Effect of inactive Rabies virus vaccine in spleen structure of species *Myotis* myotis

Dr.Nahla Ibrahim*

(Received 29 / 1 / 2024. Accepted 5 / 3 /2024)

□ ABSTRACT □

In this research, we identified the morphology and histological structure of the spleen at *Myotis* myotis (family Vespertilionidae) and studying of changes in the structure of the spleen as a result of response to inactive rabies vaccine, We used adult animals randomly: inactive virus with a main dose and two supportive doses in the third and tenth days, We compared the structure of the species' spleens before and after the doses. The morphological study of the spleen showed that it appears pink in colour and has a flat, elongated and curved shape, swollen at one end. Histologically, the spleen tissue generally consists of two distinct regions, the red pulp, the white pulp and a Marginal Zones are the boundary zone between the red pulp and white pulp, and it is surrounded by thin capsule that forms the outer covering. On day 10 during the tenth day after dosing the species with inactive rabies vaccine, lymphatic hyperplasia, splenomegaly, global vacuolar necrosis of liver cells, and the appearance of storage foci occur.

Keywords: *Myotis myotis*, Rabies, Histological study, spleen, liver.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Associate Professor, animal department, faculty of science, Tishreen university, Latakia, Syria.**
nahla.ibrahim@tishreen.edu

تأثير لقاح داء الكَلَب الخامل في بنية طحال الخفاش آكل الحشرات *Myotis myotis*

د. نهلة إبراهيم*

(تاريخ الإيداع 29 / 1 / 2024. قبل للنشر في 5 / 3 / 2024)

□ ملخّص □

تم في هذا البحث دراسة التغير في التركيب النسيجي للطحال والكبد عند الخفاش *Myotis myotis* الذي ينتمي لفصيلة Vespertilionidae نتيجة الاستجابة للقاح داء الكَلَب الخامل، استخدمت الحيوانات البالغة بشكل عشوائي، تم استخدام الفيروس الخامل بجرعة رئيسية وجرعتين داعمتين خلال الأيام 3 و7 وقمنا بمقارنة بنية الطحال والكبد النوع قبل وبعد الجرعات.

بينت نتائج الدراسة التشريحية والنسيجية لطحال وكبد النوع خلال اليوم العاشر بعد تجريع النوع بلقاح داء الكَلَب الخامل حدوث فرط تصنع لمفاوي وضخامة لنوى الطحال وحدوث استحالة فجوية شاملة لخلايا الكبد وظهور بؤر تخزينية.

الكلمات المفتاحية: *Myotis myotis*، داء الكَلَب، دارسة نسيجية، الطحال، الكبد.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

*أستاذ مساعد -قسم علم الحيوان – كلية العلوم - جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

مقدمة:

تشكل الخفافيش حاضنة طبيعية لأكثر من 100 نوع من الفيروسات بعضها مميتٌ للبشر، من بينها فيروس متلازمة الشرق الأوسط التنفسية، فيروس إيبولا، فيروس داء الكَلَب، تعود هذه المناعة ضد الفيروسات تحديداً لدور الانترفيرونات Interferons التي تعمل كمتممات في الاستجابة المناعية الفطرية لدى الخفافيش، فخلافاً للبشر تمتلك الخفافيش فقط 3 أنواع من الانترفيرونات وهذا يشكل تقريباً ربع العدد الموجود لدى الإنسان، وبعكس الثدييات التي تنشط لديها أجهزة المناعة بعد العدوى فقط، يبقى الانترفيرون ألفا عند الخفافيش فعالاً بشكل دائم حتى في حال عدم التعرض للفيروسات؛ مما يسمح باستجابة فعالة وسريعة ودائمة، في حين أن استمرارية الفعاليات المناعية في أنواع أخرى كالإنسان أو الفئران تسبب السميّة للخلايا والأنسجة (Zhou, 2016).

يعد داء الكَلَب أحد الأمراض الأكثر خطورةً وانتشاراً عبر الخفافيش، وفيروس داء الكَلَب هو فيروس مميت ينتقل إلى الأشخاص من لعاب الحيوانات المصابة عن طريق العض ليستهدف الدماغَ والجهاز العصبي حيث يتطور بدايةً في الخلايا العضلية بمنطقة العض لينتقل لاحقاً إلى الخلايا العصبية (Charles *et al*., 2006).

تشكل الخفافيش حاضنة طبيعية لأكثر من 100 نوع من الفيروسات بعضها مميتٌ للبشر، من بينها فيروس متلازمة الشرق الأوسط التنفسية، وفيروس إيبولا، وفيروس داء الكَلَب. تعود هذه المناعة ضد الفيروسات تحديداً لدور الإنترفيرونات Interferonsالتي تعمل كمتممات في الاستجابة المناعية الفطرية لدى الخفافيش.

يرجح أن فيروس كورونا المسبب لمرض COVID-19 الذي أصاب أكثر من 31 مليون شخص وتسبب بعدد وفيات حوالي المليون حول العالم خلال العامين 2019-2021 قد تطور من الفيروسات التاجية التي تعود إلى الخفافيش إذ يتشابه الجينوم لـ COVID-19 بنسبة 85% مع جينوم الفيروس التاجي الموجود في الخفافيش (Sharma, 2020).

يعد الطحال أحد الأعضاء اللمفاوية الثانوية الهامة لدى الخفافيش وله دور رئيس في المناعة الفطرية والمكتسبة تجاه العوامل الممرضة بما في ذلك الفيروسات (Den Haan & Kraal, 2012; Zhao *et al*., 2015).

يتفاوت التركيب النسيجي للكبد عند الفقاريات، ولكن هناك ملامح عامة شائعة في معظم الأنواع، إذ يحاط الكبد بمحفظة رقيقة من النسيج الضام تدعى غليسون Glisson، وهو أمر شائع عند جميع الفقاريات (Schaffner *et a*l., 1988) كما تمثل فصيصات الكبد Hepatic lobes والثالوث الكبدي Hepatic triad الوحدة الوظيفية والهيكلية للكبد إذ يحتوي فصيص الكبد Hepatic lobe على وريد مركزي Central vein محاطاً بخلايا كبدية Hepatocytes ويوجد بينها فراغات صغيرة تدعى بالجيبانيات (أشباه الجيوب) Sinusoids التي تكون مبطنة بصف واحد من الخلايا البطانية ويقع الثالوث الكبدي بين الخلايا الكبدية ويحتوي على فرع من الوريد البابي Portal vein الذي يمتاز برقة جداره وكبر تجويفه واحاطة بطانته ببعض الألياف العضلية الملساء، فرع من الشريان الكبدي Hepatic artery الذي يتميز بثخانة جداره وصغر تجويفه وتعرجه، قناة صفراوية Bile duct التي تتميز بطانتها بأنها مكوّنة من صف واحد أو صفين من الخلايا مكعبة الشكل، الأوعية اللمفاوية والأعصاب (Monsefi et al., 2010).

تمت دراسة الطحال لدى ثلاثة أنواع من الخفافيش *Cynopterus titthaecheilus, Rousettus leschenaultii* and *Pteropus vampyrus*، ووجد أنه يحاط بمحفظة رقيقة، يتكون اللب الأحمر من الحبل الطحالي ومساحة وعائية دموية واسعة، وأشارت هذه الدراسة إلى بعض الاختلافات في بنية طحال خفافيش الحشرات مقارنة بأنواع الخفافيش الأخرى (Hanadhita *et al*., 2019).

كما بينت دراسة (الرمضان وآخرون، 2021) عدم وجود فروقات معنوية في ازدياد أوزان الطحال وأبعاده لدى كلا النوعين آكل الفاكهة *Rousettus aegyptiacus* وآكل الحشرات *Myotis myotis* بعد تجريع الخفافيش بلقاح داء الكَلَب الخامل عن أوزانها قبل التجريع.

بينت دراسة Mathur وآخرون أن الحقن داخل الصفاق (البريتوان) عند الفئران بفيروس التهاب الدماغ الياباني أدى إلى تضاعف الفيروس في الطبقة الداخلية للبريتوان ثم في البالعات الكبيرة الموجودة الجريبات اللمفاوية للطحال ولاحقاً في خلايا الغمد اللمفاوي المحيط بالقطب، كما لوحظت العدوى في كل من البالعات والخلايا التائية (Mathur *et al*., 1988).

تشير الدراسات إلى وجود العديد من التشابهات في الاستجابة المناعية بين الخفافيش وبقية الثدييات التي تليها في السلم التطوري، فعلى سبيل المثال تمت دراسة البالعات، والخلايا البائية والتائية والأضداد IgG, IgA وIgM في مصل الخفاش آكل الحشرات الكبير *Artibeus lituratu* , وتبين أن الأضداد تتشكل عند الخفافيش كما عند الثدييات ويتطلب ذلك حدثين هما التحويل والنضج تتوسطهما الخلايا التائية المساعدة (CD_4) Helper T cells (Charles *et al*., 2006).

تؤدي الخلايا المناعية المتخصصة (البالعات والعدلات والخلايا القاتلة) أدواراً أساسية في استجابة الخفاش كثوي لخمج ما والاحتواء المبكر له، إضافة إلى إنتاج كمية كبيرة من الأضداد IgG والتي تتطلب بدورها توسط الخلايا التائية المساعدة.

بينما يتكون اللب الأبيض من الأغماد اللمفاوية (منطقة الخلايا التائية) (PALS)، والجريبات اللمفاوية والمنطقة الهامشية. يحتوي الجريب اللمفاوي على مركز منشئ وخلايا بالعة قد تعبر عن نشاط الجهاز المناعي، كما تبدو المنطقة الهامشية واضحة ومتطورة (Hanadhita *et al*., 2019).

وأشارت هذه الدراسة إلى بعض الاختلافات في بنية طحال خفافيش الحشرات مقارنة بأنواع الخفافيش الأخرى (Hanadhita *et al*., 2019).

أهمية البحث وأهدافه:

تتبع أهمية البحث من دراسة التركيب النسيجي لطحال وكبد الخفاش *Myotis myotis* الذي ينتمي لفصيلة Vespertilionidaeودراسة التغيرات في بنيتهما نتيجة الاستجابة للقاح داء الكَلَب الخامل، مما سيشكل إضافة مهمة حول هذه الاستجابة، وتحديد قدرته المناعية بما يحقق إمكانية الاستفادة من هذه المعلومات وتطبيقاتها على المستويات البيئية والطبية والوقائية ويهدف هذا البحث إلى دراسة تغيرات بنيتي طحال وكبد النوع عند تجريعه بلقاح داء الكَلَب الخامل.

طرائق البحث ومواده:

مُنعت الحيوانات بـ 100µm من لقاح داء الكَلَب الخامل المخفف بمحلول Phosphate–buffered saline بنسبة 1:9 عن طريق الفم خلال الأيام 0,3,7 وتم إجراء المقاطع النسيجية للطحال قبل التجريع وخلال اليوم العاشر.

-المواد:

حيوانات التجربة:

تم اصطياد الخفافيش باستخدام الشباك، مغارة الدوار-قرية كفر صنيف-صافيتا-محافظة طرطوس، ووضعت في أقفاص بأبعاد 75*100 cm وتم تحديد المتطلبات الغذائية للنوع قبل البدء بالتجربة.

مواد البحث:

1- أقفاص، ميزان حراري، أدوات تشريح.

2- شرائح زجاجية، شركة E.S.L.C الصينية، سواتر زجاجية، مجهر ضوئي.

3-كحول، صبغة الهيماتوكسلين إيوزين،

4- لقاح داء الكَلَب الخامل (شركة zoetis)، محلول تخفيف Phosphate-buffered saline.

تصميم التجربة:

جمعت ثمانية أفراد بالغة بشكل عشوائي خلال شهري تموز وآب عام 2023 من النوع *Myotis myotis* الذي ينتمي لفصيلة Vespertilionidae .

تم الحصول على عينات الدراسة حيّة للمحافظة على بنيتي الطحال والكبد، ثم نقلت إلى مختبر كلية العلوم حيث جرى تخديرها باستخدام الكلوروفورم Chloroform، وبعد تشريح عينات المجموعة الأولى عُزل الطحال وتم حفظه في محلول الفورمول Formalin 10% لمدة 24 ساعة على الأقل قبل اعداده للدراسة النسيجية، بينما تم تجريع حيوانات المجموعة الثانية بلقاح داء الكلب الخامل بجرعة رئيسية وجرعتين داعمتين خلال الأيام 3 و7 ثم تم تشريح العينات ومقارنة بنية طحال النوع قبل وبعد الجرعات.

تم تحضير المقاطع النسيجية في قسم التشريح المرضي-مشفى تشرين الجامعي باللاذقية. اعتُمدت طريقة أبو عاقلة في معالجة العينات حيث نُزع الماء منها واستخدمت تراكيز متدرجة تصاعدياً من الكحول الإيتيلي Ethanol، وتنقيتها بالاكزايلول، ثم طُمرت بالبارافين باستخدام قوالب خاصة. تم التقطيع بسماكة 4 ميكرون باستخدام الميكروتوم الآلي (Meditome A 550)، ثم عُولجت المقاطع وفقاً للطرق المعتمدة تمهيداً لتلوينها بالهيماتوكسيلين-ايوزين، دُرست هذه المقاطع بواسطة المجهر الضوئي.

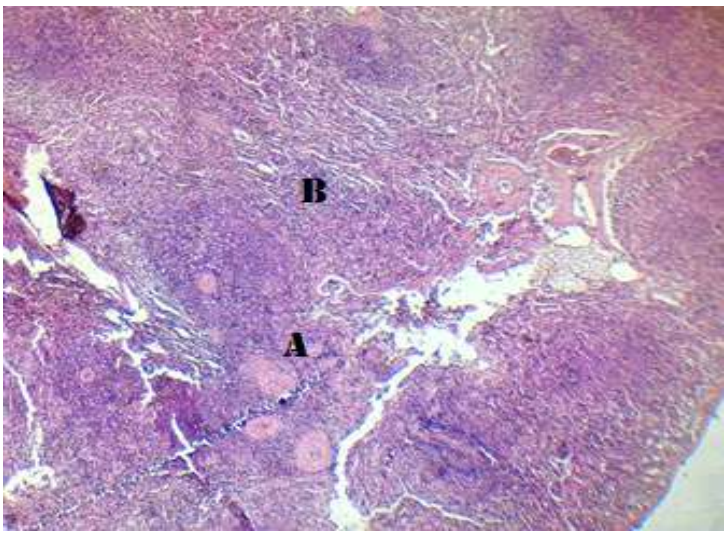
النتائج والمناقشة:

- النتائج:

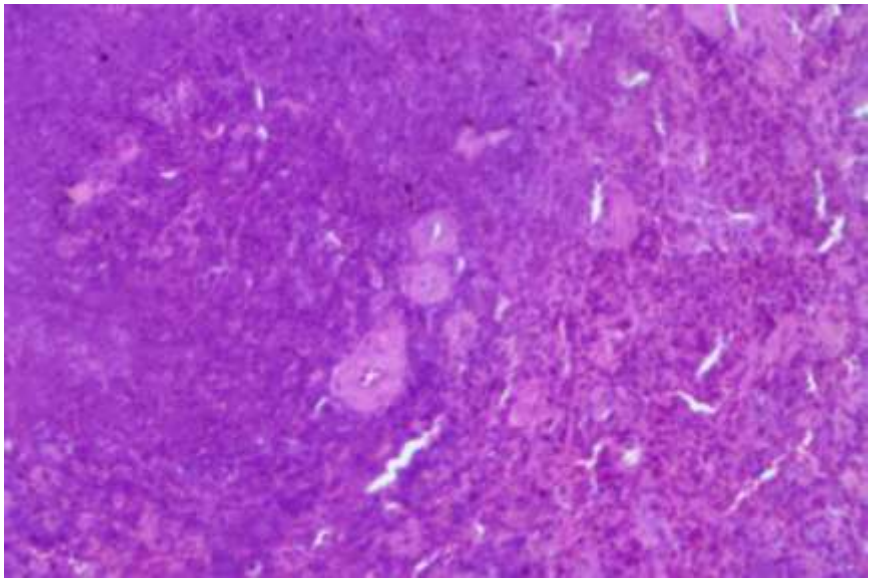
يبدو الطحال وردي اللون رفيع ومتطاول ذو سماكة أكبر في أحد الطرفين من الطرف الآخر بمتوسط وزن 0.0798gr الشكل (1).

الشكل (1) طحال النوع *Myotis myotis*

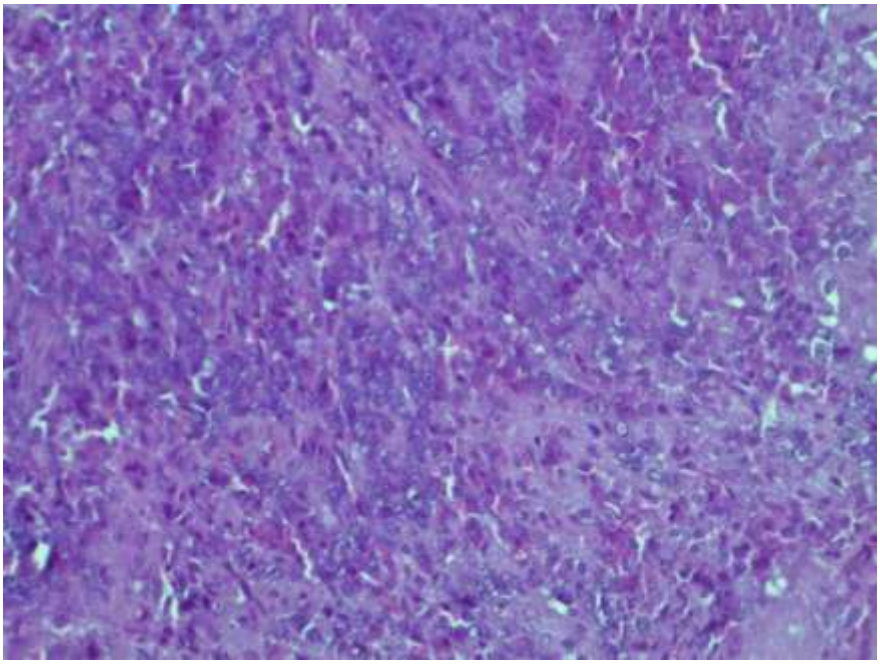
يبين الشكل (2) طحال طبيعي للنوع *Myotis myotis* يظهر فيه كل من اللب الأبيض واللب الأحمر، في حين بينت البنية التشريحية لطحال الخفاش *Myotis myotis* خلال اليوم العاشر بعد بدء التجريع حدوث فرط تصنع لمفاوي وتشكل بؤر تخزينية واستحالة فجوية لخلايا النسيج الشكل (3) وتشكل كبسولات تخزينية وضخامة نوى الشكل (4).



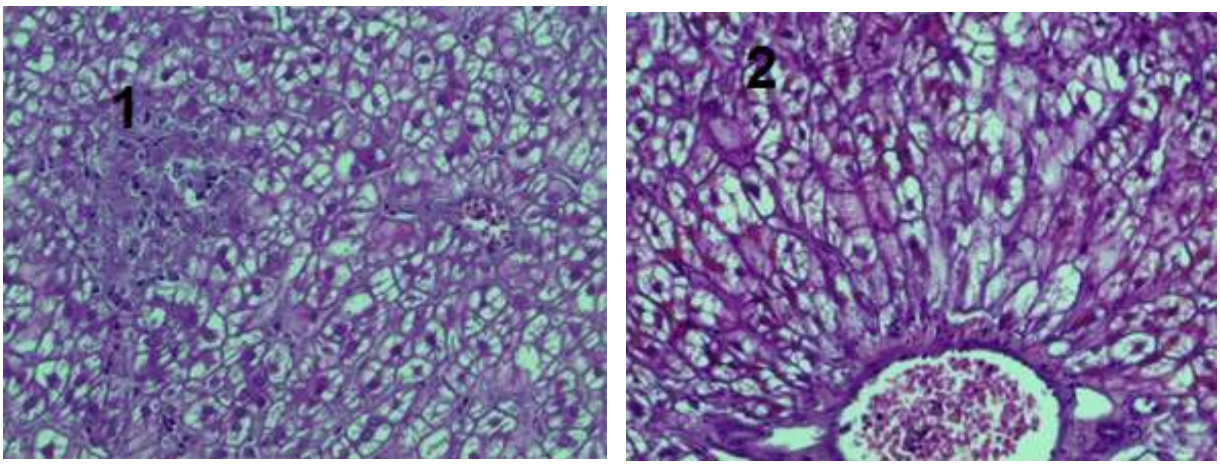
الشكل (2) مقطع مستعرض في طحال الخفاش Myotis myotis يوضح اللب الأبيض A واللب الأحمرB (H & E×100) .



الشكل (3) مقطع مستعرض في طحال الخفاش *Myotis myotis* يوضح تشكل فرط التصنع اللمفاوي خلال اليوم العاشر من بدء التجربة (H & E×100) .

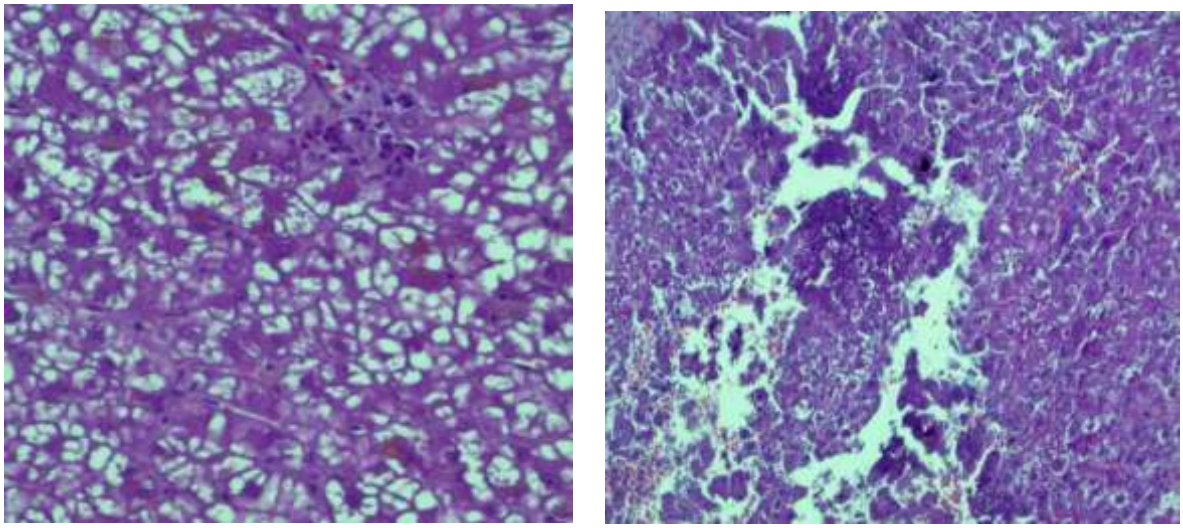


الشكل (4): مقطع مستعرض في طحال الخفاش *Myotis myotis* يوضح الكبسولات التخزينية وضخامة النوى خلال اليوم العاشر من بدء التجربة (H & E×400) .



الشكل (5): مقطع مستعرض في كبد الخفاش *Myotis myotis* يوضح حدوث استحالة فجوية شاملة للنسيج الكبدي خلال اليوم العاشر من بدء التجربة (H & E.. 1=×400,2=×100) .

وعند دراسة النسيج الكبدي بينت البنية التشريحية لكبد الخفاش *Myotis myotis* خلال اليوم العاشر بعد بدء التجريع حدوث استحالة فجوية شاملة للنسيج الكبدي الشكل (5) وظهور بؤر تخزينية الشكل (6).



الشكل (6): مقطع مستعرض في كبد الخفاش *Myotis myotis* يوضح حدوث استحالة فجوية شاملة للنسيج الكبدي وظهور بؤر تخزينية الشكل خلال اليوم العاشر من بدء التجربة.

الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من معطيات البحث ما يلي:

1- يتألف التركيب النسيجي للطحال عند الخفاش *Myotis myotis* من اللب الأبيض والب الأحمر والمنطقة الهامشية.

2- عند التجريع بلقاح داء الكَلَب الخامل تبين حدوث فرط تصنع لمفاوي وضخامة نوى خلايا الطحال خلال اليوم العاشر من بدء التجربة.

3- عند التجريع بلقاح داء الكَلَب الخامل تبين حدوث استحالة فجوية شاملة للنسيج الكبدي وظهور بؤر تخزينية الشكل خلال اليوم العاشر من بدء التجربة.

التوصيات:

1-نوصي باستخدام المجهر الالكتروني لدراسات تفصيلية وذات دقة أعلى.

2-اعتماد الدراسات اللاحقة على الكيمياء النسيجية والبيولوجيا الجزيئية لأنها تعطي دقة أكبر في دراسة النسج الحيوانية.

3-اعتماد التلوين المناعي باستخدام الأضداد الموسومة لدراسة نسيجية ومناعية أكثر دقة.

References:

أبو عاقلة، أحمد. عبد العزيز، 1999- التحضير النسيجي المجهري: الاسس النظرية والعلمية في التحضير المجهري للعينات النسيجية والخلوية، الطبعة(1)، دار المستقبل، عمان، الأردن.

الرمضان، يارا; ابراهيم، نهلة; العمر، أنور.(2021). رسالة ماجستير. تحديد صلات القربى بين نوعي الخفافيش آكل الحشرات *Myotis myotis* وآكل الحشرات Myotis myotis وفقاً للاستجابة المناعية لداء الكلب، كلية العلوم، جامعة تشرين.

-Abu Aqla, Ahmed. Abdel Aziz, -1999 The Histimety Microscopic Preparation: Theoretical and Scientific Foundations in Microscopic Preparation of Textile and Celling Samples, Edition (1), Dar Al -Mustaqbal, Amman, Jordan. Ramadan, Yara; Ibrahim, Nahla; Age, Anwar. (2021). Master Thesis. Determine the kinship links between the two types of bats Myotis Myotis and myotis insects according to the immune response to rabies, College of Science, Tishreen University.

Al-RAMADAN, YARA ; EBRAHEM, NAHLA ; Al-OMAR, ANOUAR, 2019- A Immunohistochemical comparative study of the distribution for some types of cytokeratin in the *Hyla savigni* and *Testudo graeca* liver's epithelium, , Tartous University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series. (In Arabic)

ABO AQILA, AHMAD. ABD ALAZIZ, 1999- Microscopic histological preparation: theoretical and scientific bases in microscopic preparation of tissue and cell samples, edition(1), Dar Almustaqbal, Oman, Jordan. (In Arabic)

Borch, W. R., Aguilera, N. S., Brissette, M. D., O'Malley, D. P., & Auerbach, A. (2019). Practical applications in immunohistochemistry: an immunophenotypic approach to the spleen. Archives of pathology & laboratory medicine, 143(9), 1093-1105.

CHARLES H. CALISHER; JAMES E. CHILDS; HUME E. FIELD; KATHRYN V. HOLMES; TONY SCHOUNTZ, (2006). Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, July, p. 531–545.

DEN HAAN, J. M. M., & KRAAL, G. (2012). Innate immune functions of macrophage Subpopulations in the spleen. Journal of Innate Immunity، 4(5–6), 437–445.

HANADHITA, D., RAHMA, A., PRAWIRA, A. Y., MAYASARI, N. L. P. I., SATYANINGTIJAS, A. S., HONDO, E., & AGUNGPRIYONO, S. (2019). The spleen morphophysiology of fruit bats. Anatomia, histologia, embryologia, 48(4), 315-324.

Mathur, A., Bharadwaj, M., Kulshreshtha, R., Rawat, S., Jain, A., & Chaturvedi, U. C. (1988). Immunopathological study of spleen during Japanese encephalitis virus infection in mice. British journal of experimental pathology, 69(3), 423.

MONSEFI, M ; GHOLAMI, Z ; ESMAEILI, H.R., 2010- Histological and morphological studies of digestive tube and liver of the Persian tooth-carp, Aphanius persicus (Actinopterygii: Cyprinodontidae). European Journal of Biology, vol.69, N°.1, 57-64p.

SHARMA, A. K. (2020). Corona virus pandemic: current scenario and future hopes. International Journal of Research in Medical Sciences, 8(5), 1.

SCHAFFNER, F.vol.19. GANS, C ; GAUNT, A., 1988- The liver in biology of the reptilian, Society for the study of amphibians and reptiles, Itheca NY, 485-531p.

ZHOU, P; TACHEDJIAN, M; WYNNE. J. W; BOYD. V; CUI, J, SMITH; MENDENHALL, I. H. (2016). Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN-α in bats. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113.10: 2696-2701.

ZHAO, L., LIU, L., GUO, B., & ZHU, B. (2015). Regulation of adaptive immune responses by guiding cell movements in the spleen. Frontiers in Microbiology, 6(645), 1–6. https://doi.org/10.3389/ fmicb.2015.00645.