التوصيف الظاهري والوظيفي لمجموعات الخلايا اللمفاوية الرئيسة في طحال الخفاش آكل الفاكهة *Rousettus aegyptiacus* واستجابتها للقاح داء الكَلَب الخامل

اعداد الطالبة : يارا الرمضان إشراف: د. نهلة ابراهيم ، د. تغريد قدار

ملخص البحث

تشير القدرة الفريدة للخفافيش على العمل كمستودع للحمّات شديدة الإمراضية للبشر إلى خصائص فريدة وخصائص وظيفية لجهازها المناعي، ومع ذلك فإن نقص الكواشف الخاصة بالخفافيش، وخاصة الأضداد، قد حدّ من معرفتنا بمناعة الخفاش، في هذا البحث قمنا بدراسة التوصيف الظاهري والوظيفي لمجموعات من الخلايا المناعية، في طحال خفاش الفاكهة *Rousettus aegyptiacus* الذي ينتمي لفصيلة Pteropodidae كما قمنا بدراسة التغيرات في هذه المجموعات كنتيجة لاستجابته المناعية للقاح داء الكَلَب الخامل.

أظهرت الدراسة الكيميائية المناعية في الطحال تلويناً إيجابياً قويًا لواسمات CD3 في مناطق الخلايا التائية (الأغماد اللمفاوية حول الشريان)، وتواجد مجموعة الخلايا التائية CD4+ بشكل انتقائي في منطقة الخلايا التائية في الطحال وفي المنطقة الهامشية في الطحال كما وجدنا تعبيراً واضحاً لمجموعات الخلايا CD20+ في الجريبات والمراكز المنتشة وفي المنطقة الهامشية، وخلال اليوم العاشر بعد الحقن بلقاح داء الكَلَب الخامل تبين حدوث تضاعف للتلوين بـ CD3 وتراكم للخلايا التائية CD4+ بشكل أكبر في مناطق الخلايا التائية وفي الجريبات وزيادة في كثافة التعبير عن CD20 في الجريبات والمراكز المنتشة.

كلمات مفتاحية *Rousettus aegyptiacus*، داء الكَلَب، CD20،CD4،CD3، الطحال.

Phenotypic and functional characterization of major lymphocyte populations in the spleen of *Rousettus aegyptiacus* and their response to inactivated rabies Vaccine

Abstract

The unique ability of bats to serve as reservoirs for highly pathogenic viruses affecting humans suggests distinctive characteristics and functional features of their immune system. However, the lack of bat-specific reagents, particularly antibodies, has limited our understanding of bat immunity. In this study, we examined the phenotypic and functional characterization of immune cell populations in the spleen of the Egyptian fruit bat *Rousettus aegyptiacus* belonging to the Pteropodidae family. Additionally, we investigated changes in these populations as a result of the bat's immune response to inactivated rabies vaccine.

Immunohistochemical analysis of the spleen revealed strong positive staining for CD3 in T-cell regions. The CD4+ T-cell population was selectively present in the T-cell area of the spleen and in the marginal zone. We also observed clear expression of CD20+ cell populations in follicles, germinal centers, and the marginal zone. By the tenth day post-injection with the inactivated rabies vaccine, staining for CD3 had doubled, with a greater accumulation of CD4+ T cells in the T-cell regions and follicles, along with an increased density of CD20 expression in follicles and germinal centers.

Keywords: *Rousettus aegyptiacus*, Rabies, CD20،CD4،CD3،, Spleen.

1. مقدمة:

بالرغم من الأهمية الكبيرة للخفافيش إلا أنها تتميز بسمعة سيئة كونها المستودع الرئيس للعديد من العوامل الممرضة خاصة الحمّات التي تنتقل إلى الإنسان بطرق مباشرة أو غير مباشرة وتسبب له أمراضاً عديدة**[1,2]**.

حيث أن بعض خصائص الخفافيش (اختيارات الطعام، الحياة بشكل مستعمرة أو الانفرادية، وبنية المستعمرات، والقدرة على الطيران، والهجرة الموسمية وأنماط الحركة اليومية، والخمول والسبات، وعمرها، وسلوكيات النوم، وقابليتها للإصابة بالحمّات) تجعلها مضيفات مناسبة للحمّات وغيرها من العوامل المسببة للأمراض **[2]**.

تعد الخفافيش الثدييات الوحيدة الطائرة في العالم **[3]**، وتوجد في كل القارات باستثناء الأجزاء الأكثر برودة والأكثر عزلة من الأرض، بما في ذلك القطب الشمالي والقطب الجنوبي وبعض الجزر المحيطية المعزولة. تشير التقديرات إلى أن هناك من 900 إلى أكثر من 1200 نوع من الخفافيش في العالم تنتمي لـ 18 فصيلة وحوالي 174 جنساً **[4]**، مما يشكل خمس إجمالي عدد الثدييات على الأرض أي في المرتبة الثانية بعد القوارض. ومع ذلك، فإن هذه الأرقام هي مقاييس نسبية أي أنه يمكن أن يكون هناك المزيد من أنواع الخفافيش في العالم. يوجد أكبر عدد من الخفافيش في المناطق الاستوائية، وتعد أمريكا الوسطى والجنوبية موطناً لما يقارب ثلث أنواع الخفافيش في العالم **[4]**.

داء الكلب:

العامل المسبب لداء الكَلَب RABV هو فيروس الكَلَب Rabies virues الذي ينتمي إلى جنس الحمّات الكَلَبيَّة وهو فيروس RNA سلبي السلسلة من جنس Lyssavirus (باليونانية: Lyssa، آلهة الغضب أو الجنون)**[5]**.

ينتمي فيروس داء الكلب إلى عائلة Rhabdoviridae (باليونانية: rhabdos؛ عصية) والتي سميت بهذا الاسم نسبة إلى فيروس rhabdovirus المميز على شكل رصاصة **[6]**. تتألف فيروسات Rhabdovirus، مثل غيرها من فيروسات RNA سلبية السلسلة، من جزيء مستقر ومنظم من RNA الجينومي والبروتين النووي**[7]**.

ينتشر فيروس الكَلَب (RABV) في نطاق واسع من الأثوياء كأحد أهم الحمّات الخبيثة ولديه نسبة إماتة تقترب من 100%، وهي واحدة من أعلى المعدلات لأي مرض معدٍ، على الرغم من أنه يمكن تجنبه عن طريق الوقاية المناسبة قبل وبعد التعرض. تمثّل الكلاب الناقل الرئيسي للمرض، بينما تعد الخفافيش الخزانات الرئيسة لـ 10 من أصل 11 فيروساً من الحمّات الكَلَبية المعروفة بين الخفافيش**[9, 8]**.

تعد فترة حضانة داء الكَلَب الفترة الأكثر تفاوتاً بين الأمراض الفيروسية التي تصيب الجهاز العصبي المركزي، وتبلغ غالباً من شهر إلى شهرين ولكن النطاق الفعلي بين 7 أيام إلى 6 سنوات **[9]**، وتم تسجيل أول حالة من الوفيات البشرية، بسبب داء الكَلَب المنتقل عبر الخفافيش في عام 1951م **[10]**.

المناعة:

تتكون المناعة لدى الثدييات من نوعين رئيسيين، هما المناعة الفطرية والمناعة المكتسبة، اللتان تشتركان مع بعضهما البعض لإحداث استجابة مناعية مثالية ضد مسببات الأمراض. تُوفر المناعة الفطرية دفاعات فورية غير نوعية، بينما تشمل المناعة المكتسبة الخلايا التائية والبائية الخاصة بالمستضد**[11]**. تُعرَض المستضدات المشتقة من مُمْرِضات الجسم بواسطة الخلايا المُقدِّمة للمستضد Antigen presenting cell (APC) ، مثل البلاعم والخلايا التغصنية Dendritic cells (DC)، إلى الخلايا التائية والبائية الخاصة بالمستضد في الأعضاء اللمفاوية الثانوية، مثل العقد اللمفاوية والطحال ومختلف الأنسجة اللمفاوية المرتبطة بالأغشية المخاطية **[12].**

تُفَعَّل الخلايا التائية أو البائية الخاصة بالمستضد، وتتكاثر، وتهاجر إلى موقع العدوى، حيث تهاجم المُمْرِض الغازي من خلال إنتاج الأضداد و/أو القضاء المباشر للخلايا المصابة**[13].**

يمكن تقسيم مجموعة الخلايا التائية المستجيبة إلى مجموعتين فرعيتين، هما الخلايا التائية المساعدة T Helper cells (Th) والخلايا التائية السامة للخلايا Cytotoxic T cells (CTL)، والتي يتم تحديدها من خلال قدرتها على التعبير عن واسمات CD4 وCD8 على سطحها(Cluster of Differentiation)، على التوالي[14]. عند التفعيل، تُنتج الخلايا التائية CD4+ السيتوكينات، وهي ضرورية للمساعدة في مشاركة أنواع أخرى من الخلايا المناعية وتنشيطها. على سبيل المثال، تعد خلايا CD4+ Th ضرورية لتمايز الخلايا البائية إلى الخلايا المنتجة للاضداد (الخلايا البلازمية) وتبديل نمط الأضداد **[15,14].** تُنتج الخلايا التائية CD8+ أيضًا السيتوكينات عند تنشيطها، ولكنها تُطلق أيضًا جزيئاتٍ مُحللة للخلايا والتي يُمكنها حلّ الخلايا المصابة مباشرةً، مما يجعل هذه المجموعة الفرعية من الخلايا

التائية بالغة الأهمية لمكافحة العدوى داخل الخلايا، وخاصةً العدوى الفيروسية. كما تُظهر الخلايا التائية CD8+ نشاطًا مضاداً للأورام**[16,17]**. مُستقبل الخلايا التائية CD3 هو المُركّب الأساسي للمستقبلات على أغشية الخلايا التائية. يُوفر "الإشارة الأولى" التي تُفعّل الخلايا التائية وتُحدد خصوصية الاستجابة المناعية **[17]**.

أما CD4 فهو يشير إلى بروتين موجود على سطح الخلايا التائية المساعدة التي تلعب دوراً أساسياً في تنظيم الاستجابة المناعية، حيث تساعد في مكافحة العدوى من خلال تنشيط الخلايا المناعية الأخرى لتدمير الحمّات والجراثيم **[18]**.

تهاجر الخلايا التائية المساعدة CD4+ بأعداد هائلة عبر الأعضاء اللمفاوية وهذه المعلومات مهمة نظراً لوجود مؤشرات على أن الخلايا التائية CD4+ قد تؤثر على وظيفة البيئات الدقيقة تبعاً لمرحلة نموها. **[18]**.

CD20 هو بروتين أولي موجود على سطح الخلايا البائية حيث تعبر عنه الخلايا البائية الناضجة وبعض الخلايا التائية، ويلعب دوراً في نمو وتمايز الخلايا البائية. في الطحال، يتم التعبير عن CD20 على الخلايا البائية، بما في ذلك خلايا المنطقة الهامشية من الخلايا البائية، وعلى مجموعة فرعية من الخلايا التائية، وتحديداً الموجودة في الغمد اللمفاوي حول الشريان. يلعب CD20 دوراً في نمو الخلايا البائية وتمايزها وتوطينها داخل الطحال. كما يشارك في تنشيط الخلايا البائية واستجابة الأجسام المضادة **[18]**.

تستخدم الكيمياء المناعية كطريقة اختبار مساعدة شائعة الاستخدام في علم الأمراض الجراحي التشريحي لتصنيف الخلايا وتشخيصها، وتستخدم أجساماً مضادة تستهدف

مستضدات معينة في أنسجة وخلايا محددة لتسهيل تحديد نوع الخلية والعضو الأصلي. تُجرى هذه الطريقة عادةً على الأنسجة بعد معاملتها بالبارافين وتثبيتها بالفورمالين، والتي تتميز بسهولة تخزينها **[18,19]**.

الدراسات المناعية على الطحال عند الخفافيش:

يعد الطحال أحد الأعضاء اللمفاوية الثانوية الهامة لدى الخفافيش وله دور رئيس في المناعة الفطرية والمناعة المكتسبة تجاه العوامل الممرضة بما في ذلك الحمّات **[20,21]**.

وجدت إحدى الدراسات **[22]** أن الخفافيش باعتبارها مستودعاً للحمّات لديها مجموعة فريدة من الخلايا اللمفاوية في الطحال والتي تختلف عن الثدييات الأخرى، ويهيمن عليها خلايا CD8+ T بدلاً من خلايا CD4+ T. قد تشير الأعداد الكبيرة من خلايا CD8+ T إلى أن طحال الخفاش في حالة مستقرة دائماً لمكافحة الحمّات والتي تم تأكيدها في هذه الدراسة باستخدام الأضداد المتفاعلة المتصالبة التي بينت التوصيف الظاهري والوظيفي لمجموعات الخلايا التائية والبائية والقاتلة الطبيعية في الخفاش آكل الفاكهة *Pteropus alecto* ، حيث أشارت إلى غلبة الخلايا التائية CD8 + في طحال الخفافيش البرية التي قد تعكس إما وجود الحمّات في هذا العضو أو غلبة هذه المجموعة الفرعية من الخلايا في حالة مستقرة. بدلاً من ذلك، كانت غالبية الخلايا التائية في الدورة الدموية والعقد اللمفاوية ونقي العظم مجموعات فرعية CD4+، وعلاوة على ذلك، فإن العدد المرتفع غير المتوقع للخلايا التائية في نقي العظام لدى الخفافيش قد يشير إلى دور مهم في تطور الخلايا التائية. وأخيراً، أدى التحفيز المولد للانقسام إلى تكاثر وإنتاج جزيئات مؤثرة بواسطة الخلايا المناعية لدى الخفافيش.

دراسة أخرى بينت**[23]** أن وجود تلوين بـ CD8 بنمط شجيري في محيط اللب الأحمر أن محيط الطحال سليم وعلى العكس من ذلك، يمكن استخدام انعدام التلون بـ CD8 لإثبات وجود أورام أو آفات أخرى.

في المقابل، لم تُدرس المناعة التكيفية للخفافيش وأهميتها في السيطرة على العدوى الفيروسية بشكل كافٍ. وقد قدمت عدة دراسات حديثة **[24-27]** عن التسلسل الجيني لثلاثة أنواع مختلفة من الخفافيش دليلاً على أن الجينات المُشاركة في المناعة التكيفية لدى هذه الأنواع تشمل جزيئات (MHC) Major Histocompatibility Comlex، ومستقبلات الخلايا التائية والمستقبلات المُشاركة مثل CD3 وCD4 وCD8 وCD28، بالإضافة إلى واسمات خاصة بالخلايا البائية مثل CD19 وCD22 وCD72 والغلوبولينات المناعية. ومع ذلك، لم يتم تسجيل توصيف جميع الخلايا المناعية للخفافيش، ويعود ذلك على الأرجح إلى نقص الكواشف المُحددة، وخاصة الأضداد. في حين أن إنتاج الأضداد وحيدة النسيلة خاصة بواسمات بروتين الخفاش يمثل النهج الأمثل، إلا أنه مع ذلك يستغرق وقتًا طويلاً ويكلف الكثير. في المقابل، قد توفر الأضداد المتصالبة التفاعلية المُنتجة ضد نفس الأهداف في ثدييات أخرى (وخاصةً الفئران والبشر) بديلاً أرخص وأسرع.

تم في إحدى الدراسات **[22]** تلوين خلايا طحال الخفافيش بالأضداد لـ CD3، وتحديد مجموعات الخلايا اللمفاوية CD4+ وCD8+ بتقنية التدفق الخلوي نظراً لفشل تلوين الأضداد لـ CD4 وCD8، أشارت النتائج إلى أن 34% و25% من خلايا CD3+ كانت CD8 + وCD4 + على التوالي. تشير حقيقة أن هذه النسب المئوية بلغت 60% فقط من إجمالي خلايا CD3+ إلى انخفاض حساسية اختبار Flow-FISH مقارنةً بتلوين الأضداد.

كما أكدت بيانات هذه الدراسة **[22]** وجود نسب مختلفة من الخلايا التائية CD4+ وCD8+، وذلك تبعًا للعضو/النسيج المدروس. ففي الطحال، كانت الخلايا التائية CD8+ هي السائدة على المجموعات الفرعية من الخلايا التائية CD4+. وفي العقد اللمفاوية، لوحظت نسبة مماثلة من الخلايا التائية CD4+ والخلايا التائية التي تمثل نمطًا ظاهرياً لذاكرة CD8. في المقابل، كانت الخلايا التائية المعبرة عن CD4+ تفوق الخلايا التائية CD8+ في الدم. وبالمثل، من المثير للدهشة أن أكثر من 30% من خلايا الدم البيضاء الموجودة في نقي عظم الخفافيش هي خلايا لمفاوية تائية، وهي نسبة أعلى بكثير من تلك الموصوفة في نقي عظم الإنسان والفئران والتي تتراوح بين 4% و8%.

أما دراسة **[28]** فقد أفادت أن الحقن داخل الصفاق (البريتوان) عند الفئران بفيروس التهاب الدماغ الياباني أدى إلى تضاعف الفيروس في الطبقة الداخلية للبريتوان ثم في البالعات الكبيرة الموجودة في الجريبات اللمفاوية للطحال ولاحقاً في خلايا الغمد اللمفاوي المحيط بالشريان، كما لوحظت العدوى في كل من البالعات والخلايا التائية.

كما كشفت الدراسة التشريحية للطحال أثناء الإصابة بالتهاب الدماغ الياباني عن زيادة عدد البالعات الكبيرة بدءاً من اليوم الثالث، وتراكم العدلات ووصلت إلى الحد الأقصى في اليوم التاسع، كما تبين وجود زيادة في حجم المنطقة T بشكل كبير بحلول اليوم التاسع وبدء انخفاض حجمها تدريجياً خلال أسبوع، وفي فترات لاحقة ظهرت مراكز منتشة في المنطقة T المستقلة ثم اختفت الخلايا المحتوية على مستضد الفيروس مع ظهور المناطق المنتشة مما يشير إلى دور هذه الأخيرة أيضاً في إزالة الفيروس **[29]**.

2- هدف البحث وأهميته:

تتبع أهمية البحث من دراسة التركيب والتوصيف الظاهري والوظيفي لمجموعات الخلايا التائية لطحال الخفاش *Rousettus aegyptiacus* الذي ينتمي لفصيلة Pteropodidae ودراسة التغيرات في هذه المجموعات استجابةً للقاح داء الكَلَب الخامل، مما سيشكل إضافة مهمة حول هذا الجواب المناعي، وتحديد قدرة الخفاش المناعية بما يحقق إمكانية الاستفادة من هذه المعلومات وتطبيقاتها على المستويات البيئية والطبية والوقائية.

مواد وطرائق البحث:

تم تقسيم حيوانات التجربة إلى مجموعتين وفق ما يلي:

1- المجموعة الأولى (الشاهد): تشريح العينات مباشرة وإجراء المقاطع المجهرية والتلوين بـ CD3، CD4 و CD20.

2- المجموعة الثانية: حقن العينات (في البريتوان) بـ 100 µl من لقاح الكلب الخامل في اليوم الأساسي (اليوم صفر) وبحقنتين داعمتين في الأيام 3 و7 وتشريح العينات في اليوم العاشر وإجراء المقاطع المجهرية والتلوين بـ CD3، CD4 و CD20.

كما تم إحداث مجموعة شاهد سلبية بحفظ النسيج بالفورمول 30% لتعطيل مستقبلات الأجسام المضادة لهذه الواسمات.

الشكل (1): حقن الخفافيش بلقاح داء الكَلَب الخامل

حيوانات التجربة:

تم اصطياد الخفافيش باستخدام الشِباك، مغارة الدوار–قرية كفر صنيف–صافيتا–محافظة طرطوس، ووضعت في أقفاص بأبعاد 100x75 cm وتم تحديد المتطلبات الغذائية للنوع قبل البدء بالتجربة.

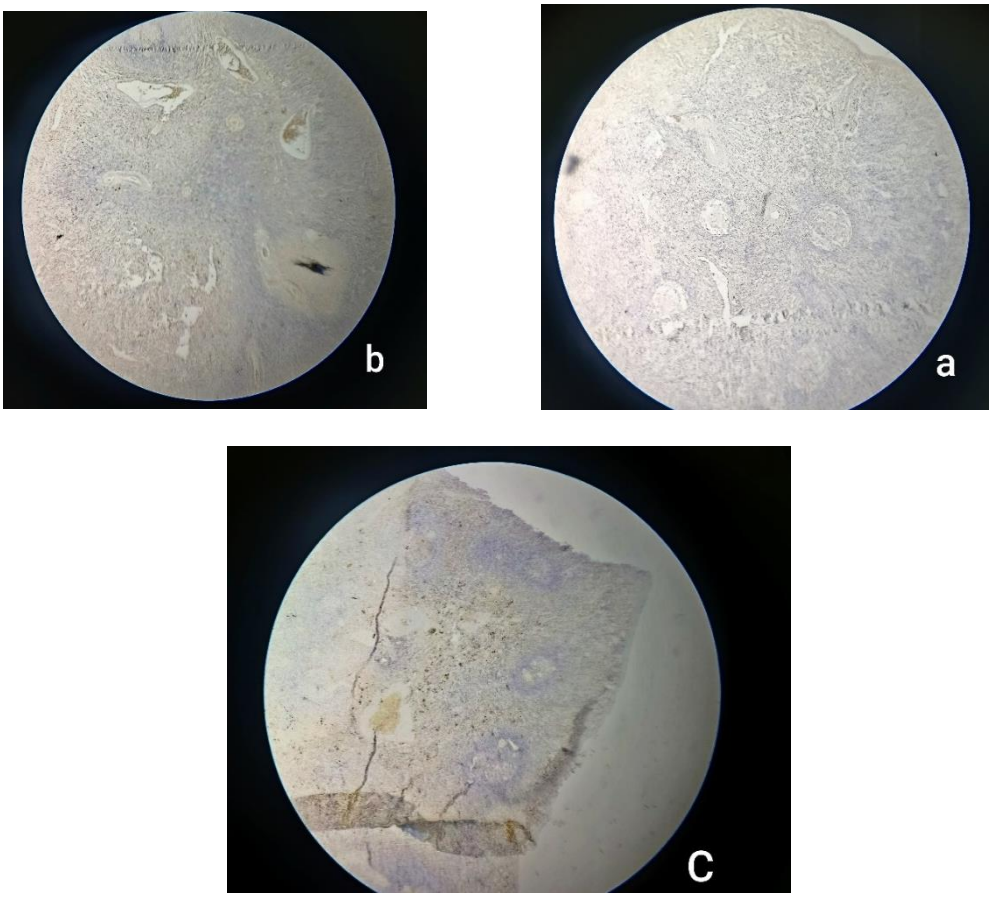
مواد البحث:

تم تخدير الحيوانات باستخدام الكلوروفورم Chloroform، والتشريح وعزل الطحال وحفظه في محلول الفورمول Formalin 5% لمدة 24 ساعة على الأقل قبل الدراسة

النسيجية. اعتُمدت طريقة أبو عاقلة **[30]** في معالجة العينات، ثم تحضير النسج ومعاملتها بالكواشف المناعية حسب تعليمات الشركة المصنعة ودراستها بواسطة المجهر الضوئي Nikon Eclipse Ni.

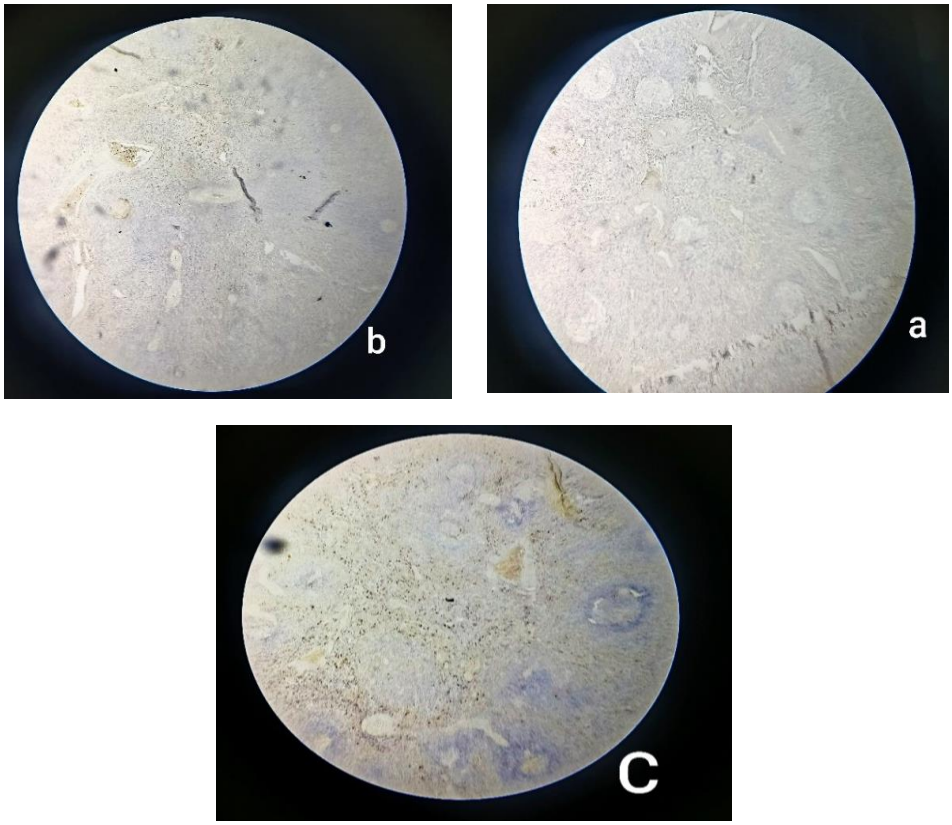
3. النتائج والمناقشة:

تتعرف الأضداد النوعية لـ CD3 على الخلايا التائية من خلال مستقبلاتها في أغشية الخلايا والتفاعلات السيتوبلازمية، بذلك أظهر التلوين المناعي الكيميائي لخلايا CD3+ في الطحال إيجابية قوية في مناطق الخلايا التائية (الأغماد اللمفاوية حول الشريان)، وبالمقارنة مع مجموعة الشاهد السلبي ومجموعة اليوم العاشر بعد الحقن بلقاح داء الكَلَب الخامل تبين تضاعف الإيجابية للتلوين في مجموعة اليوم العاشر الشكل (2) يتوافق التوصيف الظاهري لمجموعات الخلايا التائية مع دراسة Youssef & Salah عام 2019 **[29]** ومع دراسة Mathur عام 1988**[28]** التي أكدت زيادة في حجم المنطقة T بشكل كبير بحلول اليوم التاسع وهذا يؤكد تفعيل تنشيط الخلايا التائية CD3+ ودورها في تفعيل الاستجابة المناعية، وبالمقارنة مع نتائج Gómez عام 2016 **[22]** فيمكن الاعتقاد أن غالبية هذه الخلايا هي CD8+ ولتأكيد ذلك نحتاج إلى إجراء التلوين المناعي بـ CD8 + وCD4+ وحساب النسبة المئوية لكليهما من ضمن المساحة الاجمالية ولكن عدم وجود أضداد خاصة بـ CD8 حال دون إمكانية الجزم.



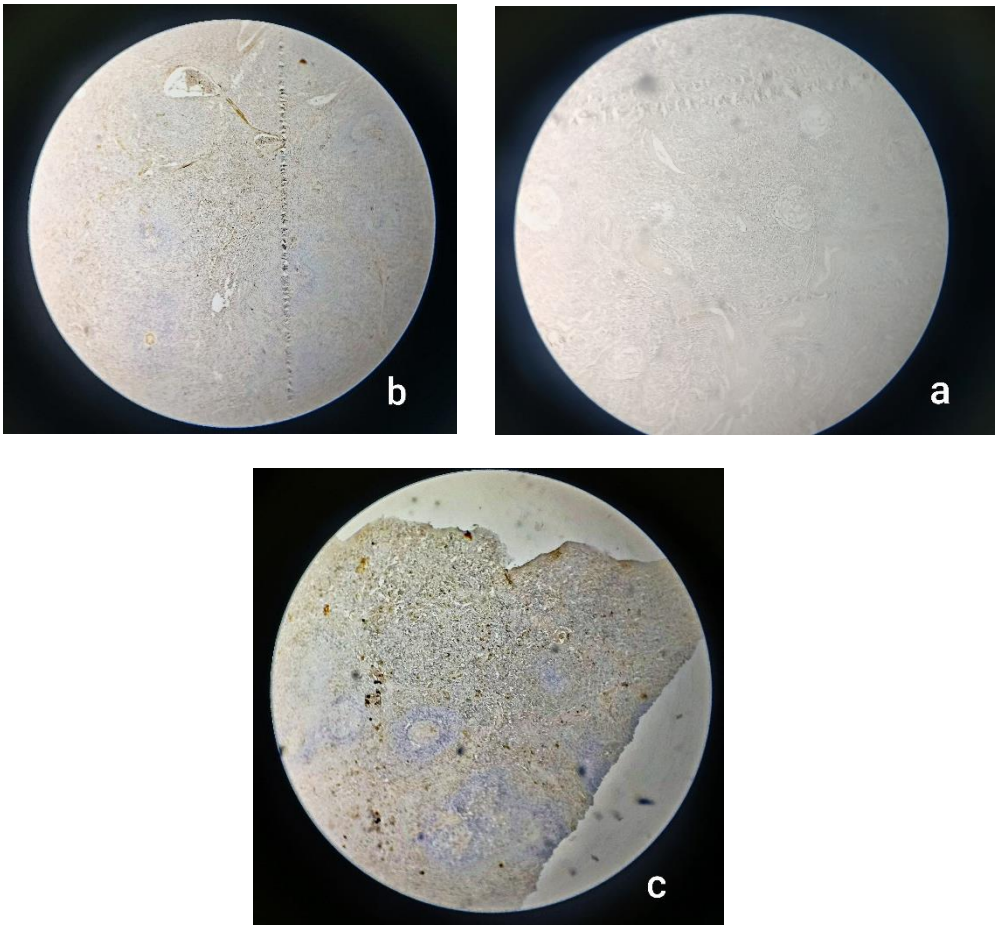
الشكل (2): مقطع عرضي في الطحال يوضح التلوين الكيميائي المناعي بـ CD3 (A: سلبي مستحدث، B: قبل الحقن، C: بعد الحقن) X100

تُظهر نتائجنا تواجد مجموعة الخلايا التائية CD4+ بشكل انتقائي في منطقة الخلايا التائية في الطحال. وبعد الحقن بلقاح داء الكلب الخامل تراكمت الخلايا التائية CD4+ بشكل أكبر في مناطق الخلايا التائية وفي الجريبات مما يؤكد دورها في تحفيز تكوين المراكز المنتشة (GCs) والأضداد الذاتية والتي توافقت مع دراسة Miyakeh (1964) التي بحثت في العدوى بفيروس التهاب الدماغ الياباني عند الفئران **[31]** كما أبدت دراسة Howard عام 1969 نتائج مماثلة عند الفئران الملقحة بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الفينزويلي المضعف (VEE) **[32]** ، كما لاحظنا وجود تلون بـ CD4 في المنطقة الهامشية وهذا يدعم دور هذه الخلايا في تحريض الاستجابة المناعية المكتسبة وهو ما تم تأكيده أيضاً في دراسات Chaturvedi وآخرين عام 1983على فيروس Dengue**[33]**.



الشكل (3): مقطع عرضي في الطحال يوضح التلوين الكيميائي المناعي بـ CD4 (A: سلبي مستحدث، B: قبل الحقن، C: بعد الحقن) X100

وجدنا باستخدام الأجسام المضادة لـ CD20 في الطحال تعبيراً واضحاً لمجموعات الخلايا CD20+ في الجريبات والمراكز المنتشة وفي المنطقة الهامشية، وخلال اليوم العاشر بعد الحقن بلقاح داء الكَلَب الخامل تبين حدوث زيادة في كثافة التعبير عن CD20 في هذه الأماكن مما يدل ويؤكد على نمو وتكاثر ونضج هذه الخلايا البائية ودورها الفعال في الجواب المناعي في الطحال.



الشكل (3): مقطع عرضي في الطحال يوضح التلوين الكيميائي المناعي بـ CD20 (A: سلبي مستحدث، B: قبل الحقن، C: بعد الحقن) X100

4. الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من معطيات البحث ما يلي:

أظهرت الدراسة الكيميائية المناعية في الطحال تلوينا إيجابيًا قوياً لـ CD3 في مناطق الخلايا التائية (الأغماد اللمفاوية حول الشريان)، وتواجد مجموعة الخلايا التائية CD4+ بشكل انتقائي في منطقة الخلايا التائية في الطحال وفي المنطقة الهامشية في الطحال كما وجدنا تعبيراً واضحاً لمجموعات الخلايا CD20 في الجريبات والمراكز المنتشة وفي المنطقة الهامشية، وتبين خلال اليوم العاشر بعد الحقن بلقاح داء الكَلَب الخامل حدوث تضاعف للتلوين بـ CD3 وتراكم للخلايا التائية CD4+ بشكل أكبر في مناطق الخلايا التائية وفي الجريبات وزيادة في كثافة التعبير عن CD20 في الجريبات والمراكز المنتشة.

التوصيات:

نوصي بتوسيع الدراسات الكيميائية المناعية لدى الخفافيش باستخدام أضداد موجهة خاصة لمجموعات الخلايا التائية الفرعية وذلك خلال جميع مراحل التجارب بعد الحقن بالحمّات لتأكيد دور كل من هذه المجموعات الفرعية في المراحل المختلفة.

المراجع:

[1]. إبراهيم، نهلة؛ شلفة، مها، 2008- *التنوع الحيوي لخفاشيات الساحل السوري وحمايتها*، مجلة الساتل العلمية المحكمة، جامعة السابع من أكتوبر، ليبيا، 2 ,(5): 23-34.

[2]. CALISHER CH, CHILDS JE, FIELD HE, HOLMES KV, and SCHOUNTZ T. 2006-*Bats: important reservoir hosts of emerging viruses.* Clinical microbiology reviews. Jul; 19(3):531-45. /https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1539106

[3]. MIDDLETON, N & NICOLAOU, H. (2006). *An Introduction to the bats of Cyprus.* Echoes Ecology Ltd. Scotland. https://batability.co.uk/wp-content/uploads/2017/02/An-Introduction-To-The-Bats-of-Cyprus-Dec06.pdf

[4]. WILSON, D.E. (2020) - Bat. *Encyclopedia Britannica.* Retrieved from: https://www.britannica.com/animal/bat-mammal.

[5]. KUZMIN, I. V., & TORDO, N. (2012) - *Genus Lyssavirus. Rhabdoviruses: molecular taxonomy, evolution, genomics, ecology, host-vector interactions*, cytopathology and control, 37-58. .https://www.caister.com/rhabdoviruses

[6]. WILDY P (1971) - *Classification and nomenclature of viruses. First report of the International Committee on Nomenclature of Viruses*. Monographs in Virology 5: 51 7. https://ictv.global/ictv/proposals/ICTV%201st%20Report.pdf

[7]. DIETZGEN RG. (2012) *Morphology, Genome Organization, Transcription and Replication of Rhabdoviruses In Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, HostVector Interactions*, Cytopathology and Control, ed. pp. 5–12. Norfolk, UK: Caister Academic

Presshttps://onesearch.nihlibrary.ors.nih.gov/discovery/fulldisplay?vid=01 NIH_INST:NIH&docid=alma991000589549704686&context=L

[8]. TURMELLE, A. S., JACKSON, F. R., GREEN, D., MCCRACKEN, G. F., & RUPPRECHT, C. E. (2010)- *Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. Journal of General Virology*, *91*(9), 2360-2366. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3052523/

[9]. HEMACHUDHA, T; LAOTHAMATAS, J; RUPPRECHT, C. E. (2002) - *Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges,* Lancet Neurology, 1(2), 101–109. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12849514/

[10]. DUTTA, J. K., DUTTA, T. K., & DAS, A. K. (1992) - *Human rabies: modes of transmission.* The Journal of the Association of Physicians of India, *40*(5), 322-324. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1483992/

[11]. PARKIN, J., & COHEN, B. (2001)- AN OVERVIEW OF THE IMMUNE SYSTEM. The Lancet, 357(9270), 1777-1789. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11403834/

[12]. BOUSSO, P. (2008) - *T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies.* Nature Reviews Immunology, 8(9), 675-684. https://www.nature.com/articles/nri2379

[13]. BROERE, F., & VAN EDEN, W. (2019)- *T cell subsets and T cell-mediated immunity. In Nijkamp and Parnham's principles of immunopharmacology* (pp. 23-35). Cham: Springer International Publishing. https://www.nature.com/articles/s41392-023-01471-y

[14]. ZHU, J., & PAUL, W. E. (2008)- *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, *112*(5), 1557-1569. /https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18725574

[15]. SWAIN, S. L., BRADLEY, L. M., CROFT, M., TONKONOGY, S., ATKINS, G., WEINBERG, A. D., ... & HUSTON, G. (1991*)- Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development*. Immunological reviews, *123*, 115-144. /https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1684776

[16]. ZHANG, N., & BEVAN, M. J. (2011*)- CD8+ T cells: foot soldiers of the immune system.* Immunity, *35*(2), 161-168. /https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21867926

[17]. VAN LIER, R. A., TEN BERGE, I. J., & GAMADIA, L. E. (2003)- *Human CD8+ T-cell differentiation in response to viruses.* Nature Reviews Immunology, *3*(12), 931-939. /https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC415833

[18]. TAYLOR, C. R. (2014) - *Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice.* Histopathology: Methods and /Protocols, 81-109. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25015143

[19]. COONS, A. H., CREECH, H. J., & JONES, R. N. (1941)- *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.* Proceedings of the society for experimental biology and medicine, 47(2), 200-202. https://scispace.com/papers/immunological-properties-of-an-antibody-containing-a-3zvug7w2iy

[20]. 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. https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00645/full

[21]. 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. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22327291/

[22]. MARTÍNEZ GÓMEZ, J. M., PERIASAMY, P., DUTERTRE, C. A., IRVING, A. T., Ng, J. H. J., CRAMERI, G., ... & ALONSO, S. (2016)- *Phenotypic and functional characterization of the major lymphocyte populations in the fruit-eating bat Pteropus alecto.* Scientific reports, 6(1), 37796. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27883085/

[23]. 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. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917045/

[24]. PAPENFUSS, A. T., BAKER, M. L., FENG, Z. P., TACHEDJIAN, M., CRAMERI, G., COWLED, C., ... & WANG, L. F. (2012)- *The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying fox.* BMC genomics, 13, 1-17. https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-261

[25]. SHAW, T. I., SRIVASTAVA, A., CHOU, W. C., Liu, L., HAWKINSON, A., GLENN, T. C., ... & SCHOUNTZ, T. (2012)- *Transcriptome sequencing and annotation for the Jamaican fruit bat (Artibeus jamaicensis).* PloS one, 7(11), e48472. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048472

[26]. LEE, A. K., KULCSAR, K. A., ELLIOTT, O., KHIABANIAN, H., NAGLE, E. R., JONES, M. E., ... & RABADAN, R. (2015)- *De novo transcriptome reconstruction and annotation of the Egyptian rousette bat.* BMC genomics, 16, 1-11. https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-015-2124-x

[27]. OMATSU, T., NISHIMURA, Y., BAK, E. J., ISHII, Y., TOHYA, Y., KYUWA, S., ... & YOSHIKAWA, Y. (2006)- *Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the bat CD4.* Veterinary immunology and immunopathology, 111(3-4), 309-313. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016524270600002X

[28]. 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. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2013103/

[29]. YOUSSEF, S., & SALAH, M. (2019)- *Differential expression of CD3, TNF-α, and VEGF induced by olanzapine on the spleen of adult male albino rats and the possible protective role of vitamin C.* Biomedicines, *7*(2), 39. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31126077/

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

[31]. MIYAKE, M. (1964)- *The pathology of Japanese encephalitis: A review.* Bulletin of the World Health Organization, 30(2), 153. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2554796/

[32]. HOWARD, R. J., CRAIG, C. P., TREVINO, G. S., DOUGHERTY, S. F., & MERGENHAGEN, S. E. (1969)- *Enhanced humoral immunity in mice infected with attenuated Venezuelan equine encephalitis virus*. The Journal of Immunology, 103(4),699-707. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4186914/

[33]. CHATURVEDI, U. C., NAGAR, R., & MATHUR, A. (1983)- *Effect of dengue virus infection on Fc-receptor functions of mouse*

macrophages. Journal of general virology, 64(11), 2399-2407. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6644274/.