استعمال اختبار المذنب (Comet Assay) للكشف عن الضرر بالـ DNA أثر الاصابة بأوالي الدم في جداء الماعز القبرصي

فراس رشاد السامرائي * نصر نوري الانباري** رياض حمد صنكال العيثاوي**
استاذ مساعد استاذ مدرس
firasrashad@gmail.com nasr_noori@yahoo.com
* فرع الصحة العامة البيطرية–كلية الطب البيطري–جامعة بغداد–العراق
**قسم الثروة الحيوانية–كلية الزراعة–جامعة بغداد– العراق

المستخلص

تم أجراء البحث في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة (20 كم غرب مدينة بغداد)، فضلا عن مركز بحوث التقانات الاحيائية/جامعة النهرين للفترة من 2013/8/1 – 2014/8/1، بهدف تحديد الضرر في الحامض النووي (DNA) اعتمادا على اختبار المذنب (Comet assay) بعد فحص50 من جداء الماعز القبرصي (25 مصابة بأوالي الدم (Blood parasites) و25 سليمة). تبين من نتائج الدراسة الحالية أن تأثير نوع الأوالي في صفات الـ Comet assay عالي المعنوية (P≤0.01)، اذ تفوقت معظم قياسات المذنب لدى الجداء المصابة مقارنة بالسليمة، بأستثناء النسبة المئوية للدنا في الرأس اذ تفوقت الجداء السليمة على نظيراتها المصابة مما يشيرالى انخفاض نسبة الضرر في الـ DNA لدى الجداء السليمة. تبادلت الجداء المصابة وحسب نوع الأوالي الاسبقية في التفوق في ما بينها في معدلات بعض قياسات المذنب وتماثلت في البعض الاخر. يمكن أن نستنتج ان موضوع الاصابة بأوالي الدم يستحق الدراسة والاهتمام لعلاقته بالصفات الاقتصادية، كما أن تطبيق الدراسة على عينة أكبر ولعدة مواسم إنتاجية من شأنه أعطاء نتائج أكثر دقة لتطبيق إستراتيجية الاستبعاد والاستبدال في قطعان تربية الماعز.

الكلمات المفتاحية: الماعز الشامي. الضرر بالدنا. اختبار المذنب. أوالي الدم.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(1): 358-364, 2016 Al-Samarai & et al.

USEING OF COMET ASSAY FOR DETECTION OF THE DAMAGE IN DNA DUE TO THE INFECTION BY BLOOD PARASITES IN CYRUS GOAT KIDS

Firas R. Al-Samarai * Nasr N. Al-Anbari ** Ryad H. AL-Ithawi **
Assist. Prof. Prof. Lecturer

*** Dept. of Veterinary Public Health/ Coll. of Veterinary Medicine/ University of Baghdad/Iraq.**
**** Dept. of Animal Res./ Faculty of Agriculture/University of Baghdad/Iraq.**

ABSTRACT

This study was carried out at the Ruminants Researches Station (20 km west of Baghdad) /State Board for Agriculture Researches / Ministry of Agriculture, and Biotechnology Research Center of AL-Nahrain University during 1/8/213 to 1/8/2014. The aim of this study was to identify the damage in DNA according to comet assay procedure, after testing of 50 infected goat kids with blood parasites. Most of traits affected significantly by infection, as most of traits showed a depression due to infection. The results revealed that the effect of type on the traits of comet assay was significant (P < 0.01) in this research. The infected goat kids were surpassed the corresponding healty goat kids for all measures of comet, whereas, the healty goat kids surpassed the corresponding infected goat kids

Key words: Cyprus goat-Comet assay- DNA damage -Blood DNA damage.

المقدمة

يتميز الماعز عن حيوانات المزرعة في كون متطلبات تغذيته وإدارته بسيطة، فضلاً عن إنجابه للتوائم، وكفاءة التمثيل الغذائي العالية، وبلوغه الجنسي المبكر، وحياته الإنتاجية الطويلة، وكفاءته في استغلال المراعي، وتناوله للأعلاف التي لا تتناولها بقية الحيوانات، ورخص ثمنه نسبة للأغنام إلى جانب تنوع إنتاجه من حليب ولحم وجلود وسماد. تعد الطفيليات ومنها اوالي الدم (Protozoa) ذات تأثير كبير في صحة وإنتاجية حيوانات المزرعة مما يعرقل هذا الجانب الاقتصادي الحيوي للعراق والعالم، وان نسبة الاصابة العالية بأوالي الدم ناتجة في جوهرها عن كون انظمة الادارة والتربية المكثفة وشبه المكثفة تعد البيئة المفضلة والمسؤولة عن انتقال الطفيليات في الماعز (1)، كما ان الحيوانات المصابة والتي تستجيب للعلاج من خلال عدم وجود اعراض سريرية للمرض تبقى حاملة للإصابة بشكل كامن ولمدة غير محددة (2 و 3). ان الانتخاب لمقاومة الطفيليات التي تصيب الماعز ومنها أوالي الدم له اهمية كبيرة في مجال تطوير انتاج الماعز وحيوانات المزرعة عموما، اذ ان الطفيليات المتمثلة بالثايليريا والبابيزيا والانبلازما وغيرها تعد احدى اكبر المشاكل التي تعرقل تطور الانتاج الحيواني في الدول النامية (4) كما انها قد تسبب ضررا للدنا فضلا عن الاضرار التي تسببها لخلايا الدم بشكل عام، مما قد يؤدي الى حصول تدهور كبير في اداء الحيوان. تعد طريقة اختبار المذنب (Comet assay) من الطرق المهمة للاستدلال على الضرر الحاصل في المادة الوراثية (DNA damage) في خلايا الكائنات حقيقية النواة علاوة على كونها طريقة اختبار للسمية الجينية (Genotoxicity test) وهي طريقة بسيطة ودقيقة لقياس التحطم الحاصل في الشريط المزدوج للمادة الوراثية (5). ونظرا لندرة الدراسات المنفذة بهذا الخصوص في العراق، لذا كان الهدف من البحث هو التحري عن الضرر في الـ DNA لدى جداء الماعزالقبرصي المصابة بأوالي الدم مقارنة بالسليمة باستعمال اختبار المذنب.**المواد وطرائق العمل.** نفذت الدراسة في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية – وزارة الزراعة، للفترة من 2013/8/1 – 2014/8/1، على عينة مكونة من 50 معزة قبرصي(25 مصابة بأوالي الدم (Blood parasites) و25 سليمة). وبعمر حوالي 4 أشهر لدراسة الطفيليات الداخلية والضررالناجم عنها في المادة الوراثية بأستعمال اختبار المذنب (Commet assay).تم تحضير المسحة الدمية بعد اخذ عينة من دم الجداء (عينة من الوريد الوداجي 3 مل وحفظت في انبوبة جمع مضاف لها مانع تخثر من نوع K2 EDTA لعمل المسحات واختبارات اخرى) بعد ذلك اخذت قطرة من الدم باستخدام ساق زجاجي دقيق ثم وضعت على حافة الشريحة الزجاجية ووضعت فوق شريحة اخرى نظيفة وفرشت بوساطة تحريك الشريحة الاولى على الثانية حتى نهايتها ثم تركت لتجف وتم تثبيتها بالكحول المثيلي لمدة 3 دقائق وصبغت بصبغة الكمزا ذات التركيز 10% لمدة نصف ساعة ثم غسلت بالماء المقطر وفحصت تحت المجهر بالعدسة الزيتية 100X (6).**اختبار المذنب Comet assay**: يستخدم هذا الاختبار لقياس مقدار الضرر في الـ DNA.استخدمت العدة oxiselect comet assay (KIT) Kit لاجراء هذا الاختبار (7) كمااستخدم برنامج محوسب (Softwear) لاجراء قياسات مختلفة لكل عينة. **تحضير الكواشف Reagent preparation**. يجب ان تكون الكواشف المستخدمة المحضرة عليها علامات تميزها عن غيرها ويتم اعدادها قبل الاستخدام مباشرة، ويتوجب ارتداء قفازات وبدلات المختبر عند حمل اي مادة كاشفة.1XPBS: مزج 10XPBS مع الماء الايوني لتجهيز هذا المركب 1XPBS وحفظت في درجة حرارة الغرفة 10XPBS مجهز من شركة Trervigen).

1.Lysis solution (محلول التحلل): لتجهيز اكثر من عشرة شرائح زجاجية (slides)(نموذجين في كل شريحه).

أ- محلول تحليل الخلايا Lysis solution (40 ml).

ب- DMSO (اختياري) 4 مل. تم تبريد على درجة 4 درجة مئوية او في الثلج لمدة 20 دقيقة على الاقل قبل الاستخدام، اما اضافة DMSO فتكون اختيارية وهي فقط في حالة الخلايا الحاوية على مادة الحديد (heme) (كالدم او الانسجه).

3-هلام المذنب (Comet LMAgarose): يحضر الهلام الخاص بالفحص وهو يكون صالح للاستخدام مرة واحدة عند اذابته ويتم اذابة هذا الهلام بوضع العلبة في حمام مائي من 90-100 درجة مئوية لمدة خمس دقائق او حتى ذوبان

الهلام مع ازالة غطاء العلبة من اجل السماح للهلام بالتمدد نتيجة الحرارة بعد ذلك تم وضع الهلام في حمام مائي 37 درجة مئوية لخفض درجة حرارته وحفظ على هذه الدرجة لحين اتمام تحضير العينة.

4-محلول التصبيغ (SYBER® green staining solution): ان الكمية المذابة المخزونة من هذه المادة تبقى صالحة للاستخدام لعدة اسابيع إذا ما خزنت على درجة 4 درجة مئوية في الظلام.

أ- 10000XSYPER Green مع 1µlDMSO

ب- المحلول المنظم TE pH 7.5.

5-محلول منع التلاشي (اختياري): يحضر في حالة حدوث تلاشي(اختفاء) في العينات،نمزج 500 ملغم mlPhenulenedi aminedihydro chloride مع 1X PBS 4.5ملغم حتى الذوبان في انبوبة بحجم 10مل.

6-محلول فك الالتفاف تحلزن القاعدي (Alkaline unwinding solution pH > 13)

عند تحضير هذا المحلول يتوجب الحذر وارتداء القفازات. في كل50 مل من هذا المحلول يوجد 0.4NaOH غم (حبيبات) و 250 مايكروغرام mMEDTA و200 ملغم dH_2O يحرك حتى اتمام عملية الذوبان. ترتفع درجة حرارة المحلول عند التحضير لذلك يترك حتى يكون بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستخدام.

7-تحضير محلول الترحيل الكهربائي القاعدي لاختبار المذنب (نظام ES).ولتحضير 1 لتر من محلول الترحيل الكهربائي 8 NaOH غرام مسحوق 2 مل 500 mM EDTA pH 8 ، dH_2O.(بعد ذوبان NaOH تضاف الى 11) وبعد ذلك يحفظ في التبريد 4 درجة مئوية. **بروتوكول الاختبار Assay protocol** ان ظروف الترحيل الكهربائي هي من يحدد حساسية الاختبار، لذا فإن اختبار المذنب العادي سوف يحدد التحطم في السلسلة المزدوجة للـDNA، اما اختبار المذنب القاعدي فإنه سيحدد التحطم في السلاسل المزدوجه او المفرده وكذلك غالبية المواقع في القواعد والمركبات الاخرى في DNA مثل(Phosphoglycols , Phosphotriesters).اختبار المذنب القاعدي Alkaline Comet Assay : 1

1-تحضير محلول التحلل ويبرد على درجة 4 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة قبل الاستخدام.

2- اذابة الهلام في بيكر بالماء الغلي لمدة 5 دقائق وبعد ذلك يوضع في حمام مائي على درجة 37 درجة مئوية قبل 20 دقيقة من العمل (قد تكون درجة الهلام حرجة او قد تصاب الخلايا بصمة الحرارة).

3- مزجت الخلايا بتركيز $1 * 10^5$ /ml مع الهلام الذائب في درجة حرارة 37 درجة مئوية وبنسبة 1:10 (حجم/حجم) وسحبت مباشرة بالماصة(pipette) الى شريحة المذنب واذا كان من الضروري نستخدم المساحة الجانبية للفوهة البلاستيكية للماصة لنشر الهلام والخلايا فوق مساحة العينة في الشريحة للتأكد من تغطية كافة مساحة العينة واذا لم تتوزع بشكل متساوي ندفئ الشريحة بدرجة 37 درجة مئوية قبل اكمال التطبيق.

4- في حالة العمل مع عدة عينات يجب تقسيم الهلام في قناني او انابيب مدفأة 37 درجة مئوية وأضافة الخلايا وتمزج بلطف بطريقة التقليب ونشر 50 µl في مساحة العينة. توضع العينات على سطح مستوي ومظلم وعند درجة 4 م (في الثلاجة) لمدة 10 دقائق،اذ ستظهر حلقة واضحة بقطر 0.5mm في حافة المساحة المحددة للعينة، ان زيادة وقت التبلور الى 30 دقيقة يزيد من التصاق العينات في حالة الرطوبه العاليه.

5- غمرت العينات في محلول التحلل بدرجة 4 درجة مئوية لمدة 30 - 60 دقيقة، ولغرض زيادة حساسية الاختبار يمكن استمرار مدة الحضن بنفس الدرجة لمدة 12 ساعة.

6- يجب ازالة المحلول الزائد من العينة وغمره بمحلول منع الالتفاف القاعدي على ان يحضر قبل الاستخدام مباشرة.

7- يستمر الغمر بالمحلول السابق لمدة 20دقيقة في درجة حرارة الغرفة او لمدة ساعة واحدة في درجة 4 درجة مئوية وفي الظلام.

8- لاجراء اختبار المذنب (Comet Assay)ES-unit يضاف 850 مل بدرجة 4 درجة مئوية من محلول الترحيل الكهربائي القاعدي، ثم ينقل النموذج الى الترحيل الكهربائي ويغطى بالغطاء الخاص مع ضبط الجهاز على 21 فولت لمدة 30 دقيقة.

9- يزال محلول الترحيل الكهربائي الزائد بلطف وتغمر العينة بـ dH_2O لمدة خمس دقائق وتكرر العملية مرتين ثم يغمر في محلول كحولي 70% لمدة خمس دقائق.

10-يجفف النموذج في درجة 37 درجة مئوية لمدة 10-15 دقيقة، ويعمل التجفيف على جعل الخلايا في مستوى واحد مما يسهل عملة مراقبتها، ثم تخزن النماذج في درجة حرارة الغرفة مع التجفيف المسبق لاجراء القياسات في هذه المرحلة.

11- وضع 100 مل من صبغة SYBR Green في كل دائرة من الاكروز الجاف ولمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في الظلام، ثم يرفع النموذج برفق لأزالة الصبغة الزائدة ويشطف بالماء لمدة قليلة ثم يسمح للنموذج ان يجف بشكل كامل في درجة 37 درجة مئوية.

12- يوضع النموذج في المجهر الومضي (Fluorescence). اذ يكون مرشح الوميض كاف لاجراء الاختبار.كما يمكن اجراء خمسين قياس مختلف في هذا الاختبار، وتقاس من النسبة L/W دليل المذنب وان المدى 1.2-2.0 يشير إلى ان مستوى الضرر قليل LD low (DNA damage) ، 2.1-3.0 يعتبر متوسط (MD) واكثر من 3 يعد عالي (HD) (8 و 9).تم تحليل البيانات احصائيا باستعمال البرنامج Statistical Analysis SAS– System (10) واعتماد النموذج الرياضي ادناه :

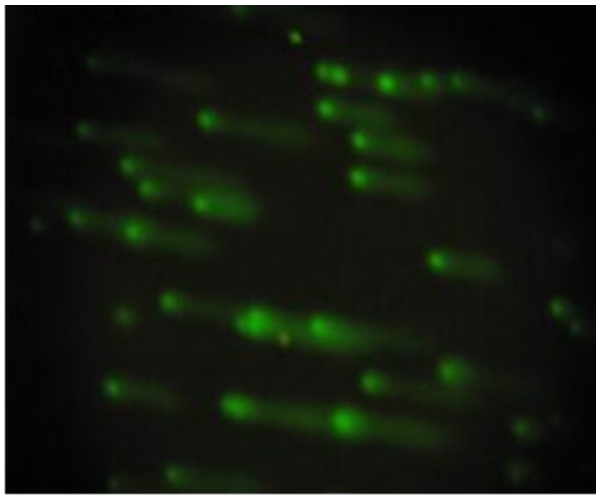
$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + P_j + S_k + T_l + e_{ijklm}$$

Gi: الاصابة بالطفيليات الداخلية ،أما باقي الرموز في هذا الانموذج فهي للتعديل لتأثير تسلسل الولادة (P_j) و الموسم (S_k) و نوع الولادة (T_l). وتم اختبار الاختلافات بين المتوسطات باستعمال اختبار دانكن.

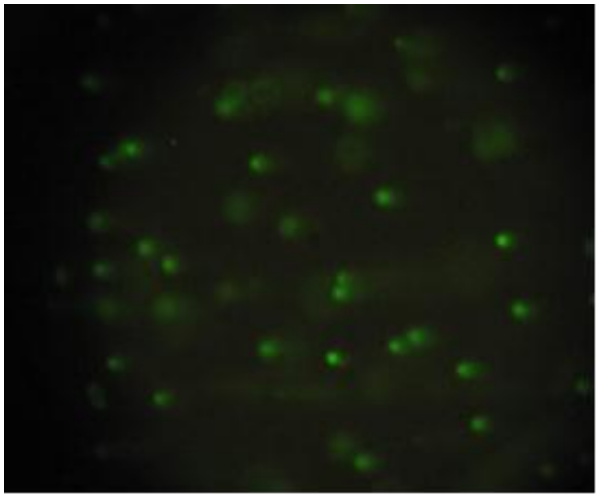
النتائج والمناقشة

تأثير نوع الطفيلي الداخلي في صفات الـ Comet assay.

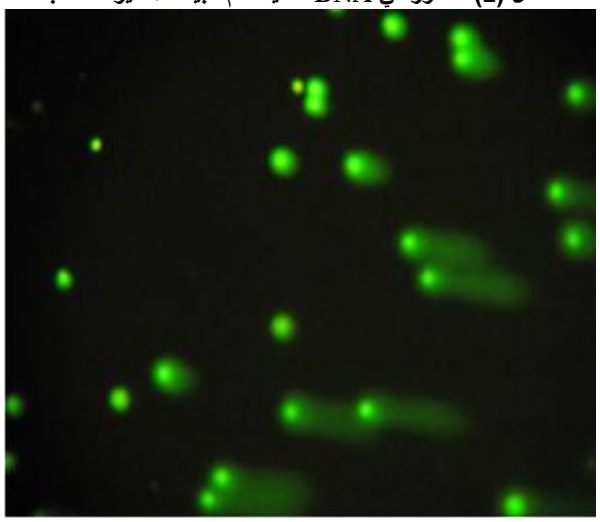
تم تحديد مستوى الضرر في الـDNA في الجداء السليمة والمصابة بالطفيليات الدمية باستخدام اختبار المذنب وتم حساب قياسات المذنب باستخدام برنامج محوسب ولجميع صفات Comet assay المدروسة.كان التفوق أما للإصابة بالطفيلي نوع Thailaria (الشكل 4) أولا والطفيلي Anaplasma(الشكل1)أو Babesi(الشكل 3) ثانيا بالمقارنة مع مجموعة السيطرة(الشكل 2). ويمكن مناقشة هذه الفروق المعنوية في نسبة الاصابة بالضرر في الـDNA بالتوازي مع الاصابة بالطفيليات الدمية بالشكل الاتية.



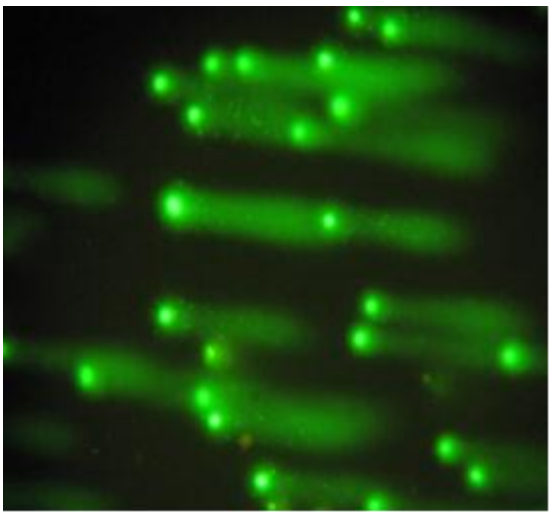
الشكل(1) الضرر في DNA خلايا الدم البيضاء نتيجة الاصابة بطفيلي الانابلازما



الشكل (2) الضرر في DNA خلايا الدم البيضاء غير المصابة



الشكل (3) الضرر في DNA خلايا الدم البيضاء نتيجة الاصابة بطفيلي البابيزيا



الشكل (4) الضرر في DNA خلايا الدم البيضاء نتيجة الاصابة بطفيلي الثايليريا

أ–نوع الطفيلي ومستوى المعنوية في نسبة الضرر في الـDNA بالاعتماد على نوع القياسات في اختبار المذنب:

تبين من النتائج ان الجداء المصابة (الآنابلازما والثايليريا والبابيزيا) قد تفوقت على نظيراتها السليمة في جميع قياسات المذنب باستثناء نسبة الـDNA في الرأس (الجدول 1)، إذ تفوقت الجداء السليمة على نظيراتها المصابة مما يشير الى ضئالة نسبة الضرر في الـ DNA في الحيوانات السليمة مقارنة بالمصابة. وقد تبادلت الجداء المصابة وحسب نوع الطفيلي الاسبقية في التفوق في ما بينها في بعض القياسات فيما كان تأثير الاصابة متماثلا في البعض الآخر من القياسات.

1–طول المذنب: تفوقت الثايليريا بشكل عالي المعنوية ($P<0.01$) على الانابلازما وتشابه تأثيرها مع البابيزيا.

2– ارتفاع المذنب: جاءت كل انواع الطفيليات متماثلة في تأثيرها.

3–مساحة المذنب: كانت الجداء المصابة بالثايلريا والبابيزيا متماثلة في تأثرها ومتقدمة على الانابلازما.

4–كثافة المذنب: كانت الاصابة بالثايلريا ذات اعلى تأثيرمقارنة مع الجداء المصابة بالانابلازما فيما كان الاختلافات غير معنوية بين الجداء المصابة بالبابيزيا.

5 –قطر الراس: كل تأثير الطفيليات متماثلا في جميع الجداء.

6–مساحة الرأس: وجد ان تأثير كل من الثايلريا والبابيزيا كان متقاربا فيما كان تأثير الانابلازما اقل من كليهما.

7– كثافة الراس:كان التأثير مقاربا لما كان موجودا في مساحة الرأس.

8– النسبة المئوية للـ DNA في الرأس: تفوقت الجداء السليمة على نظيراتها المصابة وبكل انواع الطفيليات الدمية المدروسة.

9–طول الذنب: التأثير كان متماثلا للإصابة بالثايليريا والبابيزيا ومن ثم الانابلازما في المرتبة الثانية.

10– مساحة الذنب: في هذا القياس كان التفوق للانابلازما ثم تأتي كل من الثايليريا والبابيزيا في المرتبة الثانية.

11– كثافة الذنب: الاسبقية كانت للثايليريا والبابيزيا ومن ثم للانابلازما.

12–النسبة المئوية للـDNA في الذيل:كان التأثير متشابه لكل انواع الطفيليات الدمية المدروسة.

13–قوة او وزن الذنب:الاسبقية للثايليريا ولم تكن هناك فروق معنوية بينها وبين البابيزيا وقد اتت الانابلازما في المرتبة الثانية فيما كانت منخفضة في مجموعة السيطرة.

14– قوة او وزن الذنب حسب طريق Olive : كان التأثير متشابه لكل انواع الطفيليات الدمية المدروسة. اذ تفوقت عن الجداء السايمة. تعد القياسات الثلاث الاخيرة للمذنب(النسبة المؤوية للـ DNA في الذنب، قوة او وزن الذنب، قوة او وزن الذنب حسب طريق Olive) هي الاهم والأكثر شيوعا في المقارنة وتقدير شدة الضرر في الـDNA (11). وحسب هذه القياسات فقد كان التأثير متماثل في نسبة الضرر في الـDNA للأنواع الثلاثة من الطفيليات، باستثناء طريقة قوة او وزن المذنب فقد كانت الاسبقية فيها للإصابة بالثايليريا. اما بالاعتماد على القياسات الاخرى فقد كان نسبة الضرر متماثلة تقريبا للإصابة بالثايلريا والبابيزيا على الاصابة بالانبلازما.

ب –ميكانيكية حدوث الضرر في الـ DNA نتيجة الاصابة بالطفيليات الدمية. من خلال الدمج بين نتائج الدراسة الحالية لمستوى الضرر الحاصل في DNA نتيجة الاصابة بالطفيليلت الدمية والبحوث الحديثة في مجال الوراثة الجزيئية والكيمياء الخلوية(الحيوية) يمكن ترجيح ثلاث عوامل كانت قد تضافرت في ما بينها في احداث هذا المستوى العالي من الضرر وهي كالأتي:

1-المواد الكيميائية المستخدمة في الوقاية والعلاج من الإصابة بالطفيليات الدمية.

2-الاستراتيجية الدفاعية لخلايا الجسم ضد الطفيليات الدمية.

3-تأثير الطفيلي والسموم المفروزة على الخلايا المصابة. ان استخدام الادوية والمبيدات للوقاية والعلاج من الطفيليات يسبب نسبة محددة من الضرر في الـDNA، فقد ذكر Milena وزملاؤه (12) ان مبيد Amitraz المستخدم ضد القراد(الوسط الناقل للطفيليات الدمية) قد اظهر تأثيرا معنويا في نسبة الضرر في الـDNA في الخلايا اللمفاوية المعزولة من الانسان وان لهذا المبيد تأثير سمي جيني(Genotoxic) وقد اتفق ذلك ايضا مع Stanimirovic وزملاؤه (13 و 14) الذي ذكر بان المبيدات تسبب اجهاد الاكسدة من خلال انتاج انواع من الاوكسجين والنتروجين التفاعلي او مايعرف بالجذور الحرة(Free radical) الذي يعمل على اكسدة الدهون وتكسير الـDNA. ان ماسبق يفسر اصابة الجداء السليمة بنسبة من الضرر في الـDNA ويفسر جزئيا الضرر الحاصل وبصورة عالية المعنوية في الجداء المصابة بالطفيليات الدمية وتفوقها على الجداء السليمة. اما العامل الثاني المسبب للضرر في الـDNA فهو الاستراتيجية الدفاعية لخلايا الجسم ضد الطفيليات، إذ لوحظ ان هناك انواع من الخلايا الدفاعية (Neutrophils وMacrophagas) تفعّل بوساطة الانزيمات المؤكسدة المتولدة لقتل الطفيليات داخل وخارج الخلية (15) بوساطة النترتة والاكسدة والكلورة وزيادة دور أنواع الاوكسجين والنيتروجين التفاعلية (جذور الاوكسجين والنتروجين الحرة) التي تنتج اساسا لقتل وتحطيم خلايا الطفيليات لكن الكمية الزائدة منها تسبب قتل وتضرر العديد من خلايا المضيف (16) وهذا بدوره يعمل بالنتيجة على زيادة الضرر في ال-DNA وقد جاء ذلك متفقا مع ماتوصل اليه Ismail وزملاؤه (17) من ارتفاع معنوي في الضرر في الـDNA في الماعز المصاب بالبابيزيا، اذ ربط بين هذا الضرر وارتفاع نواتج اكسدة النتريك في بلازما الدم وانخفاض نشاط مضادات الاكسدة وانخفاض في المرافق الانزيمي المضاد للاكسدة (Glutathione)، كما قد أشر هذا النشاط والزيادة في اجهاد التأكسد وانخفاض في مضادات الاكسدة عند الاصابة بالثايلريا والانابلازما، اما العامل الثالث المسبب الضرر في الـ DNA فهو التأثير المباشر للطفيلي فقد لوحظ في دراسة على طفيلي الثاليريا انها تحدث تأثيرا مباشرا على الخلايا يحولها الى خلايا تشبه الخلايا السرطانية او ما يعرف بتأثير Warburng ويلخص بان الخلايا المصابة تظهر تخمر الكلوكوز وتفرز لاكتيك بدلا من التنفس الكامل حتى بوجود الكمية الكافية من الاوكسجين، كما لوحظ زوال او انخفاض هذه التأثيرات عند القضاء على الطفيلي (18).

جدول 1. تأثير نوع الطفيلي الداخلي في الماعز على صفات الـ Comet assay.

صفات الـ	نوع الطفيلي (المتوسط ± الخطأ القياسي) (Millimicron)				P
Comet assay	Control	Anaplasma	Thailaria	Babesi (B)	
Comet length	c 10.14 ± 185.33	b 16.21 ± 492.08	a 29.48 ± 673.22	ab 36.77 ± 581.38	**
Comet height	b 4.46 ± 129.02	a 5.49 ± 183.58	a 9.31 ± 193.71	a11.48 ± 176.52	**
Comet area	2947.18 ± 26583.25 c	3125.49 ± 95683.91 b	7835.33 ± 147893.84 a	a9726.79 ± 156372.61	**
Comet intensity	± 1348263.09 c 103573.27	± 2174958.75 b 280968.56	± 4389552.19 a 422904.36	87735.80± 3583922.21 ab	**
Head diameter	b 8.46 ± 109.26	a 7.42 ± 175.62	a 15.26 ± 194.41	a13.66 ± 168.92	**
Head area	1674.39 ± 26794.02 c	5931.25 ± 94372.57 b	± 152589.51 a 12483.75	15774.06 ± 141697.88 a	**
Head intensity	± 1187488.19 c 76329.75	± 1998473.63 b 23486.07	± 4937261.73 a 431904.27	82215.07± 4358823.94 a	**
% DNA in Head	a 2.04 ± 85.46	b 1.41 ± 69.61	b 3.54 ± 66.05	ab1.72 ± 73.85	**
Tail length	c 7.64 ± 58.35	b 15.52 ± 378.61	b 25.09 ± 382.41	a69.86 ± 511.73	**
Tail area	c 0.08 ± 3.72	a 16.81 ± 51.37	b 7.54 ± 19.31	b1.36 ± 17.42	**
Tail intensity	3955.7 ± 109374.62 c	8946.52 ± 549826.91 b	± 1094737.59 a 7556.27	6941.61 ± 1362589.07 a	**
% DNA in Tail	b 0.75 ± 6.23	a 1.04 ± 17.05	a 1.79 ± 18.74	a 1.62 ± 20.66	**
Tail in moment	d 1.64 ± 4.51	c 2.03 ± 49.69	a 5.58 ± 86.84	b 9.07 ± 71.91	**
Olive moment	c 0.71 ± 7.64	b 2.75 ± 35.17	a 6.79 ± 47.15	ab 5.33 ± 41.76	**

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

**** (P≤0.01).**

REFERENCES

1.Masake, R. and A. Muoke. 2000 .Blood parasitic diseases and specific immune responses. (ILRI),P.O.Box 30709, Naivobi, Kenya.

2.Radostits, M., D.C. Blood, and C.C.Gay. 2004. Veterinary Medicine A text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses,7th ed., Bailliers Tindall.

3.Johnston, L.A.Y. and L. Tammemagi. 1969. Bovine babesiosis: duration of latent infection and immunity to babesia argentina. Aust.Vet.J.,45P:445-449.

4.Gautam, O.P., Sharma,R.D. and Singh,B. 1970. Anaplasmosis: Clinical cases of anaplasmosis in cattle, buffaloes and sheep. Ind.Vet. J. 47, P: 1012-1019.

5.Peggy, L O. and P.B. Judit. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nature Publishing Group.http://www.nature.com/natureprotocol.

6.Aktas, M., K. Altay, and N. Dumanll. 2006. Determination of prevalence and risk factors for infection with B *abesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. Parasitology Research. 100:797-802.

7.De Boeck, M., N. Touil, G. De Visscher, P.A. Vande, and M. Kirsch–Volders. 2000. Validation and implementation of an internal standard in comet assay. Mutat. Res.469: 181-197.

8.Collins, A.R., V. Harrington, J. Drew, and R. Melvin. 2003. Nutritional Modulation of DNA repairs in ahuman Intervention Study. Carcinogenesis.24:511-515.

9.AL-Jewari, H. S. J. 2010. In vitro cytotoxic Activity of the pathogenic Escherichia Coliagainst for leukemic cell lines. A Ph.D. Thesis In Genetic Engineering Biotechnology for post Graduate studies ,University of Baghdad , Iraq.

10.SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.11-Oxiselect™ comet kit.2012. Product Manual .cell BioABS, INC.

12. Radakovic, M., J. Stevanvic, N. Djelic, N. Lakic, J. Knezevic-Vukcevic, B. Vukovic-Gacic, and Z. Stanimrovic. 2013. Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the comet assay. Indian Academy of Sciences. 38: 53–62.

13.Stanimirovic Z., J. Stevanovic, M. Kulic, and V. Stojic. 2006. Frequency of chromosomal aberrations in evaluation of genotoxic potential of dicyclohexylamine (fumagillin). In Vivo Acta Vet.-Beograd 56 353–366.

14.Stanimirovic Z, I. Pejin, Z. Kulisic, and M. Djiporovic. 2007. Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by sister chromatide exchange and chromosomal aberration tests in human cell cultures. Acta Vet.-Beograd 57 257–273.

15.Kocyigit, A., H. Keles, S. Selek , S. Guzel, H. Celik, O. Erel. 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. Mutat Res; 585: 71-8.

16.Ince, S., E. Kozan, I. Küçükkurt , E. Bacak. 2010. The effect of levamisole and levamisole + vitamin C on oxidative damage in rats naturally infected with *Syphacia muris*. Exp Parasitol. 124: 448-52.

17. Kucukkrt, I., I.H. Cigerci, S. Ince, E. Kozan, I. Aytekin, A. Eryavuz, A. F. Fidan .2014.The Effects of Babesiosis on Oxidative Stress and DNA Damage in Anatolian Black Goats Naturally Infected with Babesia ovis, Iranian J Parasitol: Vol. 9, No. 1, , pp.90-98.

18.Omnia M. A. H., M.E.I. Radwan and A.F.Ali.2014. Biochemical Changes Associated with Anaplasma Infection in Cattle Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 9: 19−23.