

## التمييز بين النطاف الحية والميتة باستخدام تقنية SSRT وتقييم الخصائص المختبرية للسائل المنوي المجمد لثيران الفريزيان - هولشتاين في سوريا

كرم شعار<sup>1\*</sup>، محمد زهير الأحمد<sup>2</sup>، أسامة الحمود الياسين<sup>3</sup>، محمد موسى<sup>4</sup>

<sup>1</sup> طالب دراسات عليا (دكتوراه)، قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، مدينة حماة، سوريا.  
<sup>2</sup> أستاذ تناسليات التلقيح الاصطناعي، قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، مدينة حماة، سوريا.

Email: zuher35@yahoo.fr

<sup>3</sup> أستاذ مساعد في الإنتاج الحيواني، قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة الفرات، مدينة دير الزور، سوريا.

oush42@alfuratuniv.edu.sy

<sup>4</sup> أستاذ نقل الأجنة، رئيس قسم الجراحة والولادة، كلية الطب البيطري، جامعة حماة، مدينة حماة، سوريا.

Email: mmoussa194@gmail.com

(\*) الباحث المرسل: kareem.sh@hama-univ.edu.sy

ORCID: https://orcid.org/0009-0004-0868-8759

### الملخص

تم إجراء هذه الدراسة في مركز التلقيح الاصطناعي وإنتاج السائل المنوي (الغزلانية) التابع لمديرية الإنتاج الحيواني في دمشق بهدف دراسة تطبيق تقنية جديدة لتحسين جودة السائل المنوي الناتج من ثيران التلقيح الاصطناعي، عبر فصل النطاف الحية عن الميتة باستخدام الجذب الانسيابي والحراري (SSRT). تم تأمين هذه التقنية بتصميم جهاز خاص مؤلف من ذراع تؤمن دوراناً ثابتاً بسرعة 70 دورة في الدقيقة وتدرجاً في درجة الحرارة بين 25 إلى 30 درجة مئوية بين أعلى الأنبوب الحاوي على القذفة وأسفله، مما يؤمن بيئة ملائمة للنطاف الحية للسباحة عكس التيار والتجمع في القسم العلوي للأنبوب، ثم جمعها وتعبئتها في القشات. أظهرت النتائج تفوق مجموعة التجربة على مجموعة الشاهد بالنسبة لقيم الحركة العامة للنطاف (69.36% (MOT) مقابل 52.08%) عند تحليل الحركة مباشرة بعد الجمع والمعاملة. وكانت هناك فروق معنوية في الحركة العامة للنطاف بعد التجميد والإذابة (59.59% مقابل 39.80%) والحركة التقدمية الأمامية للنطاف (POR) عند قيمة (37.09% مقابل 16.25%) ( $p \leq 0.05$ ). كذلك لوحظت فروق معنوية بين مجموعة التجربة والشاهد في نسبة النطاف الحية (66.40% مقابل 50.48%) والميتة (33.62% مقابل 49.51%)، ومعدل بقاء النطاف حية بعد التجميد (85.44% مقابل 76.22%)، ومعدلات كفاءة انتفاخ الغشاء البلازمي للنطاف اختبار HOST (60.14% مقابل 53.24%). نستنتج من هذه الدراسة إمكانية فصل النطاف الحية عن الميتة بتقنية الجذب الانسيابي والحراري، ورفع جودة السائل المنوي المستخدم في قشات التلقيح الاصطناعي، مما يدعم رفع معدلات الخصوبة عند التلقيح باستخدام هذه القشات.

الكلمات المفتاحية: التلقيح الاصطناعي - الجذب الانسيابي - الجذب الحراري - حركة النطاف - حيوية النطاف.

تاريخ القبول: 3/6/2026

تاريخ الاستلام: 23/4/2026



## Differentiation between live and dead sperm using the SSRT technique and evaluation of the in vitro characteristics of frozen semen of Friesian-Holstein bulls in Syria

Karam Shaar <sup>1\*</sup>, Mohamad Zuher Al-Ahmad <sup>2</sup>, Osama Al-Hamoud Al-Yassin <sup>3</sup>, Mohamed Mousa <sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD student, Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.

<sup>2</sup> Professor of Reproductive Sciences and Artificial Insemination, Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.

[Email: zuher35@yahoo.fr](mailto:zuher35@yahoo.fr)

<sup>3</sup> Assistant Professor in Animal Production, Department of Animal Production, Al-Furat University, Deir ez-Zor, Syria. [Email: Oush42@gmail.com](mailto:Oush42@gmail.com)

<sup>4</sup> Professor of Embryo Transfer, Head of Department of Surgery and Obstetrics, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, Hama, Syria.

[Email: mmoussa194@gmail.com](mailto:mmoussa194@gmail.com)

(\*) **Corresponding Author:** [kareem.sh@hama-univ.edu.sy](mailto:kareem.sh@hama-univ.edu.sy)

**ORCID:** <https://orcid.org/0009-0004-0868-8759>

### Abstract

This study was conducted at the Artificial Insemination and Semen Production Center (Al-Ghazlanayah) affiliated with the Directorate of Animal Production in Damascus, with the aim of studying the application of a new technique to improve the quality of semen produced from artificial insemination bulls, by separating live sperm from dead ones using rheotaxis and thermotaxis (SSRT). This technique was provided by designing a special device consisting of an arm that ensures constant rotation at a speed of 70 rpm and a temperature gradient of 25 to 30 °C between the top and bottom of the tube containing the ejaculate, thereby providing a suitable environment for live sperm to swim against the current and accumulate in the upper part of the tube, after which they are collected and packaged in straws. The results showed that the experimental group outperformed the control group in terms of total sperm motility (MOT) (69.36% vs. 52.08%) when motility was analyzed immediately after collection and treatment. There were significant differences in total sperm motility after freezing and thawing (59.59% vs. 39.80%) and progressive forward motility (POR) at  $p \leq 0.05$  (37.09% vs. 16.25%). Significant differences were also observed between the experimental and control groups in the percentage of live sperm (66.40% vs. 50.48%) and dead sperm (33.62% vs. 49.51%), the cryosurvival rate (85.44% vs. 76.22%), and sperm plasma membrane swelling efficiency rates as assessed by the HOST test (60.14% vs. 53.24%). We conclude from this study the possibility of separating live from dead sperm using the rheotaxis-thermotaxis technique, and improving the quality of semen used in artificial insemination straws, thereby supporting increased fertility rates when inseminating with these straws.

**Keywords:** Artificial insemination – Rheotaxis – Thermotaxis – Sperm motility – Sperm vitality.

**Date of acceptance:** 3/6/2026

**Date of receipt:** 23/4/2026



## 1. المقدمة والدراسة المرجعية (Introduction and reference study):

يُعدُّ التلقيح الاصطناعي حجرَ الزاوية في برامج تحسين النسل ورفع الكفاءة الإنتاجية للقطعان الحيوانية، لا سيَّما في مجال تربية الأبقار. وتَعتمدُ فعاليةُ هذه التقنية بشكلٍ أساسيٍّ على جودة السائل المنوي المستخدم، وخاصةً بعد مروره بعملية الحفظ بالتجميد التي تُعدُّ ضروريةً لتسهيل النقل والتخزين وتحديد التوقيت الأمثل للتلقيح. هدف التلقيح الاصطناعي في المقام الأول إلى إنشاء مجموعات تكاثرية، مما يساهم بدوره في مكافحة العدوى التناسلية والأمراض المسببة للإجهاض، مثل داء البروسيلة البقري والمتدثرة الحينية (Diskin *et al.*, 2015). يُحقق هذا الهدف باستخدام السائل المنوي الممدد والمجمد (Götze, 1949)، حيث يتيح تجميد السائل المنوي إمكانية تخزينه لفترات طويلة، مما يخفف من تكاليف الإنتاج (Linde, 2001) وعند تطبيق عمليات التمديد والتجميد هذه على السائل المنوي في مراكز التلقيح الاصطناعي، أسهمت هذه الإجراءات في إنتاج أجنة ذات صفات وراثية متميزة (Mebratu *et al.*, 2020)؛ إذ يمكن اعتبار كل من التلقيح الاصطناعي وتجميد السائل المنوي تقنيتين أساسيتين من بين التقنيات المطبقة في مجال الإنتاج الحيواني (Linde, 2001) ولهذه التقنية شروط يجب توافرها، وهي أن يكون السائل المنوي عالي الجودة، وأن تكون النطاف قادرة على المحافظة على حيويتها بعد إجراءات التجميد والإذابة للسائل المنوي المجمد (Nitin *et al.*, 2018). ومع ذلك، فإن عملية الحفظ بالتجميد ليست خالية من التحديات، حيث تُلحق سلسلة الإجراءات ضرراً فسيولوجياً وبنوياً بالنطاف، مما يؤدي إلى فقدان نسبة كبيرة منها لحيويتها وقدرتها على الحركة التقدمية، وينعكس ذلك في النهاية على انخفاض معدلات الخصوبة والإخصاب. كما أن تطبيق التلقيح الاصطناعي في الحقل يتطلب فهماً دقيقاً للتقنيات المتعددة، والتي تختلف في إجراءاتها ومزاياها وقيودها العملية.

هناك بعض الثيران ذات الصفات الوراثية الجيدة ولكنها تنتج سائلاً منوياً ذا حساسية لإجراءات التجميد (Thurston *et al.*, 2002). كما ينتج عن الحفظ بالتجميد عدة تحديات منها انخفاض جودة السائل المنوي (Holt, 2000)، ويرجع ذلك في الغالب إلى صدمة البرد، وذلك عندما تنخفض درجة الحرارة من 15 إلى 4 درجات مئوية (Verstegen *et al.*, 2002)، وهذا يؤدي إلى فقدان الحركة التقدمية الأمامية للنطاف والتأثير على سلامة الغشاء الخلوي لها (Talukdar, 2015). تتأثر النطاف وظيفياً من خلال انخفاض عمرها داخل الجهاز التناسلي الأنثوي، حيث أن النطاف الميتة بعد إذابة السائل المنوي المجمد تؤثر سلباً في النطاف الحية؛ لأن النطاف الميتة لديها نشاط عالي من الـ LAO L-Amino Acid Oxidase

والذي يولد الـ  $H_2O_2$  الذي يعتبر من المركبات السامة للخلايا، مما يؤثر في العمر الوظيفي للنطاف الحية ويؤدي إلى خلل وظيفي غير عكوس، فيؤثر بشكل عام في الخصوبة (Roca et al., 2016). ولتحسين جودة السائل المنوي المجمد، أُجريت العديد من الدراسات للتخلص من تحديات التجميد مثل صدمة البرد، فاستُخدم صفار البيض كواقٍ للبرودة غير نافذ خارج خلوي (Briand-Amirat et al., 2007). وتكمن الفائدة من صفار البيض في قدرته على الالتصاق بالأغشية البلازمية للنطاف خلال عملية التجميد بسبب غناه بالفوسفوليبيدات والكوليسترول والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (Low-Density Lipoprotein، LDL) التي تحافظ على الغشاء البلازمي من صدمة البرد (Sieme et al., 2016). كما أُجريت دراسات حديثة لفصل النطاف الحية عن الميتة باستخدام عدة تقنيات، منها: تقنية الموائع الدقيقة والتي هي أسلوباً فعالاً لاختيار الحيوانات المنوية عالية الجودة. تعتمد تقنية الموائع الدقيقة على معالجة كميات ضئيلة (ميكرو لتر) من السوائل في شبكات قنوات دقيقة على شكل خطوط انسيابية. يتم في هذه التقنية اختيار الحيوانات المنوية وتحليلها بناءً على حركتها وخصائصها السلوكية. بالمقارنة مع طرق اختيار الحيوانات المنوية التقليدية، تُتيح هذه الطريقة إنتاج حيوانات منوية متحركة عالية الجودة ذات حمض نووي سليم أو شبه سليم، وتحقيق نجاح أكبر في التلقيح الاصطناعي للأبقار، وزيادة معدلات الحمل والولادات الحية في التلقيح الاصطناعي - التخصيب في المختبر (IVF) والحقن المجهرى للبيضة (Bhat et al., 2024) (ICSI) والجذب الانسيابي والحراري، والتي هي آلية مشتركة من خلال جذب النطاف الحية انسيابياً بالاعتماد على قدرتها على الحركة عكس التيار، وجذب النطاف ذات الحركة التقدمية حرارياً عند استخدام التدرج في الحرارة بين أعلى الأنبوب (30 درجة مئوية) وأسفل الأنبوب (25 درجة مئوية)، ومن ثم سحب القسم العلوي لفصل النطاف الحية عن الميتة (Nagata et al., 2019).

### 1.1. المشكلة البحثية:

نظراً لوجود مشكلة تقنية في حفظ السائل المنوي بالتجميد، وهي انخفاض نسبة النطاف الحية بعد الإذابة، وهو ما لاحظناه قبل البدء بالدراسة بانخفاض نسبة النطاف الحية بعد إجراءات التجميد بنسبة 50% خلال فصل الصيف، وهو ما يعاني منه مركز التلقيح الاصطناعي الغزلانية. فاقترحنا حلاً للمشكلة بتحسين جودة السائل المنوي بفصل النطاف الحية عن الميتة.

## 2.1. الأهداف:

رفع جودة السائل المنوي الناتج وذلك من خلال دراسة بعض المؤشرات المخبرية للسائل المنوي:

- الحركية العامة والحركية التقدمية الأمامية للنطاف.
- حيوية النطاف (نسبة النطاف الحية والميتة) ومعدل بقاء النطاف حية بعد التجميد (%CRS).
- مقاومة غشاء النطاف للضغط الأسموزي المنخفض (HOST) Hypoosmotic Swelling Test.

## 2. المواد وطرائق العمل (Material and methods):

### 1.2. مكان إجراء الدراسة:

أُجريت التجربة في مركز التلقيح الاصطناعي وإنتاج السائل المنوي (الغزلانية) التابع لوزارة الزراعة في محافظة دمشق ومختبرات كلية الطب البيطري اعتباراً من 22/6/2022 ولغاية 15/12/2022.

### 2.2. حيوانات التجربة:

خصص لإجراء التجربة 4 ثيران من طلائق التلقيح الاصطناعي من سلالة الفيريزيان الهولشتيان وبأعمار متقاربة (11 سنة  $\pm$  1) المعتمدة في مركز إنتاج السائل المنوي (الغزلانية) وخضعت جميعها لنفس الشروط التغذوية والصحية حيث قدم لها عليقة متوازنة تفي بالاحتياجات اللازمة لإنتاج السائل المنوي كما خضعت لمراقبة صحية بيطرية مستمرة وقدم لها برنامج صحي وقائي لحمايتها من مسببات الأمراض التي قد تنتقل عبر السائل المنوي وذلك ضمن اجراءات الأمن الحيوي المتبعة في المركز.

### 3.2. جمع السائل المنوي:

جُمعت 32 قذفة باستعمال المهبل الصناعي وبمعدل قذفتين أسبوعياً من كل ثور وبفاصل 3 أيام ولمدة 4 أسابيع واعتمدت القذفات التي بلغت حركيتها أكثر من 50%. ثم قُسمت القذفات عشوائياً إلى مجموعتين بحيث تضم كل مجموعة 16 قذفة من ثيران التجربة الأربعة:

- **مجموعة التجربة:** عُوِّمَت قذفات السائل المنوي فيها بتقنية الـ (SSRT) Sperm Selection by Rheotaxis and Thermotaxis قبل التجميد والحفظ في القشاش.
- **مجموعة الشاهد:** عُوِّمَت قذفات السائل المنوي فيها بالطرق المتبعة في المركز.

#### 4.2. معالجة السائل المنوي:

**(a) قذفات مجموعة التجربة:** قُيِّمَت القذفة مباشرةً تحت المجهر الضوئي لتحديد نسبة الحركية المباشرة، كما قُيِّمَ السائل المنوي ظاهرياً (الحجم / اللون / القوام). ثم قُيِّمَت كثافة السائل المنوي بجهاز المقياس الضوئي (Photometer) لتحديد كمية الممدد المطلوبة وعدد القشاش المتوقعة. بعد ذلك، قُيِّمَت كمية الممدد إلى قسمين:

○ **القسم (A):** (خالي من صفار البيض) ، خُطِطَت العينة مباشرةً مع هذا الممدد تحت درجة حرارة 37°م. ثم نُقِلَت العينة إلى جهاز الـ SSRT وعُوِّمَت لمدة 20 دقيقة في هذا الجهاز المصمم لفصل النطاف الميتة عن الحية. بعد الانتهاء من فصل النطاف، أُخِذَ ثلثا (3/2) الجزء العلوي من الأنبوب الحاوي على العينة مع الممدد (A)، وأُضِيفَ إليه صفار البيض بنسبة (5%).

○ **القسم (B):** أُضِيفَت كمية الممدد في هذا القسم بعد تبريد العينة إلى درجة حرارة 4°م، وكان الممدد بنفس درجة الحرارة. عند هذه المرحلة أصبحت العينة جاهزةً للتعبئة.

**(b) قذفات مجموعة الشاهد:** عُوِّمَت ومُدَّت عينات السائل المنوي في مجموعة الشاهد وفق الإجراءات المعتمدة في مركز التلقيح الاصطناعي (الغزلانية).

#### 5.2. تمديد السائل المنوي:

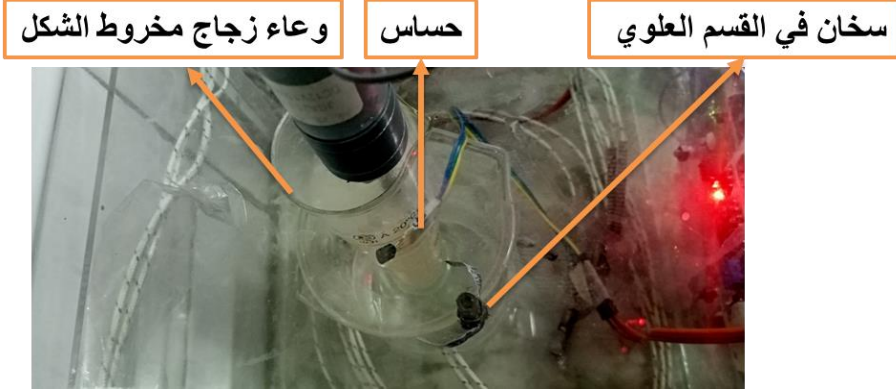
تم تمديد السائل المنوي باستخدام المحاليل المتوفرة في مركز التلقيح الاصطناعي، والتي تتألف من: التريس (3.028 غ) وحمض السيتريك (1.7 غ) والفركتوز (1.25 غ) والديهيدروستربتومييسين (0.1 غ) وماء مضاعف التقطير (حتى 100 مل) والغليسيرول (7%).

## 6.2. تطبيق تقنية الجذب الانسيابي والحراري (SSRT):

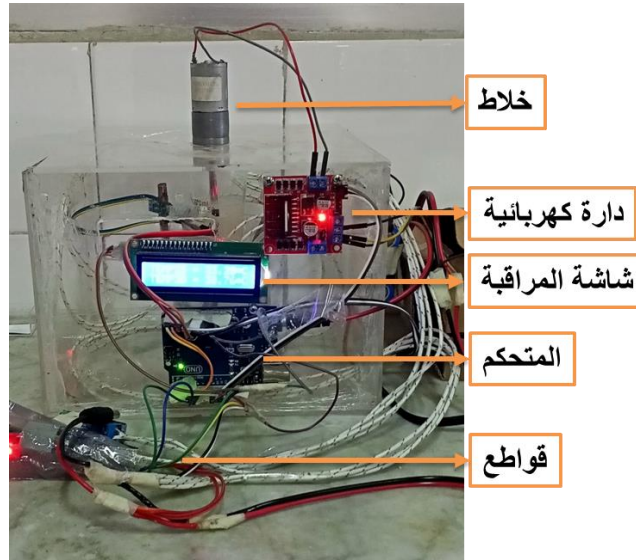
صُمم جهاز تقنية الجذب الانسيابي والحراري بالاعتماد على المواد المتاحة محلياً والخبرات المحلية لانتقاء النطاف الحية ذات القدرة الحركية بجذبها انسيابياً عبر إحداث تيار داخل الأنبوب الحاوي على العينة؛ وذلك بدوران ذراع يلامس الجزء العلوي من الأنبوب، مما يدفع النطاف الحية المتحركة للسباحة عكس التيار، بينما تترسب النطاف الميتة في قعر الأنبوب. كما يتم جذبها حرارياً بإحداث تفاوت في درجات الحرارة بين أسفل وأعلى الأنبوب (الصورة رقم 1 و 2). والذي يتألف من (سخان يحيط بالقسم العلوي للأنبوب - سخان يلامس البيشر الحاوي على الماء في القسم السفلي للأنبوب - خلاط يلامس الجزء العلوي للعينة - حساسات حرارة وشاشة مراقبة لها).

### يتألف الجهاز من:

1. وعاء في الأسفل يحتوي على ماء مدفأ إلى درجة حرارة 25°م، ومزود بحساس وسخان لضبط درجة الحرارة المطلوبة.
2. وعاء زجاجي أسطواني الشكل لوضع عينة السائل المنوي الممددة بدون صفار بيض.
3. سخان يحيط بالطرف العلوي للوعاء الزجاجي الأسطواني، موصول بحساس لضبط درجة حرارة 30°م وموصول بقواطع لفصل التيار الكهربائي عند الوصول لدرجة الحرارة المثلى.
4. خلاط موصول بذراع تلامس السطح العلوي للعينة، يدور بسرعة 70 دورة في الدقيقة.
5. شاشة لمراقبة درجات الحرارة بين اعلى الأنبوب وأسفل الانبوب.
6. المتحكم(اردوينو) وهو شريحة ذكية لبرمجة وضبط سرعة الدوران في الخلاط وحساسات الحرارة والقواطع.



الصورة رقم (1): توضح الصورة منظر راسي للجهاز المصمم والعناصر المكون منها (الوعاء الذي يحوي العينة - السخان المحيط بالطرف العلوي للحصول على درجة حرارة 30 درجة مئوية - حساس درجة الحرارة).



الصورة رقم (2): توضح منظر أمامي للجهاز المصمم (الخلاط الذي يؤمن التيار - دارة كهربائية - الشاشة لمراقبة تغيرات درجة الحرارة أثناء العمل - المتحكم الذي يسيطر ويضبط جميع عناصر الجهاز من حرارة وسرعة دوران - قواطع لفصل الدارة عند الوصول لدرجة الحرارة المطلوبة).

7.2. تعبئة القشاشات: تم تعبئة القشاشات بسعة (0.25 مل تحتوي 20 مليون نطفة) باستخدام آلة التعبئة الآلية داخل حجرة التبريد وتم إغلاق القشاشات ونقلت لحجرة التبريد 4 درجة مئوية لتنفيذ مرحلة التأقلم مع الغليسيرول لمدة 4 ساعات.

**8.2. تجميد السائل المنوي:** تم البدء بتجميد القشات بعد تعبئتها وانتهاء مرحلة التأقلم أولاً على بخار السائل الأزوتي وذلك بوضع القشات على حوامل ترتفع (40 سم) عن سطح السائل الأزوتي وإغلاق المجمدة وترك القشات ضمن البخار لمدة نصف ساعة ومن ثم إخراجها وغمرها مباشرة في السائل الأزوتي.

## 9.2. تقييم السائل المنوي للمجموعات المعاملة بالـ SSRT والشاهد:

**i. حركية النطاف:** تم تقييم المؤشرات الحركية للنطاف أولاً باستخدام المجهر الضوئي، ثم قُيِّمت حركيتها بعد المعاملة بجهاز SSRT لعينات التجربة، وتمديد عينات الشاهد باستخدام تحليل السائل المنوي بمساعدة الحاسوب (CASA) وهو من نوع Minitub, Tiefenbach, Germany Sperm Vision®3.5 المتوفر في مركز الغزلانية.

### ii. حيوية النطاف:

تم تقييم حيوية النطاف باستخدام صبغة الإيوزين-نيكروزين (Eosin-Nigrosin)، حيث صُبِّغَت العينات ودرست نسبة النطاف الحية والميتة وفق الخطوات الآتية:

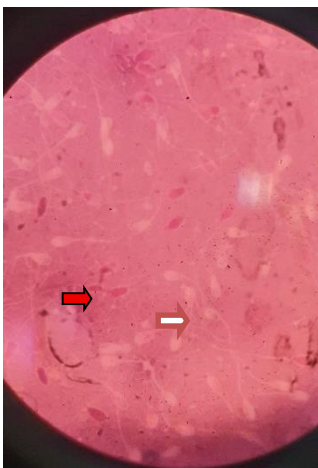
أ- وُضعت قطرة من السائل المنوي (0.1 مل) على شريحة نظيفة.

ب- وُضعت قطرة من صبغة الإيوزين (Eosin) (0.1 مل) فوق قطرة السائل المنوي، وتم مزجها جيداً. ثم تُرِكَ المزيج لمدة 30 ثانية إلى دقيقة واحدة لتتمكّن الصبغة من اختراق جدار الخلايا الميتة وتلوينها باللون الوردي.

ت- وُضعت قطرة من صبغة النيفروزين (Nigrosin) (0.1 مل) فوق الخليط السابق، وتم مزج المكونات الثلاثة معاً جيداً.

ث- أُخِذَت قطرة من الخليط النهائي، وعُمِلَت مسحة رقيقة منه على شريحة نظيفة باستخدام حافة شريحة أخرى.

ج- تُرِكَت الشريحة حتى تجف تماماً في الهواء.



الصورة رقم (3): صبغة الإيوزين والنيفروزين لتحليل الحيوية (الأسهم البيضاء تشير إلى النطاف الحية والأسهم الحمراء تشير إلى النطاف الميتة).

ح- دُرِست الشريحة تحت المجهر الضوئي (تكبير 60X)، حيث تُعدُّ النطاف الحية (غير الملونة) ذات الرؤوس البيضاء أو الشفافة، بينما تُعدُّ النطاف الميتة (الملونة) ذات الرؤوس الوردية أو الحمراء. وتم عد 200 نقطة على الأقل لحساب النسبة المئوية للحيوية (الصورة رقم 3).

iii. **معدل بقاء النطاف Cryosurvival rate (%CRS) :** قُيِّم المعدل بالاعتماد على مجموع النطاف المتحركة بعد إذابة التجميد وفق المعادلة الآتية:

$$\text{(النطاف المتحركة بعد إذابة التجميد / النطاف المتحركة قبل التجميد)} \times 100$$

iv. **مقاومة غشاء النطاف للضغط الأسموزي المنخفض Hypoosmotic Swelling Test (HOST)** بعد إذابة التجميد وفقاً للخطوات الآتية:

1. تحضير المحلول منخفض الضغط الأسموزي: تم تحضير محلول بضغط أسموزي يعادل 100 ملي أسمول/كغ (mOsm/kg) ، مكون من:

○ 75 ملي مولار فركتوز (ما يعادل 13.5 غرام فركتوز لكل لتر ماء مضاعف التقطير).

○ 25 ملي مولار سترات الصوديوم الثلاثية (ما يعادل 7.35 غرام سترات الصوديوم ثلاثية لكل لتر ماء مضاعف التقطير).

2. التعرض للمحلول منخفض الأسموزية: أُضيف 100 ميكروليتر من السائل المنوي المجمد والمُذاب إلى 1 مل من المحلول منخفض الأسموزية المحضر.

3. التحضين: وُضع المزيج في حضانة (حمام مائي) بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة.

4. التقييم المجهرى: أُخذت عينة حجمها 15 ميكروليتر من المزيج، ووضعت على شريحة زجاجية مجهرية مُدفاة مسبقاً إلى 37 درجة مئوية، وغطيت بساترة. ثم فُحصت العينة تحت المجهر الضوئي بتكبير  $\times 40$  لتقييم نسبة النطاف المنتخبة (الصورة رقم (4)).



الصورة رقم (4): توضح نتائج تحليل الـ HOST. السهم الأخضر يشير إلى النطاف غير السليمة والتي لم تنتفخ أو يلتف ذيلها والسهم الأبيض يشير إلى النطاف السليمة التي انتفت ذيلها وتأثرت بالمحلول منخفض الكثافة.

**التحليل الإحصائي:** تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام تحليل التباين الأحادي (One-way ANOVA)، وذلك عبر برنامج SPSS الإصدار 22. كما شملت الاختبارات الإحصائية المستخدمة لتحليل النتائج اختبار  $t$  (t-test).

### 3. النتائج (Results):

**أولاً: القيم الأولية:**

تم تسجيل كل من (الحجم، اللون، القوام، الكثافة) مباشرةً بعد الجمع لكل قذفة على حدى (الجدول رقم 1)، حيث جُمعت 32 قذفة من 4 ثيران، وتم تقسيمها إلى مجموعتين: 16 قذفة تجريبية عولجت بتقنية الـ SSRT، و16 قذفة ضابطة (شاهد).

الجدول رقم (1): يوضح عدد القذفات المجموعة من ثيران الدراسة، ومتوسط الحجم، ولون وقوام السائل المنوي، ومتوسط كثافة النطاف الناتجة.

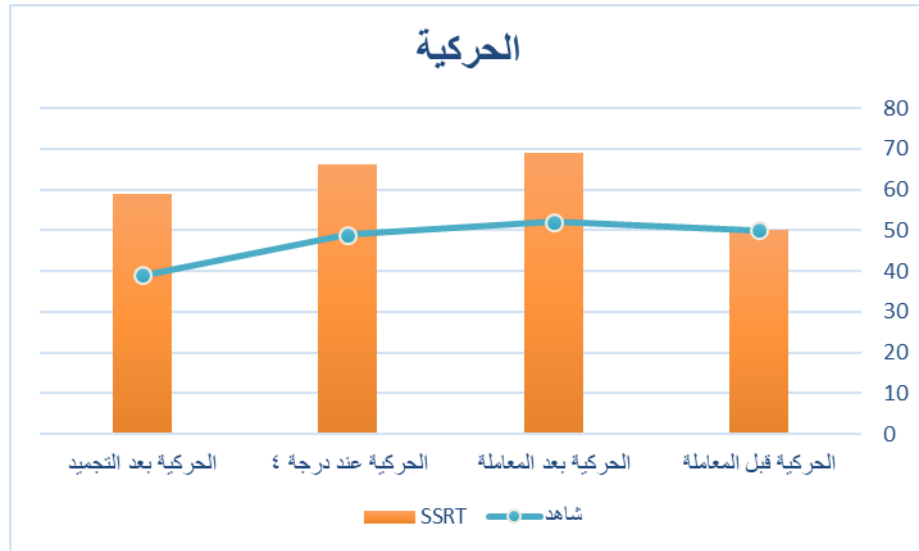
متوسط الكثافة (مليار / مل)	القوام	اللون	متوسط الحجم (مل)	عدد القذفات	المجموعة
1.53	لزج	أبيض كريمي	5.81	16	التجربة
1.49	لزج	أبيض كريمي	5.75	16	الشاهد

### ثانياً: حركية النطاف (MOT-POR) :

تم إجراء تحليل الحركية الكلية (MOT) والحركية التقدمية الأمامية (POR) بشكل مباشر بعد الجمع لكل قذفة على حدى بالنسبة لعينات الشاهد، وبعد المعاملة بتقنية الـ SSRT بالنسبة لعينات التجربة (الجدول رقم 2) والمخطط رقم (1). تمت دراسة معدل (MOT-POR) للنطاف لجميع القذفات المجموعة من ثيران الدراسة (تجربة وشاهد) باستخدام التحليل بمساعدة الكمبيوتر الـ CASA.

الجدول رقم (2): يبين المتوسطات الحسابية والانحراف المعياري لقيم (MOT) لقذفات التجربة والشاهد وقيمة T في كل من مجموعة التجربة والشاهد وذلك بعد الجمع مباشرة وعند التبريد لدرجة حرارة 4 درجة مئوية وبعد التجميد والإذابة ومتوسط قيم الـ POR.

الحركية التقدمية (POR)		الحركية بعد التجميد والإذابة		الحركية عند الدرجة 4 °م		الحركية بعد الجمع مباشرة		المجموعات
SD±	M	SD±	M	SD±	M	SD±	M	
0.67	37.09	0.98	59.59	0.91	66.77	0.88	69.36	التجربة
0.28	16.25	0.76	39.80	0.48	49.14	0.45	52.08	الشاهد
7.94		6.00		5.82		6.70		قيمة t
<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		قيمة P



المخطط البياني رقم (1): يوضح تغيرات قيم الحركية العامة للنطاف من الجمع وبعد المعاملة بجهاز الـ SSRT لعينات التجربة والتمديد لعينات الشاهد وبعد إجراءات التبريد والتجميد للقشبات.

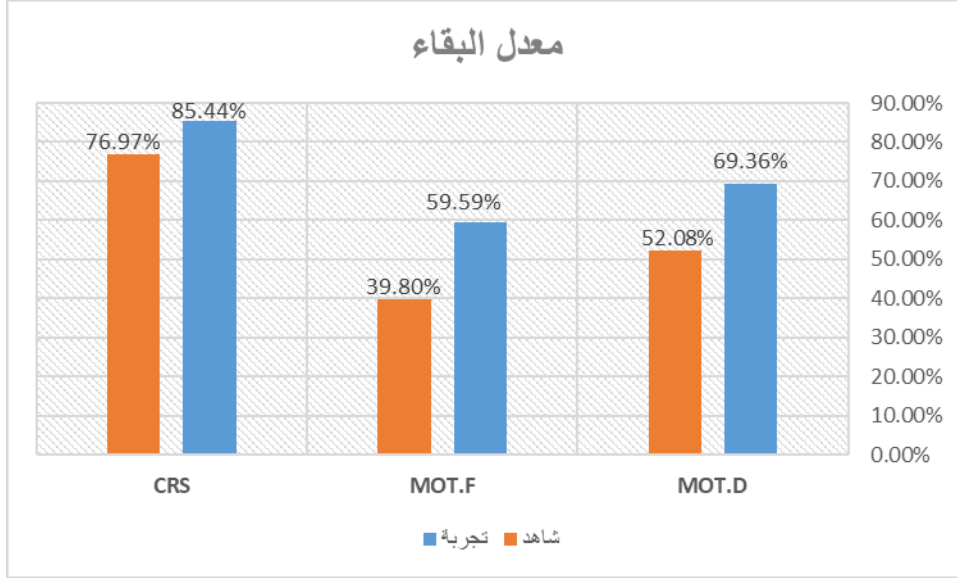
### ثالثاً: معدل بقاء النطاف حية بعد التجميد (%CRS).

تم إجراء تحليل معدل بقاء النطاف حية بعد التجميد (%CRS) لكل قذفة على حدى بالنسبة لعينات الشاهد والتجربة بعد المعاملة بتقنية SSRT والتجميد والإذابة (الجدول رقم 3) والمخطط رقم (2).

الجدول رقم (3): يبين المتوسطات الحسابية والانحراف المعياري لقيم (%CRS) لقذفات التجربة والشاهد وقيمة T وقيمة P والدلالة الإحصائية لها.

المجموعة	عدد القذفات	المتوسط	الانحراف المعياري	قيمة t	قيمة p
التجربة	16	85.44	4.85	4.42	~0.0005
الشاهد	16	76.97	9.31		

يلاحظ من الجدول رقم (3): وجود فروق معنوية بين مجموعة الشاهد والتجربة خلال هذه المراحل عند مستوى ( $P \leq 0.05$ )، وذلك باستخدام اختبار T.



المخطط البياني رقم (2): معدلات بقاء النطاف الحية بعد إذابة التجميد تشير الرموز الآتية إلى: MOT.D معدل الحركة الكلية مباشرة بعد التجميد، MOT.F معدل الحركة الكلية بعد الإذابة من التجميد، CSR معدل بقاء النطاف حية بعد التجميد.

#### رابعاً: حيوية النطاف:

تم إجراء تحليل نسب النطاف الحية والميتة لكل قذفة على حدى بالنسبة لعينات الشاهد والتجربة (16 قذفة لكل مجموعة) وذلك خلال مرهل العمل: بعد الجمع مباشرة وبعد التجميد والإذابة.

دراسة النسب تمت باستخدام صبغة الإيوزين-نيغروزين وعد النطاف الملونة بالأحمر (الميتة) والنطاف غير الملونة (الحية)، حيث تم عد ما لا يقل عن 220 نقطة وحساب النسب المئوية (الجدول رقم 4).

تم إجراء اختبار T للعينات المستقلة لدراسة الفروق بين المتوسطات الحسابية بين مجموعة الشاهد والتجربة.



#### 4. المناقشة (Discussion):

يلاحظ من الجدول رقم (1) أن جميع القيم الأولية من حجم ولون وقوام وكثافة متشابهة ما بين مجموعة التجربة والشاهد ويعود ذلك إلى أن جميع القذفات المستخدمة في الدراسة جُمعت من نفس النيران وقُسمت القذفات إلى قذفات معاملة (تجربة) وقذفات غير معاملة (شاهد) وذلك لاستبعاد تأثير الفرد على نتائج تطبيق تقنية فصل النطاف الحية عن الميتة.

ويلاحظ من الجدول رقم (2) تفوق مجموعة التجربة (SSRT) على مجموعة الشاهد بالنسبة لقيم الحركة الكلية للنطاف الـ MOT والحركة التقدمية الأمامية الـ POR حيث لوحظ وجود فروق معنوية بين مجموعة التجربة (SSRT) والشاهد عند قيمة  $P \leq 0.05$  إذ سُجلت نتائج الحركة الكلية بعد المعاملة مباشرةً 69.36% في مجموعة التجربة و52.08% في مجموعة الشاهد وهذا ما يتوافق مع ما وجدته (Samardzija et al., 2006) الذين قاموا بفصل النطاف الحية عن الميتة وذكروا أن نسبة الحركة ترتفع من 50% إلى 62% بعد الفصل. الدراسة السابقة (Samardzija et al., 2006) استخدمت طريقة أخرى لفصل النطاف الحية عن الميتة، مثل طريقة الطرد المركزي بتدرج كثافة البيركول. وهي طريقة تنتج نطافاً بحركية جيدة ولكن بكمية قليلة من السائل المنوي، وهو أمر غير عملي لإدراجه في مراكز إنتاج قشائ السائل المنوي (القذفات).

كما تتوافق مع (Nagata et al., 2019) الذين حصلوا على نسبة عالية من النطاف المتحركة بعد تطبيق التقنية تقدر بـ 85% وتشير هذه النسبة المرتفعة إلى أن التقنية نجحت في تركيز عدد كبير من النطاف الحية ذات الحركة الجيدة، مع التخلص من نسبة كبيرة من النطاف الميتة أو قليلة الحركة أثناء عملية الفصل (Nagata et al., 2019). وانخفضت الحركة في كلا المجموعتين عند التبريد لـ 4 درجة مئوية بسبب الصدمة الباردة ولكن حافظت مجموعة التجربة (66.77%) على تفوقها الكبير على مجموعة الشاهد (49.14%) أما بالنسبة للحركة بعد التجميد والإذابة: 59.59% مقابل 39.80%. هذا الفرق بنسبة حوالي 20%، مما يعني عينات منوية مجمدة ذات جودة أعلى بكثير، وفي دراستنا وطريقتنا المتوافقة مع (Nagata et al., 2019)، فقد استطعنا فصل النطاف الميتة عن الحية والحصول على سائل منوي نقي من الحطام الخلوي والنطاف الميتة بحجم جيد وقابل للمعاملة بخطوات التجميد، وبالتالي إدراجه ضمن مراكز إنتاج السائل المنوي المجمد.

وبلغت نسبة الحركة التقدمية الأمامية %37.09 مقابل %16.25، حيث أن النطاف ذات الحركة التقدمية هي المسؤولة عن الإخصاب ويشير إلى أن تقنية الـ SSRT لا تنتقي فقط النطاف الحية، بل تنتقي بشكل خاص النطاف السليمة وظيفياً والقادرة على الحركة بشكل فعال، وهي التي تنجو بشكل أفضل من التجميد وهذا يتوافق مع ما وجدته (Nagata *et al.*, 2019) والذين حصلوا على نسب عالية من النطاف السليمة وذات حركة تقدمية أمامية بعد تطبيق هذه التقنية. ويفسر ذلك بالانتقاء الفعال حيث تعتمد التقنية على مبدأ "الكفاءة الذاتية"، حيث يتم فصل النطاف بناءً على قدرتها على السباحة عكس تيار مائي وباتجاه مصدر حرارة. و فقط النطاف الأكثر حركة وحيوية تستطيع تحقيق ذلك (Oseguera *et al.*, 2019).

وتفيد نتائجنا بأن البلازما المنوية (Semen Plasma) تحتوي على مواد مثبطة للحركة (مثل شوارد ومخلفات الخلايا والجراثيم) ومستويات عالية من الجذور الحرة، وهذه المواد تضعف قدرة النطاف على الحركة (Contreras *et al.*, 2020). كما أن الممدد المستخدم في تمديد قذفات المجموعة التجريبية أثناء العمل في جهاز الـ SSRT يؤمن وسطاً للسباحة قليل اللزوجة (بسبب عدم إضافة صفار البيض)، ويدعم النطاف بالمغذيات (بسبب إضافة الفركتوز)، مما يوفر بيئة ملائمة لحركة النطاف؛ لأنه يقوم بتنشيط الميتوكوندريا عبر إنتاج الـ ATP مستفيداً من الفركتوز. كما أن الوسط المذكور يحاكي السوائل الطبيعية في الرحم، وقد تم تحقيق ذلك بإنتاج تيار يدور بسرعة بطيئة (70 دورة في الدقيقة) مما يحفز الحركة عكس التيار، وعليه كانت النتيجة ارتفاع معدل MOT في قذفات المجموعة التجريبية.

كما أن التدرج الحراري بين أعلى الأنبوب (30°م) وأسفله (25°م) أدى إلى تفعيل النطاف (Capacitation)، وهي سلسلة من التغيرات الكيميائية الحيوية الإلزامية التي يجب أن تمر بها النطفة داخل الجهاز التناسلي الأنثوي لتصبح قادرة على الإخصاب. وهذا التفعيل الذي وفره الجذب الحراري أعطى النطاف قدرة حركية أمامية أكبر عبر تنشيط إنزيمات النطفة من خلال إزالة الكوليسترول وزيادة سيولة غشاء الخلية. كما أن عملية التفعيل تسبب زيادة تدفق أيونات الكالسيوم إلى داخل النطفة، وهو المحفز الرئيسي لحركة الذيل (Iqbal & Hunter, 1995). وهذا ما تم توفيره في نظامنا بإجبار النطفة على السباحة عكس التيار ضمن تدرج حراري، مما حفّز الميتوكوندريا على الاستمرار في إنتاج الـ ATP لمقاومة التيار، مما ينتج عنه نطاف ذات حركة تقدمية أمامية (POR) أعلى في قذفات المجموعة التجريبية.

يُظهر الجدول رقم (3) معدل بقاء النطاف بعد التجميد (CRS%) وهو قدرة النطاف على البقاء حية بعد عملية التجميد والإذابة، وهو اختبار لجودة عملية التجميد ذاتها وفعالية المعالجة الأولية إذ سجل معدل

البقاء (CRS%) في مجموعة التجربة (85.44%) مقارنة بـ مجموعة الشاهد (76.97%) وكان أعلى وذو دلالة إحصائية عالية ( $P \sim 0.0005$ ). يشير المعدل المرتفع (85.44%) إلى أن الغالبية العظمى من النطاف التي تم انتقاؤها بتقنية الـ SSRT نجت من عملية التجميد والإذابة، وهذا يتوافق مع (Nagata *et al.*, 2019) الذين حصلوا على معدل بقاء مرتفع (90%) ويفسر ذلك بأن النطاف الأكثر حيوية وسلامة هيكلية (وظيفية) هي الأكثر قدرة على تحمل الإجهادات الفيزيائية والكيميائية المصاحبة للتجميد (Jayasena *et al.*, 2019).

يظهر الجدول رقم (4) نسبة النطاف الحية مقابل الميتة والذي يعبر عن سلامة الغشاء البلازمي، جميع الفروق ذات دلالة إحصائية عالية ( $P < 0.001$ ) إذ سجلت النطاف الحية مباشرةً (66.40%) في التجربة مقابل (50.48%) في الشاهد والنطاف الميتة (33.62%) في التجربة مقابل (49.51%) في الشاهد أما بعد التجميد والإذابة النطاف الحية (56.87%) في التجربة مقابل (36.90%) في الشاهد وهذا ما يتوافق مع (Parrish and Foote, 1987) الذين قاموا بفصل النطاف بطريقة السباحة للأعلى وحصلوا على نسبة حيوية (11.0±70.9% مقابل 8.8±63.0%) ومع (Nagata *et al.*, 2019). ويفسر ذلك بأن التقنية المطبقة لم تقم فقط بتحسين الحركية، بل أمنت نطاف سليمة الهيكل ذات أغشية سليمة لا تسمح لدخول الصبغة. وإن فصل هذه النطاف قبل التجميد يخلق بيئة أنظف وأقل سمية، مما يحافظ على سلامة النطاف الحية المتبقية (Said and Land, 2011)، وانتقاء النطاف ذات الأغشية الأقوى، وبالتالي تمتلك أغشية بلازمية أكثر مقاومة للإجهاد الأسموزي والحراري.

يظهر الجدول رقم (5)، أن مجموعة التجربة المعالجة بتقنية (SSRT) سجلت متوسطاً أعلى معنوياً ( $p = 0.0024$ ) في اختبار الـ HOST مقارنةً بمجموعة الشاهد. وإن اختبار (HOST (Hypo-Osmotic Swelling Test) هو اختبار وظيفي يقيس سلامة الغشاء البلازمي للنطفة وكفاءته في الحفاظ على التوازن التناضحي. وتعتمد تقنية الـ SSRT على حركية النطاف النشطة ضد تيار مائي وفرق حراري وهذه القدرة على الحركية المنظمة تعتمد بشكل مباشر على سلامة الغشاء البلازمي والقطعة الوسطى (الميتوكوندريا المنتجة للطاقة) والسيط (الأهداب). وإن النطاف التي نجحت في السباحة عكس التيار والانجذاب نحو الحرارة هي على الأرجح نطاف سليمة من الناحية التركيبية والوظيفية، بما في ذلك غشاؤها البلازمي. لذلك، عند تعريضها لاختبار الـ HOST، فإن نسبة كبيرة منها تُظهر استجابة طبيعية (انتفاخ) لأن أغشيتها قادرة على تنظيم دخول الماء.

## 5. الاستنتاج:

نستنتج من هذه الدراسة إمكانية فصل النطاف الحية عن الميتة بتقنية الجذب الانسيابي والحراري، والحصول على نطاف سليمة وظيفياً وهيكلية ورفع كفاءة قشات السائل المنوي الناتجة، وتحسين حركية النطاف بعد التجميد والإذابة، مما يدعم رفع معدلات الخصوبة عند التلقيح بهذه القشات.

## 6. التوصيات:

اعتماد تقنية الجذب الانسيابي والحراري (SSRT) في مراكز إنتاج السائل المنوي المجمد يُوصى بإدخال تقنية SSRT كإجراء روتيني في مراكز التلقيح الاصطناعي، خاصةً للثيران ذات السائل المنوي منخفض الجودة أو الحساسة للتجميد، وذلك لفصل النطاف الحية عن الميتة وتحسين جودة القشات المنتجة. وإجراء دراسات إضافية لتقييم الخصوبة الحقلية واختبار فعالية التقنية على أنواع حيوانية أخرى.

## المراجع References

1. Briand-Amirat, L., Tainturier, D., & Anton, M. (2007). Use of egg compounds for cryoprotection of spermatozoa. *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin, Heidelberg, 259-264.
2. Contreras, P., Dumorné, K., Ulloa-Rodríguez, P., Merino, O., Figueroa, E., Farías, J. G., & Risopatrón, J. (2020). Effects of short-term storage on sperm function in fish semen: a review. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1373-1389.
3. Diskin, M. G., Waters, S. M., Parr, M. H., & Kenny, D. A. (2015). Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 83-93.
4. Götze, R. (1949). *Besamung und unfruchtbarkeit der haussäugetiere*. Hannover: Schaper.
5. Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.
6. Iqbal, N., & Hunter, A. G. (1995). Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *Journal of dairy science*, 78(1), 91-102.
7. Jayasena, C.N., Radia, U.K., Figueiredo M., Revill, L.F., Dimakopoulou A., Osagie M., (2019). Reduced testicular steroidogenesis and increased semen oxidative stress in male partners as novel markers of recurrent miscarriage. *Clin Chem.* 65, 161–169.
8. Linde-Forsberg C. (2001). Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen. In: Concannon P.W., England G, Verstegen 12-32.
9. Mebratu, B., Fesseha, H., & Goa, E. (2020). Embryo transfer in cattle production and its principle and applications. *International Journal of Pharmacy & Biomedical Research*, 7(1), 40-54.
10. Nagata, M. B., Egashira, J., Katafuchi, N., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., & Yamashita, K. (2019). Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 91.
11. Nitin Raheja, Sanjay Choudhary, Sonika Grewal, Neha Sharma and Nishant Kumar (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6(3), 239-245.
12. Oseguera-López, I., Ruiz-Díaz, S., Ramos-Ibeas, P., & Pérez-Cerezales, S. (2019). Novel techniques of sperm selection for improving IVF and ICSI outcomes. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 298.
13. Parrish, J. J., & Foote, R. H. (1987). Quantification of bovine sperm separation by a Swim-up method relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *Journal of andrology*, 8(4), 259-266.
14. Roca, J., Parrilla, I., Gil, M. A., Cuello, C., Martinez, E. A., & Rodriguez-Martinez, H. (2016). Non-viable sperm in the ejaculate: Lethal escorts for contemporary viable sperm. *Animal Reproduction Science*, 169, 24-31.

15. Said, T. M., & Land, J. A. (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human reproduction update*, 17(6), 719-733.
16. Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal reproduction science*, 91(3-4), 237-247.
17. Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal reproduction science*, 169, 2-5.
18. Talukdar, D. J., Ahmed, K., & Talukdar, P. (2015). Cryocapacitation and fertility of cryopreserved semen. *Int. J. Livestock Res*, 5, 11-18.
19. Thurston, L. M., & Watson, P. F. (2002). Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation. *CryoLetters*, 23(4), 255-262.
20. Versteegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-79.
21. Bhat, G. R., Lone, F. A., & Dalal, J. (2024). Microfluidics—A novel technique for high-quality sperm selection for greater ART outcomes. *FASEB BioAdvances*, 6(10), 406.

