تطوير مبتكر جديد لتقنية الأنابيب الزجاجية المصممة مسبقاً عام 1998 لتنضيج وإخصاب البويضات خارج الجسم: تقدير فسيولوجي نسيجي لبويضات بعض الكائنات الحية في الزجاج

الدكتور عبد الصمد عليوي حسن

دكتوراه علوم – فسيولوجيا الأنسجة والأجنة

قسم التشريح والأنسجة جامعة القادسية / العراق

الخلاصة:

تتضمن الدراسة الحالية متابعة للحالة الفسيولوجية والتركيبة النسيجية لبويضات عدد من الكائنات الحية المنماة في الزجاج وذلك باستخدام تقنية الأنابيب الزجاجية التي سبق وان صممت لهذا الغرض في عام 1998 ولكن مع إدخال تطوير مبتكر على هذه التقنية يتضمن زيادة المساحة السطحية من أجل زيادة المطروح المتوقع من تركيز الغاز اللازم لإنماء هذه البويضات. وقد أظهرت النتائج أن نسبة الغاز اللازم للنمو والمطروح بواسطة هذا الابتكار زاد بمقدار (30 %) عن المقدار المطروح باستخدام التقنية المصممة مسبقاً. أما بالنسبة لعملية التنضيج المجراة في التجربة الحالية حتى ظهور الطور الاستوائي الثاني في بعض الحيوانات المختبرية واللبائن فبلغت نسبتها في الفئران والجرذان والقطط (80 %) وفي الأبقار (63 %) وفي الجمال (60 %). أما هذه النسب في الطفيليات وحتى مرحلة التجزؤ الخلوي الداخلي فبلغت (12.5 %) لمثقبات حلزون الكبد، (13.5 %) في الشريطية محفورة الورقتين، (– 25 18 %) في الديدان الشريطية العقلية، (21 %) للاسطوانيات، (25 %) لدودتي الصفر والورقية (كلوبيولس)، و(35 %) للديدان الخيطية آخذاً بنظر الاعتبار أن الفرق الإحصائي كان غير معنوياً في جميع الحالات (P > 0.16). يستنتج ان هذا التطوير الجديد قد ساهم في تنضيج البويضات لبعض الكائنات الحية بما أعطى نتائج مضاهية للطريقة السابقة أو الطريقة الاعتيادية ذات الحاضنة بأطباق بلاستيكية.

المقدمـــة:

لعبت تقنيات الاستنبات والتخصيب في الزجاج منذ اكتشافها دوراً أساسياً في مسيرة العلم بصورة عامة وخاصة عندما طبقت على معظم الكائنات الحية بما فتح الباب واسعاً أمام تطبيقات كافة الاختصاصات العلمية والطبية والرياضية وما إليها (31). وقد أجريت حتى الآن محاولات مكثفة لإنماء بويضات أنواع عديدة من الحيوانات والطفيليات بدءاً بالأرانب بواسطة Chang (1959) (5) ومروراً بالفأر والجرذ والقط والخنازير والأبقار (9,17,15,33,35) وانتهاءً بالإنسان مضافاً إليه الإبل في الفترة الأخيرة (18,7). وقد جرت معظم هذه الاختبارات باستخدام تقنية واحدة هي الحاضنة المجهزة بنسبة معينة من غاز ثاني أوكسيد الكاربون والأطباق الزجاجية وباستخدام أوساط زراعية متعددة (32). هذا مضافاً إلى بعض التقنيات البسيطة التي طبقت على زرع الطفيليات (29.20).

إن من أهم المشاكل التي واجهت نظريات استزراع بويضات الكائنات الحية هي مدى ملائمة الظروف الاصطناعية والتي تحتها يمكن تكملة دروة نضج بويضات الكائن الحي (30). حيث ذكر Kurinczuk (2003) (22) ان الجهل وعدم الإلمام والإدراك الكامل بالظروف الفيزيوكيميائية الحقيقية أو عدم تعيينها بوضوح يؤدي إلى ضعف وربما انعدام عمليات التنضيج والإخصاب في أنظمة الاستنبات المستعملة. ولعل التعقيم (16) وخاصة فيما يتعلق بالأوساط الزرعية (27) والمنبهات المستهدفة وغيرها من العوامل شكلت المستوى التقني المعرقل لهذه العمليات (8).

تعود الفئران والجرذان بكافة أنواعها إضافة إلى القطط إلى رتبتي القوارض واللواحم العائدتين إلى صنف اللبائن كما تعود الأبقار والجمال إلى رتبة الظلفيات ضمن نفس الصنف. في حين تعود الديدان الطفيلية إلى شعبتي الديدان المسطحة والخيطية ضمن عديمات الجوف ثنائية التناظر نوع الحييات الحقيقية (24). وقد استخدمت هذه الحيوانات والطفيليات بشكل واسع في مضمار احداث عمليات الإنماء في الزجاج وذلك لوفرتها من ناحية، ولأهميتها الصحية وكذلك من أجل زيادة المنتج المنمى من بعضها خاصة ذوات فترات التكاثر المتباعدة كالأبقار والجمال (36).

لقد ساهم الابتكار التقني في مجال تنضيج وإخصاب البويضات في الزجاج في جامعة الكوفة عام (1998) وما آل إليه من نتائج معتبرة في إرساء إضافة جديدة لخدمة الجوانب الإنسانية والطبية والزراعية. كما انه أضفى نوعاً من المقدرة على المجاراة في الجوانب العلمية الخاصة بالإنماء في الزجاج وأرسى ديناميكيات مختبرية جديدة بالإمكان أن يتم العمل بها من أجل استثمار الثروة المبددة بشكل من الأشكال غير الحضارية.

أن الهدف الرئيسي من الدراسة الراهنة مصمّم لمعرفة كفاءة هذه التقنية المطورة في أنماء وتنضيج بويضات عدد من الحيوانات والطفيليات في الزجاج أسوة بالتقنية المبتكرة في عام (1998) من جهة ومن جهة ثانية هو المقارنة بين هذين الابتكارين وبين الحاضنة المجهزة بطور ذاتي لثاني أوكسيد الكاربون وباستخدام الأطباق البلاستيكية.

المواد وطرائق العمل:

إعداد التقانة وحساب المنتج من الغاز:

أعدت التقنية بأسلوب جديد يهدف من جانب واحد إلى إحداث إلتوائين إثنين في الأنبوبة الزجاجية للمشعل الوقودي الذي يؤدي إلى إنتاج غاز ثنائي أوكسيد الكاربون ، وبنفس الإسلوب السابق ضمنّت التركيبة في صندوق معدني محكم الإغلاق ومزود بفتحتين بحجم (0.7) سم لغرض تسرب الغبار ونقله إلى حمام مائي يحوي أنابيب زجاجية مزودة بفتحتين ومجهزة بأوساط زرعية خاصة لنمو البويضات علماً أن الحمام المائي من النوع المتحرك (شركة ميمارت، ألمانيا) وتم حساب CO_2 باللجوء إلى طريقة تسحيح الفينولفثالين وهيدروكسيد الصوديوم إعتماداً على مولود وزملاؤه (غير مطبوع) (2) والعبايچي والغبشة (1986) (1).

إستحصال البويضات من الكائنات الحية محل البحث:

استحصلت الحويصلات الناضجة وشبه الناضجة من مبايض خمسة من الفئران النوع السويسري الأبيض CD-1 وخمسة جرذان من السلالة CD وعدد مماثل من القطط المحلية *Felis spp.* حيث نزعت مبايض الحيوانات المختبرية والقطط جراحياً في المختبر. أما مبايض الأبقار المحلية *Bos indicus* والجمال ذوات السنام الواحد *Camelus dromedary*، فقد قطعت من الذبائح في المجازر الوطنية العراقية الوسطى وفي بغداد . وضعت هذه المبايض في وسط جمع المبايض ليبوفتز L-15 (مؤسسة جبكوا، أمريكا)، وهو وسط جاهز ومزود بمصل دم العجول بنسبة (10%)، والمضادات الحيوية بجرعة (100) وحدة بنسلين / مل و(50) ملغم ستربتومايسين / مل. حُضّنَت البويضات مع الوسط في الحمام المائي الهزاز ضمن أنابيب سعة (50) مل، وبدرجة حرارة (37 مْ) وبتجهيز طور غاز CO_2 (4-5%)، ولم تضف الهرمونات في هذه المرحلة. أما بالنسبة لبويضات الطفيليات موضع الاختبار، فقد تم استحصالها من بعض المضائف كالأغنام بالنسبة لحلزونيات الكبد والأسطوانيات والطيور والجرذان بالنسبة لمحفورة الورقتين والصفر وبعض أنواع العقليات. حيث وضعت هذه البويضات مباشرة في وسط التنضيج لغرض إنمائها.

التنضيج خارج الجسم:

حرص فريق البحث على تضمين أي عدد من البويضات من الدرجتين الأولى والثانية في هذا المشروع. فالبويضات المستخلصة من داخل الحويصلات عرّضت للوسط الزرعي نفسه في حالة الفئران والجرذان والقطط. في حين إستخدم وسط كريب المحّور جاهزاً، ولكن بأضافة الهرمونات المحرضة للمناسل وبتركيز (10^{-7}) مولاري (شركة سيگما، امريكا) إذ تم قسم البيوض المستحصلة إلى نصفين ، أحدهما تم إنماؤه حسب الطريقة المبتكرة عام 1998، في حين نضّج القسم الثاني بحسب الطريقة المطوّرة الحالية ولمدة 24 ساعة. اما بويضات الطفيليات المستحصلة بالتقنية او مباشرة من الديدان فنميّت في وسط ايكلس (مختبرات فلو، المملكة المتحدة) بالنسبة لبويضات الحلزونيات

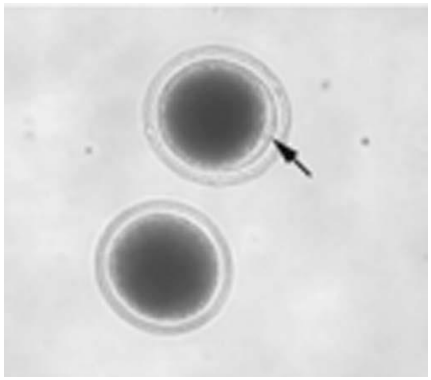
ومحفورة الورقتين والأسطوانيات والخيطيات، أو في وسط هيث NCTC بالنسبة للصفر والعقليات(مختبرات ايرست، نيويورك)، أو في وسط KW-ISA بالنسبة للصفر الخراطيني (مختبرات ايرست، نيويورك) حيث تم إنماء البويضات بنفس الأسلوب أعلاه لبويضات اللبائن وبعد ذلك تم صبغها باستخدام صبغة الاورسين الخلي. سجّلت النتائج وقيمّت إحصائياً باستخدام توزيع الطالب ت، T- test (.Robert etal,1983)(28). علماً بأن الأبحاث استغرقت من يوليو- تموز في 2003 واكتملت في كانون الثاني 2006.

النتائــج:

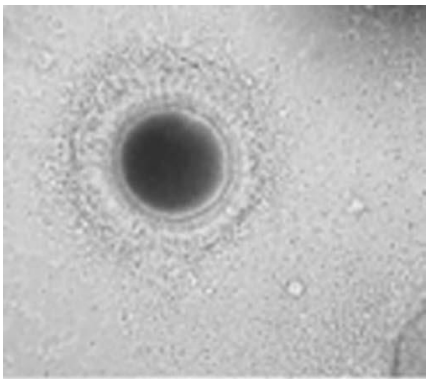
أظهرت النتائج التحليلية الخاصة بالتقنية المطوّرة أن نسبة المنطلق من غاز CO_2 كان يفوق ما هو منتج بواسطة التقنية المبتكرة سنة (1998). إذ أنه وصل إلى (4 - 6.25%) بعد الإختبار والقياس وفقاً للمعيارية المعتمدة لهيدروكسيد الصوديوم.

من ناحية اخرى، يبيّن الجدول رقم (1) أن نسبة البويضات المنضجة بإستخدام التقنية المطوّرة كان (80%) في القوارض والقط و(63%) و(60%) في كل من الأبقار والجمال على التوالي، مقارنة بنسبتها البالغة (70%), (61%) و (55%) في القوارض والأبقار والجمال بالتسلسل وبإستخدام التقنية المبتكرة في (1998). كما يتضح من خلال الجدول رقم (2) مراحل النضج الخلوي للبويضة طوال فترة الحضن، إذ بلغت بويضات الفئران والجرذان الدور الأستوائي الأول اسرع من غيرها في الساعة الرابعة وأربعون دقيقة بعد الحضن, في حين أن الجسم القطبي الأول تكثّف بعد ساعة تماماً. في حين استغرقت بويضات الجمال أكثر فترة لظهور الدور الاستوائي الأول وهو خمسة ساعات وخمس وعشرون دقيقة، وكان الجسم القطبي الأول جلياً بعد ساعة ونصف.

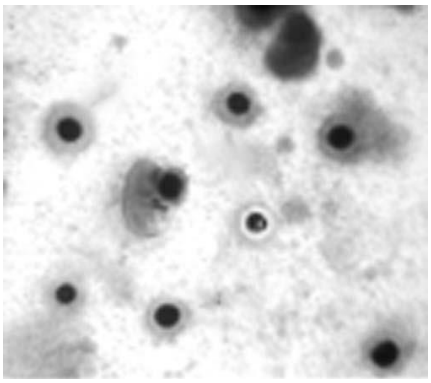
أما فيما يتعلق بالديدان الطفيلية فقد كانت نسب نضج بويضاتها (12.5%), (13.7%), (21%), و(33%) بالنسبة لحلزون الكبد ومحفورة الورقتين والأسطوانيات والخيطية و (18.8 - 25%) في العقليات و(25%) لدودتي الصفر والورقية. حيث كانت هذه النسب مقاربة إلى حد ما لتلك المستحصلة بإستعمال التقنية المبتكرة عام 1998 وكما مبين في الجدول رقم (1) فضلاً عن ذلك كان الناتج من البويضات الناضجة مظهراً لنمو واضح ومتقدم في مراحله. إذ كان أول ظهور للدور الاستوائي الأول بعد ساعة وعشرون دقيقة بعد الحضن. ولوحظ في بعض البويضات تجزؤ وتكاثف للمادة النووية ألا أنه لم يكن واضحاً أي من الأدوار التالية رغم ملاحظة الجسم القطبي في بعض البويضات. والجدول رقم (3) يعرض مراحل النضج الخلوي لبويضات الطفيليات باستخدام كلا الأسلوبين المذكورين. والأشكال (4,3,2,1) توضح بويضات بعض الكائنات الحية المنضجة باستخدام التقنية المطورة.



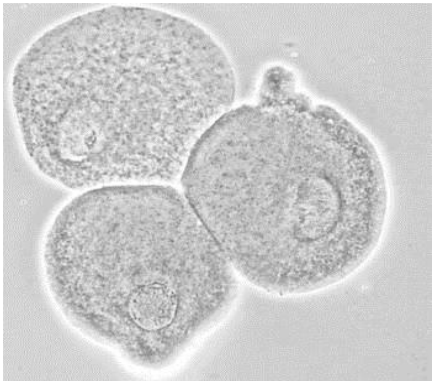
شكل رقم (1): يوضح بويضات بقرة منضجة خارج الجسم (X 70).



شكل رقم (2): يوضح بويضات ناقة منضجة خارج الجسم (X 45).



شكل رقم (3): يوضح بويضات قطة منضجة خارج الجسم (X 30).



شكل رقم (3): يوضح بويضات يرقية كلوبيولس منماة خارج الجسم (X 100)

الجدول رقم (1): نسب البويضات النضجة في الزجاج لبعض الكائنات الحية باستخدام التقنية المطورة مقارنة بالمبتكرة عام (1998) وبعد (24) ساعة من الحضن.

الكائن الحي	عدد البويضات المنضجة باستخدام التقنية المطورة		عدد البويضات باستخدام إبتكار 1998	
الفأر	**10/8**	**(%80)**	**10/7**	**(%70)**
الجرذ	**9/8**	**(%88)**	**10/7**	**(%70)**
القط	**10/8**	**(%80)**	**10/7**	**(%70)**
البقرة	**11/7**	**(%63)**	**13/8**	**(%61)**
الناقة	**10/6**	**(%60)**	**9/5**	**(%55)**
حلزون الكبد	**24/3**	**(%12.5)**	**20/2**	**(%10)**
محفورة الورقتين	**22/3**	**(%13.7)**	**22/3**	**(%13.7)**
عقلية بفرومس	**16/3**	**(%18.8)**	**17/4**	**(%23.5)**
عقلية اوفس	**15/3**	**(%20)**	**15/3**	**(%20)**
عقلية تنفورمس	**16/4**	**(%25)**	**16/3**	**(%18.8)**
إسطوانية كونترتس	**19/4**	**(%21)**	**19/4**	**(%21)**
إسطوانية برازيلي	**19/4**	**(%21)**	**20/5**	**(%25)**
إسطوانية بتكتاتا	**19/4**	**(%21)**	**19/4**	**(%21)**
الصفر الخراطيني	**29/7**	**(%24)**	**31/7**	**(%22.6)**
ورقية گلوبيلس	**20/5**	**(%25)**	**20/5**	**(%25)**
خيطية اكزيورس	**24/4**	**(%35)**	**38/11**	**(%29)**

الجدول رقم (2): مراحل النمو الفسلجي والنضج التركيبي للبويضات باستخدام نوعين من التقنيات المبتكرة.[1]

الكائن الحي	عدد البويضات عند الزرع 0 ساعة	عدد البويضات المضمحلة بعد 2 ساعة	تكسر نواة البويضة بعد 5-4 ساعة	الطور الاستوائي الأول بعد 13-5 ساعة	الطور الاستوائي الثاني بعد 17-13 ساعة	الجسم القطبي بعد 24-17 ساعة
الفأر	10 (10)	2 (3)	8 (7)[2]	8 (7)	8 (7)	8 (7)
الجرذ	9 (10)	2 (3)	8 (7)[2]	8 (7)	8 (7)	8 (7)
القط	10 (10)	2 (3)	8 (7)	8 (7)	8 (7)	8 (7)
البقرة	11 (13)	3 (1)	7 (9)	7 (9)	7 (9)	7 (9)
الناقة	10 (9)	4 (4)	6 (5)	6 (5)	6 (5)	6 (5)[3]

1- الأرقام بين الأقواس هي للبويضات المنضجة باستخدام التقنية المبتكرة في (1998). والأرقام المجردة هي لتلك المنماة باستخدام التقنية المطوّرة.

2- بويضات الجرذ والفأر كانت أسرع من غيرها في تكسر نواة البويضة وظهور الطور الاستوائي الأول بعد 4 ساعات ونيف.

3- بويضات الجمال كانت الأخيرة في تجلّي الجسم القطبي الأول بعد 24 ساعة.

الجدول رقم (3): مراحل النمو الفسلجي والتركيبي لبويضات الطفيليات باستخدام نوعين من التقنيات المبتكرة.[1]

الكائن الحي	عدد البويضات عند الزرع **0** ساعة	عدد البويضات المضمحلة بعد **2** ساعة	تكسر نواة البويضة بعد **3-4** ساعة	الطور الإستوائي الأول بعد **10** ساعة	الطور الإستوائي الثاني بعد **14** ساعة	الجسمين القطبيين بعد **24** ساعة	ظهور الأجنة والتجزؤ الخلوي
- حلزون فاشولا.	**24 (20)**	**21 (18)**	**2 (3)**	**3 (2)**	**----[2]**	**-----**	**(+) ve[3]**
- محفورة الورقتين. (دايفلوبثروم)	**22 (22)**	**19 (19)**	**2 (3)**	**3 (3)**	**-----**	**-----**	**(+) ve**
- عقلية بفورمس.	**16 (17)**	**13 (13)**	**3 (4)**	**-----**	**-----**	**-----**	**(-) ve**
- عقلية أوفس	**15 (15)**	**12 (12)**	**3 (3)**	**3 (3)**	**-----**	**-----**	**(-) ve**
- عقلية تنفورمس.	**16 (16)**	**12 (13)**	**4 (3)**	**-----**	**-----**	**-----**	**(-) ve**
- إسطوانية كونتراتس.	**19 (19)**	**15 (15)**	**4 (4)**	**-----**	**-----**	**-----**	**(+) ve**
- إسطوانية برازيلي	**19 (20)**	**15 (15)**	**4 (5)**	**-----**	**-----**	**-----**	**(+) ve**
- إسطوانية بتكتاتا	**19 (19)**	**15 (15)**	**4 (4)**	**-----**	**-----**	**-----**	**(+) ve**
- الصفر	**29 (31)**	**22 (24)**	**7 (7)**	**-----**	**-----**	**-----**	**(+) ve**
- ورقية گلوبيولس	**20 (20)**	**15 (15)**	**5 (5)**	**5 (5)**	**-----**	**-----**	**(-) ve**
- اگزيورس	**40 (38)**	**26 (27)**	**14 (11)**	**14 (11)**	**-----**	**-----**	**(+) ve**

1- الأرقام الموجودة تابعة لبويضات نميت باستخدام التقنية المطوّرة، والأرقام بين الأقواس هي لبويضات منضجة بإستخدام التقنية المبتكرة في 1998.

2- الإشارة (----) تعني أنه لم يتم تمييز هذه المرحلة من الانقسام بسهولة.

3- المختصر ve (+) تعني أن هناك تحولاً في مجرى الانقسام لإنشاء تكتل شبيه بالجنين.

المناقشـــة:

بيّنت النتائج أن التقنية المطوّرة عن التقنية المبتكرة في (1998) كانت ذات كفاءة أعلى في أنتاج فائض من الغاز الضروري لإكمال نمو البويضات. وكان لتحوير الطريق الذي يسلكه الغاز المنبثق من المشعل النفطي بالغ الأثر في تزايد هذه الكفاءة . ويعد تزايد هذا الغاز باستخدام الأسلوب المطوّر امراً بديهياً من الناحية الغير – كيميائية وذلك لخضوعه لقانون الغازات العام P1V1 = P2V2 (14). حيث أن المساحة السطحية كلما ازدادت زاد معها حجم المادة بالشكل النسبي وذلك يؤدي إلى زيادة ضغط تلك المادة (37). كما ذكر Castka وجماعته (2002) (4) أن قانون بويل ينطبق في مثل هذه الحالات والذي له علاقة بالقانون العام: PV= nRT، حيث يعتمد حجم الغاز وضغطه على عدد مولاته وثابت الغاز ودرجة الحرارة على نحو التناسب الطردي.

عند المقارنة بين نتائج الإنماء للبويضات محل البحث باستخدام الطريقتين المطوّرة أو تلك المبتكرة عام (1998) في مجال التنضيج في الزجاج يتضح أن هناك تسريعاً معيناً من ناحية المعدل الزمني لمعدل البويضات المنضجة وكذلك لتكسر نواة البويضة وظهور الأدوار الاستوائية الأول والثاني أو ظهور الجسم القطبي. وهذا يشكل دليلاً دامغاً على كفاءة إنتاج الخواص الفيزيو- كيميائية والمنبهات المستهدفة للنمو والنضج بواسطة هذه التقنية المطوّرة. وبالمقارنة مع دراسات أخرى نجد أن نتائج التنضيج في الزجاج ضمن هذه الدراسة كانت مضاهية وموازية وتتفوق في بعض الحالات على تلك البويضات المنضجة باستخدام التقنية المبتكرة في (1998) كما في الأبقار والإبل (18) أو الجرذان (19). أو باستخدام الحاضنة المجهزة بغاز CO_2 والأطباق البلاستيكية ، كما في حالة الجرذان (34) والفئران (26) والقطط (13) والأبقار(6) والإبل (18).

كان السبب الرئيسي في انخفاض نسبة النضج المئوية لبويضات الطفيليات متزامناً مع عدم الإحاطة الكاملة بالظروف التي يجب أن تنمو فيها البيوض بالحالات الطبيعية داخل أو خارج أجسام مضائفها (25). كما أن هذه النسبة باستخدام التقنية المطورة كانت ذات آثار في الأعم الأغلب أكثر تقدماً في النمو من تلك المستعملة باستخدام ابتكار عام (1998). لقد سجّل Foster (1970) (11) نتائجاً ايجابية باستخدام أوعية استنبات ثابتة أو ذات جريان دائم لحفظ ديدان الفاشيولا (الحلزونية) حيّة في وسط من مخاريط زجاجية اعتمدت وسط ايرلس وايكلس عند درجة (28 – 30) مْ. إذ بقت الديدان حية لمدة 20 يوماً أو 10 أيام في حالة محفورة الورقتين باستخدام هذا النظام. وقد أكّد كل من Leland (1963) (23) و Holman وجماعته (2005) (21) و Poulin & Fredensberg (2005) (12) من أن الأوساط التي طوّرها بعض الباحثين تميل إلى الترتيب وتفتقد إلى الشفافية أثناء فترة الحضن الطويلة الضرورية لبويضات بعض الاسطوانيات البيطرية.

أما بالنسبة للشريطيات العقلية والدودة الورقية – كلوبيولوس، فقد ساهم الوسط NCTC – 135 المزوّد بمصل جنين العجل ووسط غازي في الهواء بنموها. فقد أظهرت اليرقات فيه ميلاً نحو الانشطار البسيط وان الضغف في نمو

ونضج ديدان ويرقات هذه الكائنات الحية (وخاصة الكلوبيولس) ربما يعود لأن هذه الأنواع تكون في طور نسلي أكثر تقدماً من الأنواع الأخرى (10,3).

ان الاستنتاج المستشف من خلال ما تمخضت به هذه الدراسة يوضح أن التطوير الذي طرأ على التقنية المبتكرة في 1998 بواسطة Hassan (2000) نجح فعلاً في إعطاء نسبة من النضج لبويضات بعض الحيوانات والطفيليات تفوق تلك التي استحصلت بواسطة الحاضنة ذات الأطباق البلاستيكية أو الطريقة المبتكرة نفسها بواسطة Hassan في 1998. كما تميزت هذه التقنية باستعمال وسط متجانس حرارياً وذو اهتزاز مستمر وذات تبادل هوائي كفوء.

REFERENCES:

1- العبايجي، مؤيد قاسم وثابت سعيد الغبشة (1986) أسس الكيمياء التحليلية، الطبعة الأولى، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

2- مولود، بهرام خضر ونضال ادريس سليمان وحلمي صابر عثمان وعلوان جاسم الوائلي، (غير مطبوع)، ملزمة البيئة والتلوث، مطابع كلية التربية، جامعة بغداد.

3- Brehm, K., M. Spiliotis, R. Zavala – Gongora, C. Konrad, and M. Frosch (2006). The molecular mechanisms of larval cestode development: First steps into an unknown world. Parasitol. Int. 55 Suppl: S 15 – 21.

4- Castka, J. F., H. C. Metcalfe, R. E. Davis, and j. E. Williams (2002). Modern chemistry. Holt, Rinehart and Winston. ISBN: 0 – 03 – 056537 – 5.

5- Chang, M. C. (1959). Fertilisation of rabbit ova in vitro. Nature (London), 184, 406.

6- Choi, Y. H., F. C. Londim – Alvarengu, G. E. Seidel, Jr. and E. L. Squires (2003). Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinyalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine Zona – free or partially Zona – removed equine oocytes. J. Anim. Sci., 81: 2080 – 2087.

7- Edwards, R. G., B. D. Bavister, and P. C. Steptoe (1969). Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature (London), 221 – 632.

8- Elder, K. and B. Dale (2000). In vitro fertilization. (2nd edn). London. Cambridge University Press. ISBN: 0 – 521 – 77863 – 8.

9- Enright, W. (1982). Studies related to the maturation and fertilization of ovarian oocytes in the cow. M. Agr. Sci. Thesis. N. U. I., Dublin.

10- Falcone, F. H., M. Schlaak, and H. Haas (1995). In vitro cultivation of *Brugia malayi*, a paracitic nematode that causes human filariasis. ALTEX; 12 (4): 179 – 187.

11- Foster, G. R. (1970). A suggested medium for maintaining *Fasciola hepatica* prior to in vitro experimentation. Zeitschrift für Parasitenkunde, 34: 177 – 8.

12- Fredensborg, B. L. and R. Poulin (2005). In vitro cultivation of *Maritrema novaezealandensis* (Microphallidae): the effect of culture medium on Excystation, survival and egg production. Parasitol. Res. Mar; 95 (5): 310 – 3.

13- Freistedt, P., M. Stojkoric, and E. Wolf (2001). Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic medium: Effects of season and ovarian status. Biology of Reproduction; 65: 9 – 13.

14- Guch, I. (2003). The Complete Idiot's Guide to Chemistry. Alpha, Penguin Group Inc. ISBN: 1 – 59257 – 101 – 8.

15- Hamner. C. E., L. L. Jennings, and N. J. Sojka (1970). Cat spermatozoa require capacitation. J. Reprod. Fert. 23, 477.

16- Hansen, M., C. Bower, and E. Milne (2005). Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review. Human Reproduction; 20: 328 – 38. PMID: 15567881.

17- Harms, E. and D. Smidt (1970). Untersuchengen zur in – vitro befruchtung follikularer and tubaler eizellen von schwein. Berl. Munch. Tieraztl. Wschr.; 83: 269.

18- Hassan, A. U. (2000). Maturation & Fertilization of Oocytes in Vitro. M. Sc. Thesis. Kufa University, Iraq.

19- Hassan, A.U.,R.A. Abid , and M.R. Awad (2005).Maturation & Fertilization of rats oocytes in vitre by using a new glass-tubes technique. J. Babyl. Univ., 13 (3) :

20- Heath, D.D.(1973). An improved technique for the in vitro culture of taeniid larvae. Int. J. Parasitol.; 3:481-484.

21- Holman, P.J., A.M. Spencer, R.E.Drowleskey, H.K.Goethert, and S.R. Telford (2005). In vitro cultivation of a zoonotic *Babesia sp*. Isolated from eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachusetts. J. Clin. Microbiol. Aug; 43 (8): 3995-4001.

22- Kueinczuk, J.J.(2003). Safety issues in assisted reproduction technology. Human Reproduction; 18:945-31. PMID: 12721163.

23- Leland, S.E. (1963). Studies on the in vitro growth of parasitic nematodes. I. Complete or partial development of some gastrointestional nematodes of sheep and cattle. J. Parasitol.; 49:600-611.

24- Nielsen, C. (2001). Animal Evolution. (2nd edn). New York. Oxford University Press. ISBN: 0-198-50682-1.

25- Okochi, Y., K. D. Kimura, A. Ohta, and I. Mori (2005). Diverse regulation of sensory signaling by *C. elegans* nPKC- epsilon / epsilon / eta TTX-4. EMBO. J. June 15; 24 (12) : 2127-2137.

26- Polanski, Z. (1986). In-vivo and in-vitro maturation rate of oocytes from two strains of mice. J. Reprod. Fert.; 78 : 103-109.

27- Porcu, E., R. Fabbri, G. Damiano, R. Fratto, S. Giunchi, and S. venturoli (2004). Oocyte cryopreservation in oncological patients.Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol,; 113 Suppl. 1: S 14-6. PMID: 15041124.

28- Robert, C. D., G. K. Rebecca, and M. M. Clinton (1983). Introduction in biostatics for medicine sciences. (2nd edn). Florida, Med. School, Mayami College Press.

29- Silverman, P. H. & E. L. Hansen (1971) In vitro cultivation procedures for parsitic helminthes : recent advances. Advances in Parastology; 9 : 227-258.

30- Smyth, J. D. & Z. Davis (1976). In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of the basic problems and results. International Journal of Parasitolgy; 4:631-644.

31- Steptoe, P. C. & R. G. Edwards (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet; 2(8085) : 366. PMID : 79723.

32- Thibault, C. (1977). Hammond memorial lecture. J. Reprod. Fert.; 51 : 1-15.

33- Toyoda,Y. & M. Chang (1968). Sperm penetration of rat eggs in vitro after dissolution of zona pellucida by chymotrypsin. Nature (London). 220: 589.

34- Vanderhyden, B. C. & D. T. Armatrong (1988). Decreased embryonic survival of in vitro fertilized oocytes in rat is dve to retardation of preimplantation derelopment. J. Reprod. Fert,; 83 : 851-857.

35- Whittingham, D. G. (1968). Fertilization of mouse eggs in vitro. Jap. J. A nim. Rep.; 16 :147.

36- Winston, R. M. L. & K. Hardy (2002). Are we ignoring potential dongers of in vitro fertilization and related treatments?. Nature Cell Biology; 4 (51), S14-18.

37- Zumdahl, S. S. (1998). Chemical Principles. Houghton Millfin Company. ISBN : 0-395-83995-5.

A new, modern origination for the 1998 Designed glass-tubes techniques for Invitro Purposes: A histophysiological evaluation For some organisms eggs

Abstract:

The present study including a fellow of both physiological & histological conditions for the organisms oocytes cultured & matured in vitro by using a new modification on the in vitro 1998 technique by increasing the surface area in a manner to increasing CO2 yeilds.

The results had showed the increase CO2 yeild at about 30% than the amount discharged by previous originated 1998 techniques. Maturation percentages results until the appearing second equatorial stage were being (80%) at mice, oat, and cat, (63%) at cows, and (60%) at camels. At parasites maturation until embryos formation were being (12.5%) at *Fasciola hepatica,* (13.5%) at *Diphyllobothrium dendriticum,* (18-25%) at Teania types (*pisiformis, ovis, teaniaeformis*), (21%) at Nematodes (*Haemonchus contortvs, Cooperia punctata,* and *Nippostrongylus braziliensis*), (25%) at both of *Ascaris Lumbricoides* and *Sphaeridiotrema giobulus,* and at last (35%) at *Entrobius vermicularis* take in part that P > 0.16 so there isn't significant varience occurred any way. Conclusion extend to include a big results conjugated with this new techniques parallal, to those of originated one at 1998 or to the classical on by using (CO_2) incubator.