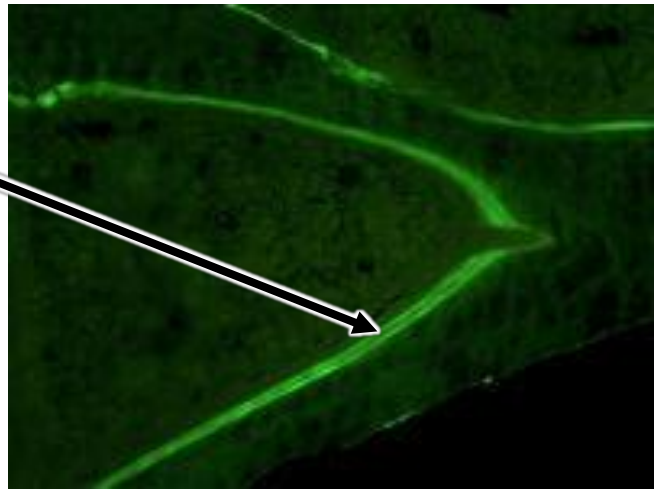
2) Fluorescence Microscopy

- When certain substances are irradiated by a ray of a certain wavelength, they emit an electromagnetic wave of a, usually, longer wavelength. This is called ***fluorescence***. خاصية فيزيائية موجودة في بعض المواد بتقوم على تعريض المادة للإشعاع بطول موجي معين فبتعطيني إشعاع آخر بطول موجي آخر (وغالبا أطول)
- When UV light is used, the emission is in the visible spectrum. الأشعة المستخدمة في المختبرات هي الأشعة فوق البنفسجية
- During tissue preparation, certain substances with this characteristic can be added to the tissue. These will bind to the various structures and make them fluorescent. وأنا بحضر بالنسيج حسب الخطوات المذكورة سابقا, بضيفله المادة المتأثرة بالإشعاع وبعد ما أحط العينة تحت المجهر بعرضها للإشعاع فبتعطي ضوء مرئي

• Example of fluorescent substances:

1) Diamidinophenylindole (DAPI) binds to DNA → ***Blue***
2) Phalloidin binds to actin filaments → ***Red***, ***Green***
3) Tetracycline binds to newly formed bone → ***Green***





وهون أمثلة على مجموعة من المواد المتفاعلة مع الإشعاع واللون اللي بعطيه كل واحد منها بعد تعريضه للإشعاع

The Electron Microscope

- Uses a beam of electrons instead of light photons.
- It gives a much higher *resolution* than the light microscope (resolving power around 3nm).
- It could be either Transmission Electron Microscope (TEM) or Scanning Electron Microscope (SEM).

1) TEM

- The beam of electrons interact differently with the different parts of the section.
- Some are deflected, some pass through, and some are reflected.
- Electrons passing through the section are detected to produce an image.

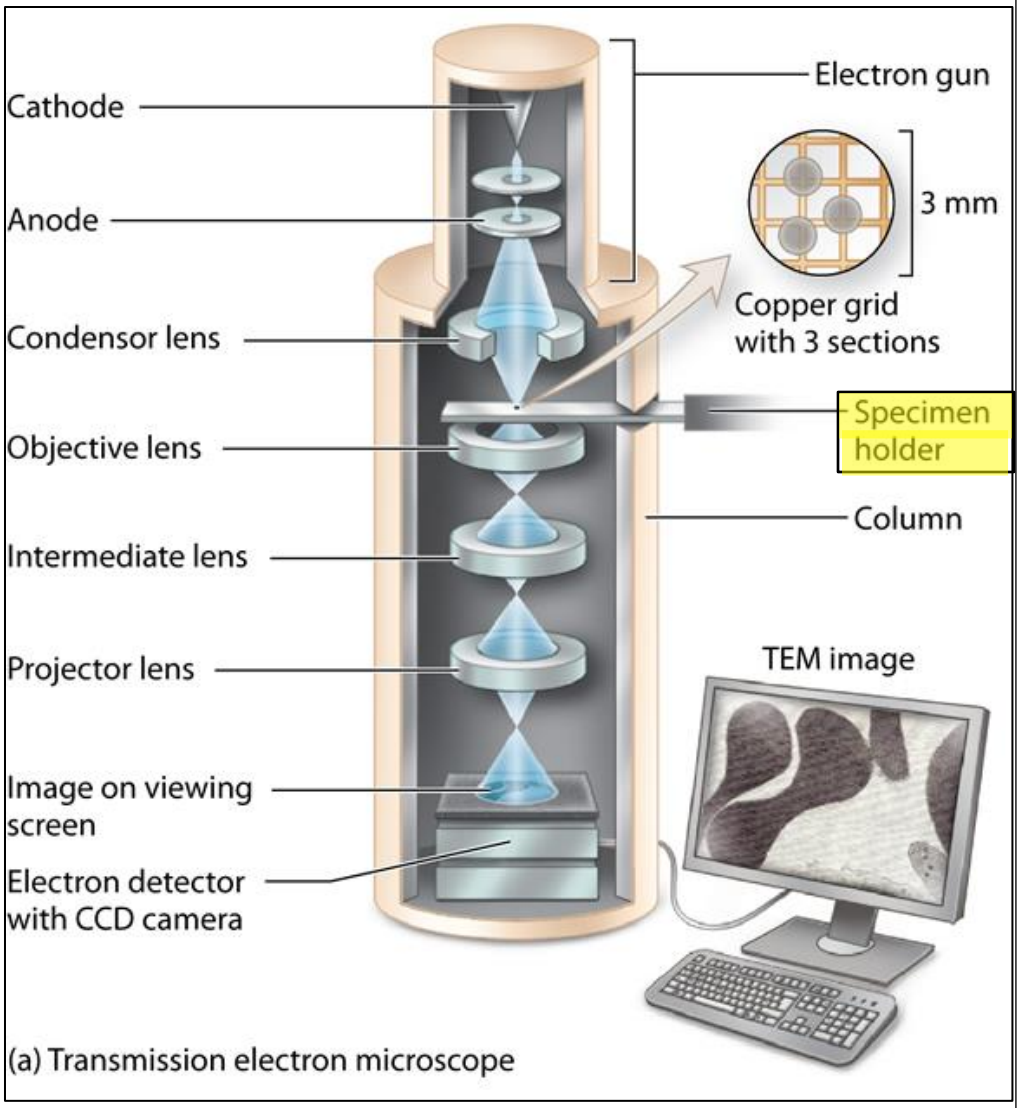


Fig.4: Schematic drawing of TEM.

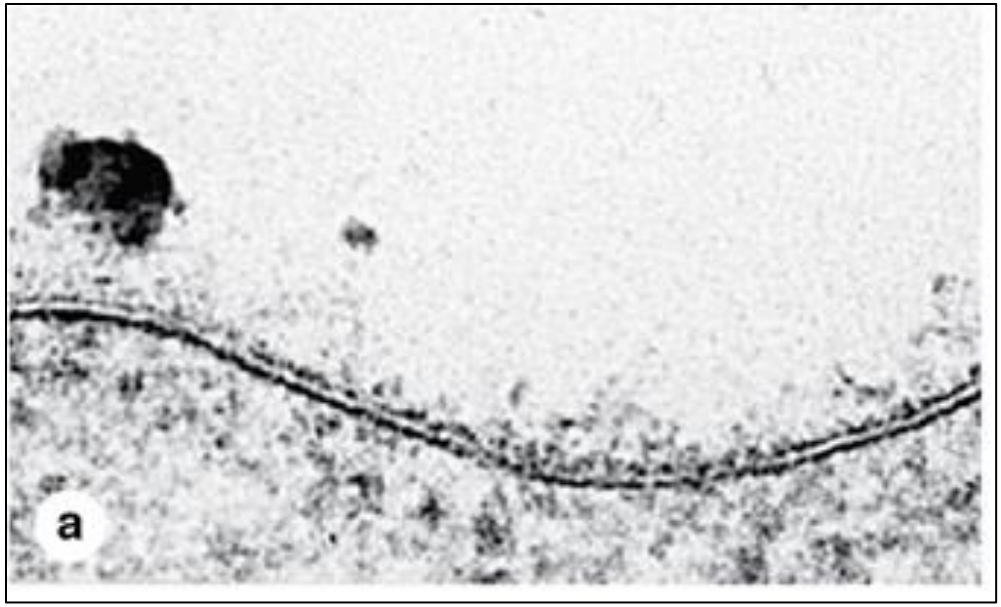
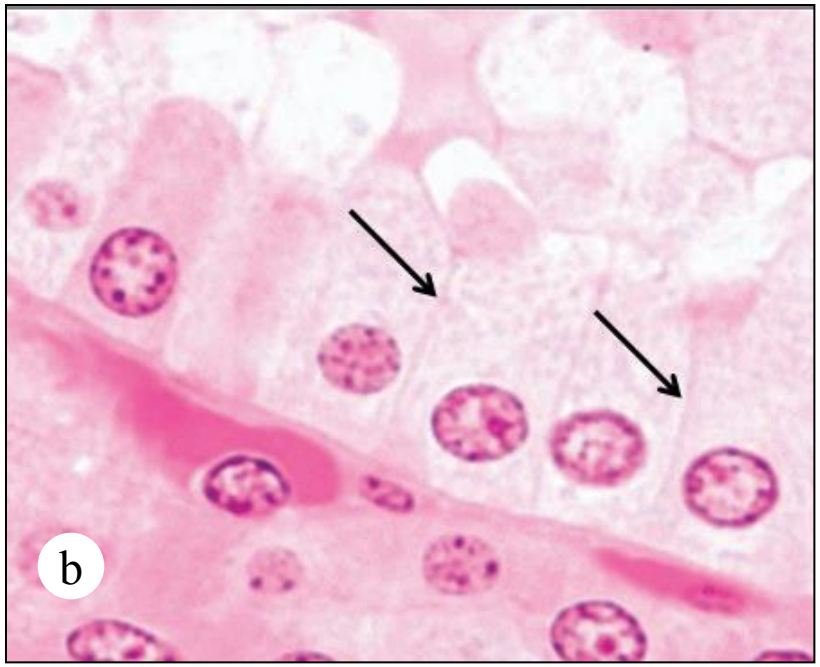


Fig.5: (a) A TEM image of the cell membrane. Note how it appears to be formed of a white line between two dark lines. In the light microscope image (b), the cell membrane appears as a very thin line (arrows). With the electron microscope, we obtained an image with a higher resolution giving us more details about the structure studied.



2) SEM

- The specimen is first coated with a metal that reflects electrons.
  Like Au/Ag (الذهب والفضة)
- The electron beam scans the specimen from end to end.
- The reflected electrons are captured to produce a *pseudo-3D* image of the coated *surface*.

**I'm not getting an image of the inside of the tissue

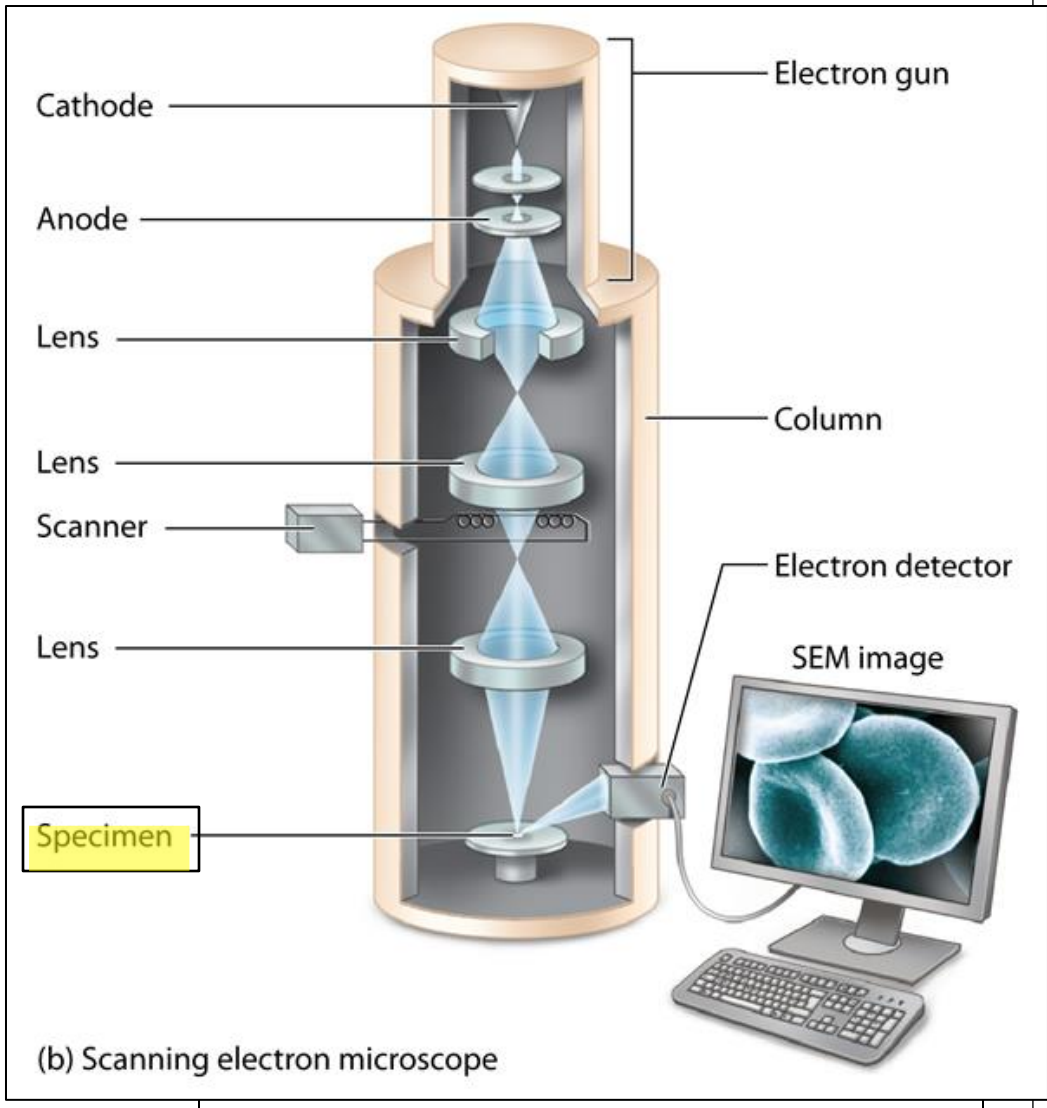


Fig.6: Schematic drawing of SEM.

Fig.7: A SEM image of an ant.

صورة بتمثل الfront part لنملة , وبقدر أشوف بوضوح 3D image لسطح النملة

وتفاصيل الصورة اللي بشوفها بتكون نتيجة لإختلاف زوايا إنعكاس الإلكترونات

that's why it's called *pseudo-3D* not 3D

Other methods of study

1) Autoradiography

*Some type of radiation that comes out from the tissue itself

- Molecules (amino acids, sugars, nucleotides, etc…) labeled with radioactive isotopes (usually tritium, ^{3}H) are added to the living tissue prior to preparation.

بعض المواد بكون الها خاصية إشعاعية ذاتية.. فإحنا بنضيفها للنسيج أثناء تحضيره وبترتبط بأجزاء معينة فيه

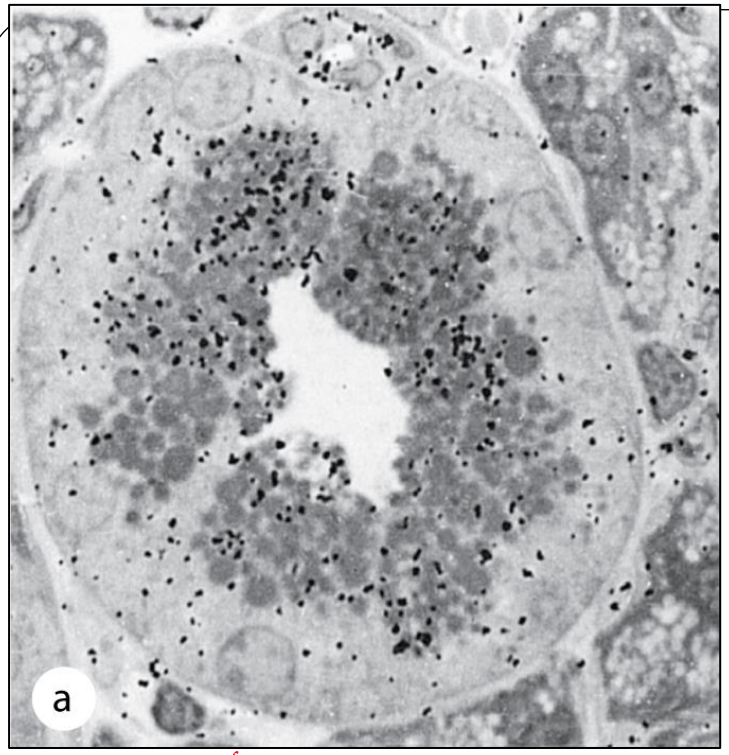
- The radioactive molecules are taken up by the tissue → The tissue will give off radiation.

الجزء اللي اربطت فيه هاي المواد بصير مُشِع وبصير تمييزه أسهل

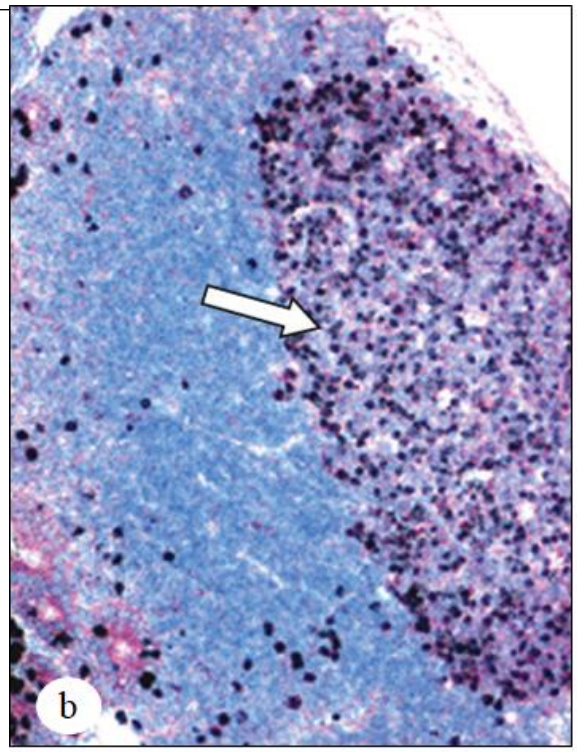
- The slide is covered by an emulsion containing **Silver Bromide** to detect the radiation.

المادة هاي بتحتوي على أيونات الsilver,
ولما تتعرض للإشعاع بتتحول ل metallic silver وبتترسب على النسيج المُشِع, فلما أضيفها على النسيج
وترتبط بجزء معين فيه.. بعد تعريض النسيج للإشعاع رح يظهر هاض الجزء على شكل نقاط سوداء.

- The slide is developed in a dark box and the areas of tissue containing the radioactive molecules appear as black dots.



بالصورة b.. نفس المبدأ, ضفت مادة مُشِعة للنسيج بعدين ضفت الsilver bromide عشان احدد مناطق الإشعاع وظهرت على شكل نقاط سوداء.. بس الفرق إنه تم استخدام وسائل صَبغ أخرى عشان أميز أجزاء أخرى من النسيج



بالصورة a.. يتم تصنيع الsaliva داخل الsalivary glands عن طريق مادة الfucose.. فأنا بحضر الfucose وبخليها radioactive بإضافة عنصر مُشِع عليها بعدين بضيفها للنسيج.. وبما إنه المادة مخصصة لصناعة الsaliva ف رح تتوجه مباشرة للsalivary gland.. بعدين رح أضيف الsilver bromide للنسيج.. وبعد ما يدخل ويتعرض للإشعاع من الfucose اللي ضفته سابقا رح يتحول لmetallic silver ويترسب على مصادر الإشعاع داخل النسيج.. وبما انه الmetallic silver لا يسمح بمرور الضوء رح تظهر جميع المناطق اللي بتحتوي على silver على شكل نقاط سوداء

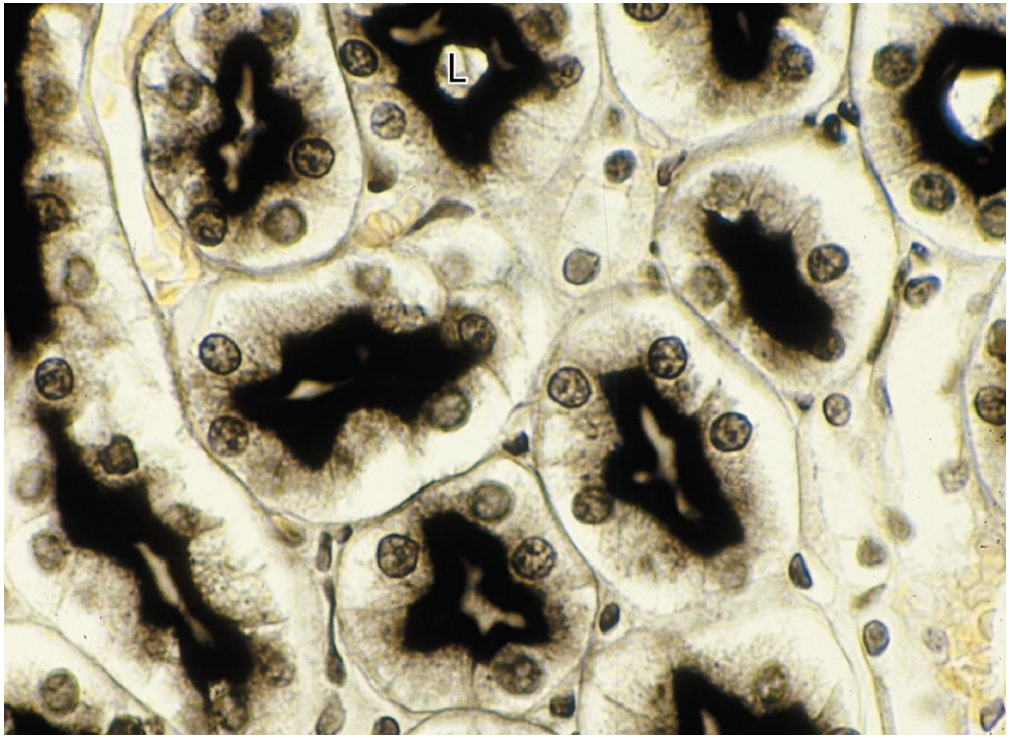
Fig.8: (a) Mouse salivary gland injected with radioactive fucose which was used in the synthesis of saliva. The black dots indicate the site of synthesis. (b) Mouse lymph node injected with radioactive thymidine. The thymidine was concentrated in areas where DNA synthesis was taking place. The section was also regularly stained.

2) Histochemistry

- Chemical reactions occur throughout the body. These reactions produce soluble, thus, invisible substances.

- In histochemistry, certain ***Markers*** are added to the tissue that will convert the reaction products into insoluble and, therefore, visible substances that can be detected.

ما دام المواد قابلة للذوبان فهي رح تكون غير مرئية (لإنها رح تذوب).. فالحل أضيفلها مواد تخليها غير قابلة للذوبان, وبالتالي بتصير مرئية



الصورة بتعرضلي جزء من الkidney وهو الrenal tubules وبدي أدرس خلاياه اللي بتحتوي على نشاط عالي للalkaline phosphatase , فأنا لازم أكون عارف مكان تواجده, و إيش آلية التفاعل اللي بحفزه عشان أقدر أقررأي نوع من الmarkers رح أحتاج, واللي انعمل هون هو تحويل نتائج تفاعل الalkaline phosphatase لمواد غير قابلة للذوبان وبالتالي صارت مرئية وقدرت أحددها

Fig.9: Renal tubules. A histochemical method was used to localize areas with high alkaline phosphatase activity.

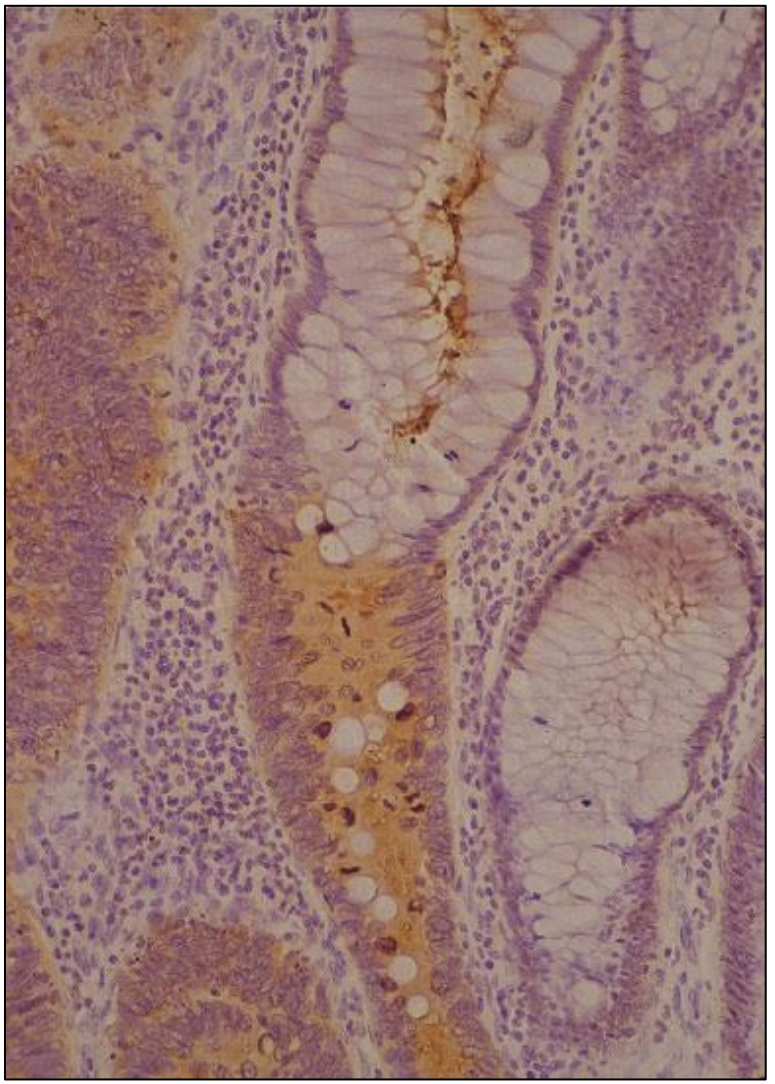
بسميه هيك لما أكون بدرس خليه

3) Immunocytochemistry

ولما أكون بدرس نسيج بسميه

Immunohistochemistry

- ***Tagged antibodies*** specific against a certain part of a tissue are used.
- These bind to the tissue causing their staining.



لما أتعامل مع مرض معين.. هاض المرض بحتاج أجسام مضادة تعالجه, بس بما إنها غير مرئية بستعمل أحد الطرق السابقة عشان أخليه مرئي. لما ييجي مريض ممكن يحمل نفس المرض بستخدم نفس المضاد المصبوغ.. لو ظهر عندي لون الصبغة داخل النسيج هاض معناه انه المضاد استجاب للمحفز تاعه (المرض) والشخص مصاب

Fig.10: Adenocarcinoma of the intestine stained using an antibody against a specific substance produced by the tumor. Cancer cells are stained brown.

Problems with tissue preparation

1) ***Artifacts:*** (something wrong that happen during the preparation) these include :

- precipitation of stains : أحيانا ممكن يصير تسرب بالstain خلال تحضير الslide, ف بظهر عندي تجمع غير طبيعي للstain بمناطق معينة بتبين تحت المجهر, زي إنه يظهر عندي لون أحمر فأنا أفكره acidophilic وهو مجرد artifact

- breakage in the tissue : خلال الشغل عالtissue رح أضطر أحيانا أنقله من مكان للثاني.. و خلال نقله أو تحريكه ممكن أتسبب بكسره

- shrinkage of tissues : الخلايا والأنسجة بشكل عام بتحتوي على الماء.. وهو اللي بعطي الخلية شكلها وحجمها, بس أحيانا بتبخر جزء كبير من الماء بسبب المواد الكيميائية المُستخدَمة, وهاض يؤدي لتقليل حجم الخلية أو النسيج, ولما يقل حجم الخلايا المسافات بينها رح تزيد, المسافة هاي بسميها (Artificial Space) وهي ليست من خصائص النسيج

**Artificial space causes : - breakage in the tissue
- shrinkage of tissues

2) ***Totality of tissues***: it's almost certainly impossible to differentially stain the different parts of a cell or a tissue at the same time. Therefore, several sections must be studied and different methods may be used.

النسيج دائما ما يكون على هيئة وحدة واحدة (the tissue is one) عشان هيك
لا يمكن استخدم صبغة وحدة لتمييز أجزاؤه المختلفة بنفس الوقت..
ف عشان أقدر أدرسه لازم استخدم أكثر من صبغة (زي ما عملنا بسلايد رقم 6)
و أستعمل أكثر من طريقة (زي ما ذُكِر سابقا)

3) ***3D vs 2D:*** a section will give us a 2D image of a 3D object. A sphere appears as a circle and a tube may appear as a ring (a sphere appear as circle). Different planes of sectioning will give the same object different appearances in the section. So, it's, sometimes, necessary to create sections in different planes to get the true shape of the object.

كلشي بالدنيا بكون 3D object.. بس لما أشوفه بالمجهر رح يكون 2D, وهاض الإشي ينتج عنه إني أشوف أجسام مختلفة بنفس الشكل, أو ما أقدر أشوف خصائص الجسم كاملة و بوضوح, وعشان أقدر أعرف كلشي بدي إياه عن العينة لازم أشوفها من أكثر من منظور أو جهة و أجمعهم كلهم بالاخر

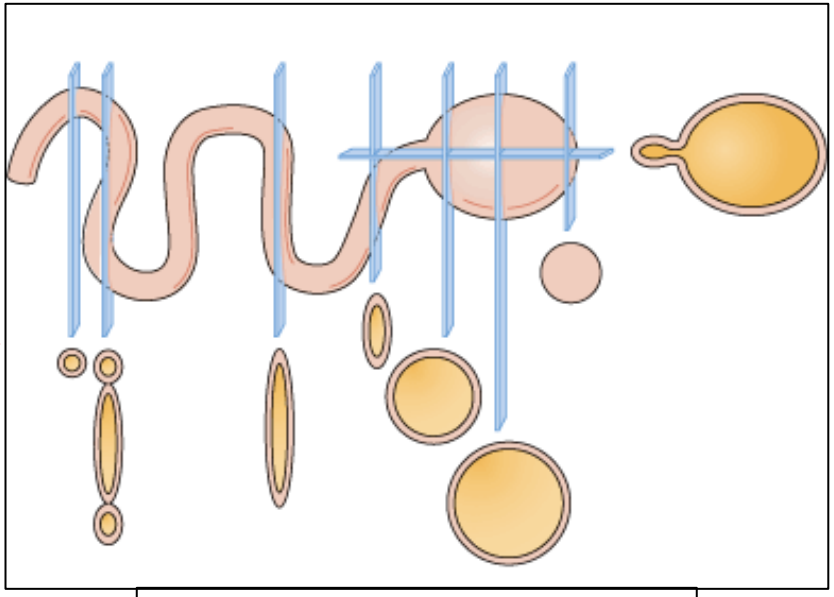


Fig.11: A tube sectioned in several planes.

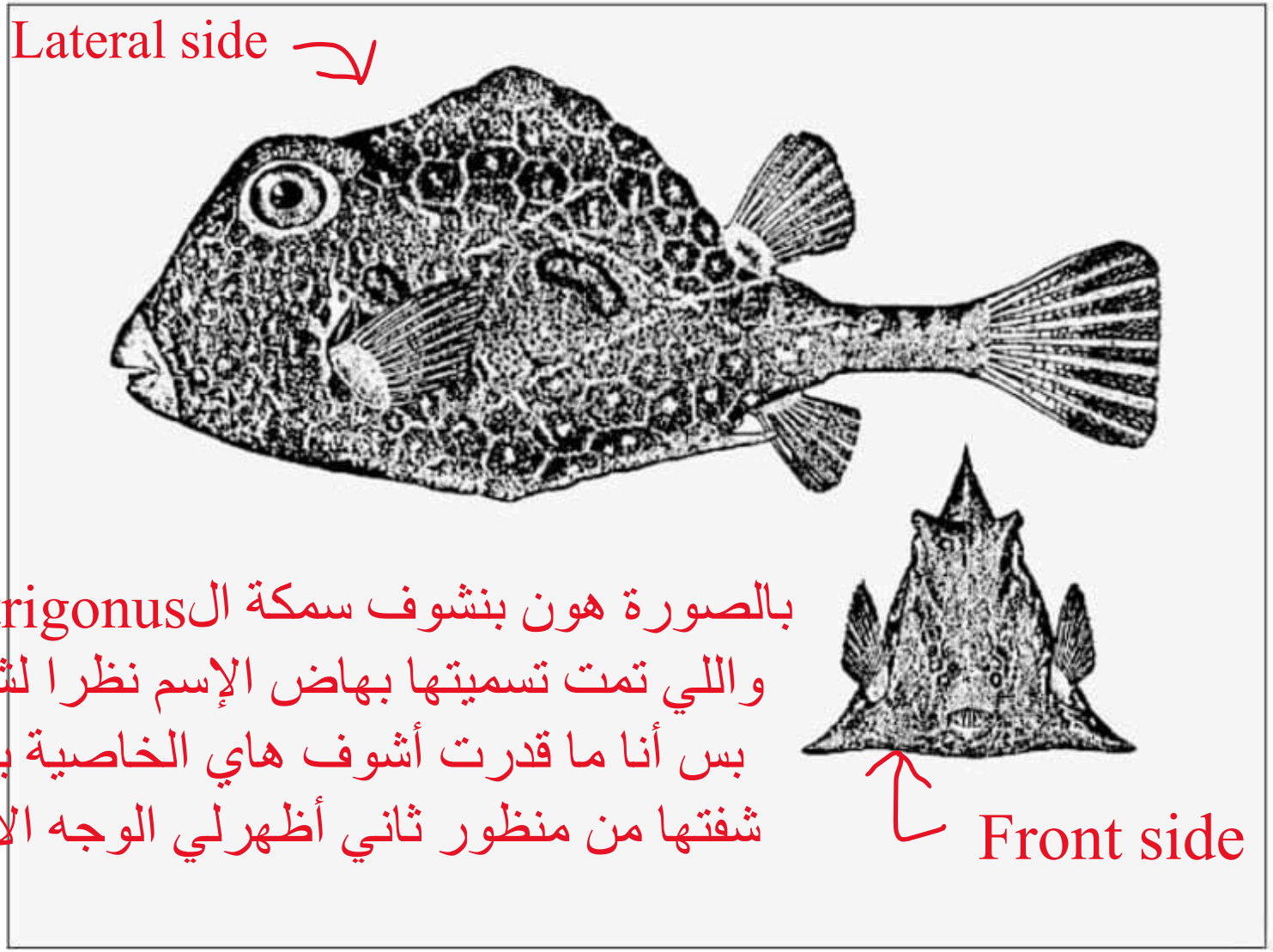


Fig.12: *Lactophrys trigonus*

Atomic Force Microscope (AFM)

- In this type of microscopes, the surface of the specimen is scanned by a nano-sized probe at a very short distance (few nanometers).

هاض المجهر بشتغل بمبدأ مسح الslide بواسطة nano-sized probe.. وعمسافة دقيقة جدا بحيث لو أبعد أو أقرب شوي ما رح يقدر يمسح العينة, وبتم المسح بقوة تسمى Van Der Waals Force

- At such distances, the surface and the probe interact with each other through atomic forces (mainly the van der Waals force).

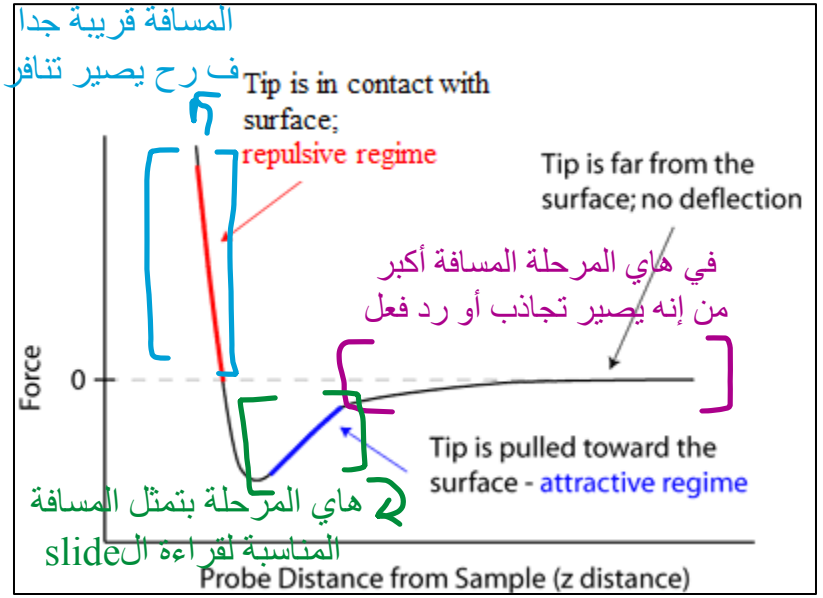


Fig.13: The relation between force and distance in an AFM.

AFM was invented at IBM.

- The probe consist of a spring (cantilever) and a tip. As the tip moves over the specimen, the cantilever will bend according to the contours of the surface.
- A laser directed at the back-surface of the cantilever is reflected onto a photodiode. The position of the laser depends on the position of the cantilever.

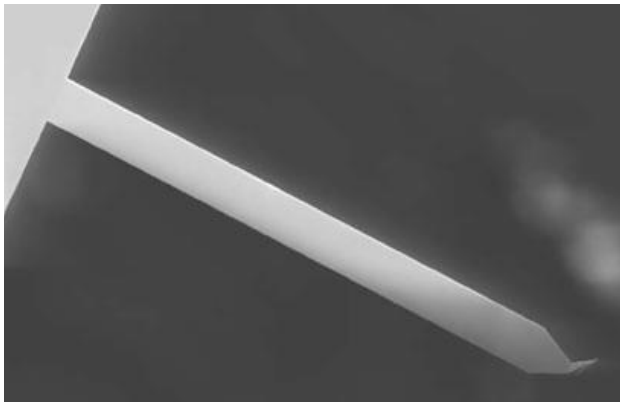
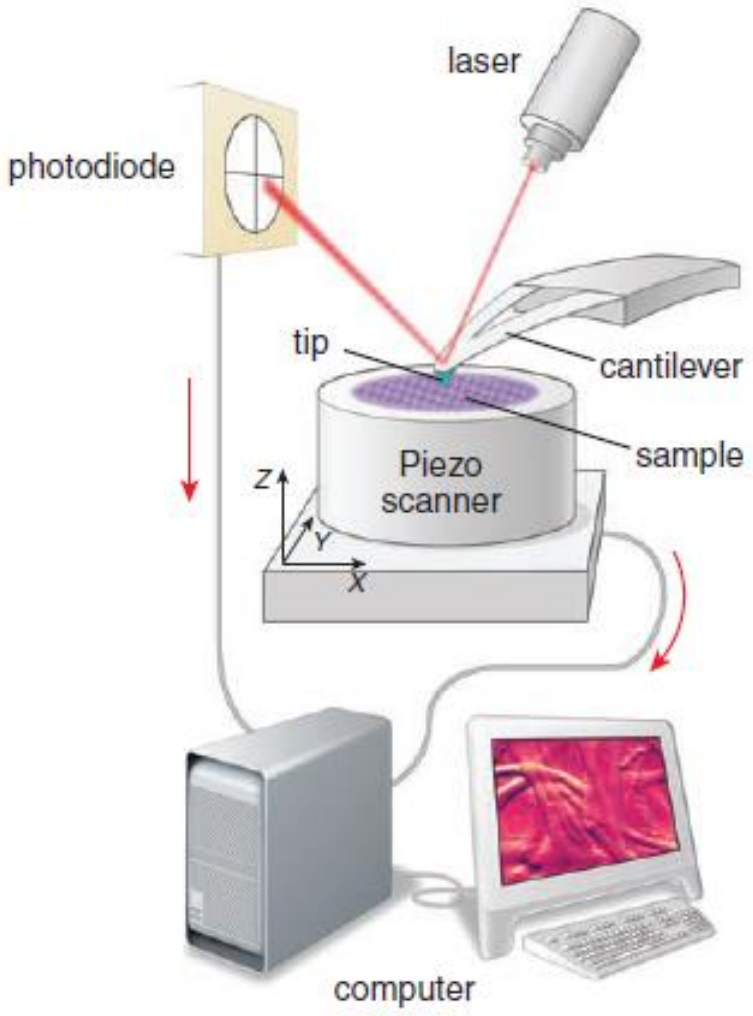
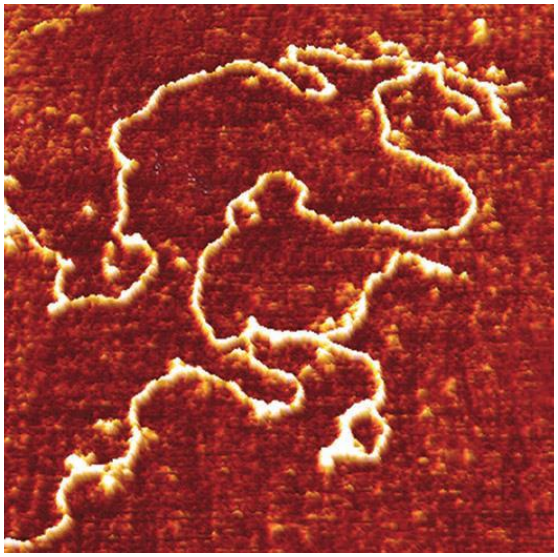


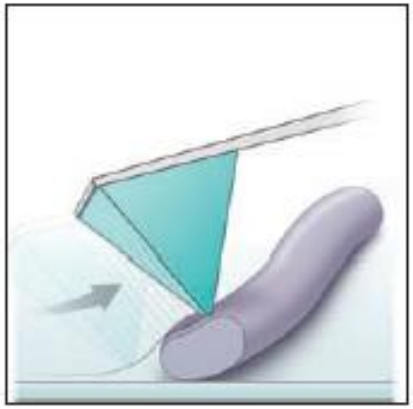
Fig.14: A SEM image of the cantilever and tip of the AFM.

اللي عنا بالصورة هي صورة للAFM بواسطة الSEM, بتكون من cantilever وtip بنهايته, حيث يمر الtip فوق العينة على مسافة صغيرة جدا مع حركة مستمرة للcantilever للأعلى والأسفل فوق العينة, وخلال حركته بكون في laser موجه على ظهر الcantilever وينعكس على photodiode اللي بدوره بقوم بتحويل انعكاس الlaser لصورة 3D لسطح العينة, تفاصيل العينة معتمدة على اختلاف موقع انعكاس الlaser بسبب استمرار تحرك الcantilever, والصورة بتكونب Resolving Power مقدارها 0.1nm ما يساوي 1 إنجيستروم (1Å). وبقدر من خلال الAFM اشوف كل الذرّات باستثناء الH والHe

- A computer will create an image of the surface based on the varying position of the laser.
- The image obtained is a true 3D image of the surface with a resolving power of 0.1nm (1Å).







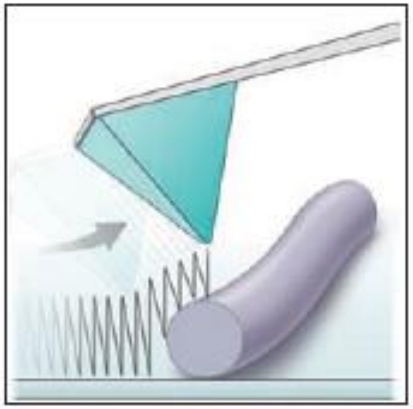


Fig.15: Components and mode of action of AFM. In the top-right, an image of a single molecule of DNA seen by AFM.

Thank You

" Some men see things as they are and say: WHY?
I dream things that never were and say: WHY NOT? “