УДК 547.458+612.616.2 doi: 10.25750/1995-4301-2025-2-198-207

Применение полисахаридов базидиальных грибов для криоконсервации спермы быков голштинской породы

© 2025. Т. В. Полежаева[1], д. б. н., зав. лабораторией,
А. Н. Худяков[1], к. б. н., с. н. с., О. Н. Соломина[1], к. б. н., н. с.,
И. Г. Широких[2], д. б. н., зав. лабораторией,
О. О. Зайцева[1], к. б. н., с. н. с., М. И. Сергушкина[1], к. б. н., м. н. с.,
А. А. Широких[2], д. б. н., в. н. с.,
Д. В. Попыванов[2], к. б. н., зав. лабораторией,
[1]Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук,
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, д. 50,
[2]Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока
имени Н. В. Рудницкого,
610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а,
e-mail: ddic@yandex.ru, biotekhnologiya@fanc-sv.ru

Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных играют важную роль в обеспечении продовольственной безопасности нашей страны. Сохранность генетического фонда обеспечивается репродуктивными технологиями на основе криоконсервации биоматериала. Замораживание биологических образцов при температуре –80 °С (в промышленных морозильниках) или –196 °С (в резервуарах с жидким азотом) позволяет не только хранить материал, но и расширяет спектр практических и научных задач, решение которых ранее было невозможным. Для данных целей природоохранная селекция широко использует криобанки и новые инновационные консерванты, перспективным компонентом которых являются природные биополимеры. Известно, что полисахариды базидиальных грибов обладают высокой комплексообразующей способностью и это обусловливает их широкий диапазон биологического действия. Для технологии криоконсервирования ценным является способность функциональных групп полисахаридов к связыванию большого числа молекул свободной внеклеточной воды, что способствует замедлению метаболизма и подготовке репродуктивных клеток к воздействию низких температур. Возможным механизмом криозащитного эффекта у полисахаридов может быть также их антиоксидантное действие – способность прерывать цепную реакцию перекисного окисления липидов и блокировать повреждающее действие токсичными продуктами радикального процесса. В данном исследовании показано значение полисахаридов базидиальных грибов разного таксономического положения в технологии криоконсервирования сперматозоидов быков голштинской породы. Установлено, что через 28 суток хранения (срок наблюдения) сперматозоидов при –80 °С показатели их подвижности были значительно выше при условии нахождения в замораживаемой биологической среде полисахаридов *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. / *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. / *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Кроме того, количество сперматозоидов без повреждения клеточной мембраны и ДНК было статистически выше при их замораживании в среде с полисахаридами из *Hericium erinaceus* или *Lentinula edodes*, что указывает на высокую перспективу применения данной группы веществ при разработке инновационных технологий длительного хранения генетического материала.

Ключевые слова: *Hericium erinaceus*, *Ganoderma applanatum*, *Lentinula edodes*, полисахариды, криоконсервация, сперматозоиды.

Application of basidial fungi polysaccharides for cryopreservation of Holstein Bull sperm

© 2025. T. V. Polezhaeva[1] ORCID: 0000-0003-4999-3077,
A. N. Khudyakov[1] ORCID: 0000-0003-3757-8263, O. N. Solomina[1] ORCID: 0000-0001-5187-8698,
I. G. Shirokikh[2] ORCID: 0000-0002-3319-2729, O. O. Zaitseva[1] ORCID: 0000-0001-9427-0420,
M. I. Sergushkina[1] ORCID: 0000-0002-3113-527X, A. A. Shirokikh[2] ORCID: 0000-0002-7808-0376,
D.V. Popyvanov [2] ORCID: 0000-0002-4978-4542,
[1]Institute of Physiology of Komi Science Centre of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences,

50, Pervomayskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,
[2]Federal Agricultural Research Center of North-East named N. V. Rudnitsky,
166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,
e-mail: ddic@yandex.ru, biotekhnologiya@fanc-sv.ru

Genetic resources of farm animals play an important role in ensuring food security of our country. The preservation of the genetic fund is ensured by reproductive technologies based on cryopreservation of biomaterial. Freezing biological samples at a temperature of –80 °C (in industrial freezers) or –196 °C (in tanks with liquid nitrogen) allows not only to store the material, but also expands the range of practical and scientific tasks, the solution of which was previously impossible. For these purposes, conservation selection widely uses cryobanks and new innovative preservatives, a promising component of which are natural biopolymers. It is known that polysaccharides of basidiomycetes have a high complexing capacity, which determines their wide range of biological action. The ability of functional groups of polysaccharides to bind a large number of molecules of free extracellular water is valuable for cryopreservation technology, which helps slow down metabolism and prepare reproductive cells for exposure to low temperatures. A possible mechanism of polysaccharides cryoprotective effect may also be their antioxidant action – the ability to interrupt the chain reaction of lipid peroxidation and block the damaging effect of toxic products of the radical process. This study demonstrates the importance of polysaccharides of basidiomycetes of different taxa in the technology of cryopreservation of Holstein bulls spermatozoa. It was found that after 28 days of spermatozoa storage (observation period) at –80 °C, their motility indices were significantly higher provided that *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. / *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. / *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler polysaccharides were in the frozen biological medium. In addition, the number of spermatozoa without damage to the cell membrane and DNA was statistically higher when they were frozen in a medium with polysaccharides from *Hericium erinaceus* or *Lentinula edodes*. The above indicates a high potential for using this group of substances in the development of innovative technologies for long-term storage of genetic material.

Ключевые слова: *Hericium erinaceus, Ganoderma applanatum, Lentinula edodes*, polysaccharides, cryopreservation, spermatozoa.

Сохранение существующего разнообразия пород сельскохозяйственных животных на планете является сложной задачей. Каждая порода имеет свою основу, историю селекции и функционирует в определённой обстановке. Существует несколько причин необходимости сохранения генетического разнообразия животных: поддержание его в качестве страхового полиса от будущих изменений; сохранение уникальных генетических вариантов, представляющих научный интерес; важная роль некоторых пород не только в выживании человека, но и в развитии человеческой культуры. Генетические ресурсы сельскохозяйственных животных играют ключевую роль в обеспечении продовольственной безопасности государства и сохранении разнообразия одомашненных видов, чьи предки исчезли, а их естественная популяция в дикой природе более не существует [1, 2]. В связи с этим вопрос сохранения генофонда вымирающих видов и уникальных пород животных с использованием криоконсервации и современных репродуктивных технологий представляет собой одну из важнейших задач науки.

Широкую известность получил метод охлаждения клеток до ультранизкой температуры –196 °C под защитой криопротектора глицерина или диметилсульфоксида [3], недостатком которых является токсичность и, как следствие, снижение фертильности биоматериала. Необходимы новые эффективные заменители. Важным является также изучение вопроса о возможности длительной криоконсервации репродуктивных клеток при температурах морозильных камер.

Анализ результатов наших исследований [4–8] позволил предположить, что полисахариды базидиальных грибов могут быть использованы в составе разбавителя спермы для её последующего замораживания. Известно, что эти вещества способны проявлять различные биологические эффекты. Например, такие представители базидиальных грибов, как *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler содержат в своём составе полисахариды с выраженным антибактериальным и антиоксидантным действием [9–11], которые играют важную роль в обеспечении сохранности клеток в неблагоприятных условиях.

Целью данного исследования явилось определение возможности применения полисахаридов базидиальных грибов *Lentinula edodes*, *Hericium erinaceus*, *Ganoderma applanatum* в технологии криоконсервации (–80 °C) спермы быков голштинской породы.

Объекты и методы исследования

В работе использованы полисахариды, полученные из плодовых тел или культураль-

ной жидкости ксилотрофных базидиальных грибов: *Ganoderma applanatum* (Polyporales: Ganodermataceae) GA (ON130353.1 в NSBI), *Hericium erinaceus* (Russulales: Hericiaceae) BP16 (регистрационный номер EU784264.1 в NSBI), *Lentinula edodes* (Agaricales: Marasmiaceae) (штамм LE).

Мицелиальную культуру *G. applanatum* и *L. edodes* выращивали в пивном сусле, разведённом водой до 4° по шкале Баллинга. Инокуляцию производили культурами грибов, выращенными в чашках Петри на сусло-агаре аналогичной концентрации. В каждую колбу помещали по 4 диска, вырезанных пробочным сверлом. Колбы с культуральной средой помещали на 20 сут на шейкер SIA «ELMI» S-3L. A20 (Латвия). После этого жидкий мицелий фильтровали и замораживали. Для получения полисахаридов его заливали горячей (70 °C) дистиллированной водой и через 24 ч фильтровали. После этого добавляли этиловый спирт (96%) в соотношении 1:1, осаждали полисахариды в течении 24 ч при 4 °C, фильтровали и высушивали на полиэтиленовых подложках.

В опытах с *H. erinaceus* BP16 выращивали культуру на сусло-агаре (пивное сусло, разведённое водой до 4° по шкале Баллинга), мицелий – на стерильном зерне (овёс, 28 °C), плодовые тела на субстрате из соломы, зерна и дубовых опилок, использованных в объёмном соотношении 6:3:1 [5]. Плодовые тела высушивали (60 °C), измельчали и заливали горячей (70 °C) дистиллированной водой на 8 ч. Далее осаждали полисахариды с помощью 96% этилового спирта (1:4, V/V). Полученную путём центрифугирования (13 000 об./мин, 40 мин) фракцию растворяли в дистиллированной воде (1:1, V/V) и высушивали на воздухе [8].

С помощью прибора «Осмометр-криоскоп ОСКР-1» (НПП Буревестник, Россия) оценивали температуру кристаллизации воды и осмолярные концентрации растворов. Для наведения растворов использовали 2,75% водный раствор трис(гидроксиметил)аминометана (ТРИС) (AppliChem, Германия) – буферного разбавителя различных биологических сред, в том числе криоконсервантов для спермы. Тестировали 1,0% растворы полисахаридов и 5% раствор глицерина (АО Химреактив, Россия), в том числе при добавлении в него полисахаридов в концентрациях от 0,1 до 1,0% [8].

В качестве биологического материала использовали сперму быков-производителей голштинской породы (n=15; возраст 2–3 года) с помощью метода искусственного влагалища на предприятии АО КировПлем (Россия). Сперму смешивали в соотношении 1:5 с раствором (масса/объём) следующего состава: 2,75 г ТРИС (AppliChem, Германия), 0,8 г глюкоза (NeoFroxx, Германия), 0,3 г мальтоза (NeoFroxx, Германия), 1,4 г лимонная кислота (CDH, Индия), 6 мл глицерин (АО Химреактив, Россия), 20 мл желток куриный, бидистиллированная вода до 100 мл. В опытах с полисахаридными фракциями в данный состав раствора добавляли по 0,25 г полисахаридов *H. erinaceus* BP16 / *G. applanatum* / *L. edodes* и также смешивали со спермой (1:5). При этом, конечная концентрация полисахаридов в биологической среде составила 0,21%. Далее полученную смесь в полимерных пробирках по 0,5 мл помещали в холодильную камеру ТВЛ-К 050Б (ЗАО ИнСовт, Россия) на 2 ч при +5 °C, а затем переносили для дальнейшего охлаждения среды в морозильник (Vestfrost, Дания) с температурой –80 °C. Через 28 сут отогревали образцы в водяной ванне (+37 °C).

С применением системы визуализации и обработки данных «Аргус-CASA» определяли биологические параметры сперматозоидов. Данный комплекс включал в себя: фазово-контрастный микроскоп CX43RF Olympus (Япония), цифровую камеру, программное обеспечение и персональный компьютер. Каплю биоматериала помещали в счётную камеру Маклера (Counting chamber Makler®, Sefi Medical, Israel), накрывали покровным стеклом и снимали показания системы. Оценивали следующие показатели движения у популяции подвижных гамет [8]: скорость движения по прямолинейному пути VSL (микрон/сек), скорость вдоль криволинейного пути VCL (микрон/сек), скорость на среднем пути VAP (микрон/сек), отношение прямолинейной скорости к криволинейной LIN (%), среднее угловое смещение MAD (град) и среднюю частоту пересечения среднего пути BCF (Гц). Анализу подвергалось не менее 200 клеток.

Целостность мембран сперматозоидов определяли при окраске пропидий иодидом. К 1 мл клеточной суспензии в PBS (200 мкл спермы, 800 мкл PBS) добавляли 20 мкл раствора пропидия иодида (100 мкг/мл, Servicebio, Китай) и инкубировали 30 мин при температуре +37 °C. Суспензия клеток спермы была нанесена мазком на стеклянную пластинку и высушена на воздухе. Методом световой микроскопии (Микромед 3 ЛЮМ, Россия) оценено по 100 сперматозоидов на

мазке. Окрашенные красителем сперматозоиды считали нежизнеспособными [12, 13].

Отсутствие повреждений ДНК у сперматозоидов, подвергнутых консервации, определяли методом флуоресцентной микроскопии (Микромед 3 ЛЮМ, Россия) при увеличении ×400 с параметром фильтра 490/550 нм [14]. Высушенные на воздухе мазки спермы фиксировали смесью Карнуа 2 ч при комнатной температуре, высушивали и окрашивали раствором акридинового оранжевого (0,2 мг на 1 мл дистиллированной воды). При оранжево-красной флуоресценции ДНК её считали повреждённой, считали 100 клеток (%).

Статистическая обработка данных включала в себя анализ на предмет нормального распределения в тесте Шапиро-Уилка, оценку различий данных по непараметрическому критерию Манна-Уитни при $p<0,05$. Все результаты исследования представлены в виде медианы, 25 и 75 центиля (Me, Q1, Q3).

Результаты и обсуждение

С помощью криоскопического метода установлено (табл. 1), что растворы полисахаридов имели нормальную физиологическую осмолярность (не более 285–300 мОсмоль/л), а раствор 5% глицерина – повышенную осмолярность, что характеризует его криопротекторные свойства. Естественная биологическая среда, в которой находится большинство клеток, является изотонической (около 300 мОсмоль), однако для криоконсервации их помещают в гипертонические растворы, которыми являются криопротекторы, чтобы удалить воду из клетки, тем самым предотвратив образование повреждающих кристаллов льда.

Показано, что при добавлении в раствор с глицерином полисахаридов криоосмотические свойства среды изменялись в зависимости от концентрации и вида базидиального гриба. Так, статистически значимое ($p<0,05$) изменение показателей осмолярности и температуры замерзания раствора глицерина выявлено для полисахаридов *H. erinaceus* **BP16 в концентрациях** 0,2%, 0,6–1,0% (рис. 1а), *L. edodes* 0,6–0,8% (рис. 1б), *G. applanatum* 0,3–0,5%, 0,7–0,9% (рис. 1в). Возможно, повышение осмолярности и понижение температуры замерзания указанных смесей связано с образованием комплексов с глицерином в установленных концентрациях. Известно, что полисахариды обладают высокой комплексообразующей способностью и это обусловливает их широкий диапазон биологического действия. В данном случае это способствует связыванию большого числа молекул свободной внеклеточной воды, замедлению метаболизма и подготовке сперматозоидов к воздействию низкой температуры.

С большой вероятностью можно предположить, что способность полисахаридов оказывать влияние на процессы образования льда обусловлены конформационными особенностями строения их молекул и составом нейтральных моносахаридов, которые способны связывать молекулы свободной воды. Согласно данным литературы, полисахаридами базидиальных грибов могут быть β-глюканы, гетеро-β-глюканы, гетерогликаны или комплексы α-манно-β-глюканов, боковые цепи которых состоят из фрагментов глюкуроновой кислоты, ксилозы, галактозы, маннозы,

Таблица 1 / Table 1

Осмолярность (мОсм/л) и температура замерзания (°С) растворов веществ (%), используемых для замораживания сперматозоидов (Me, Q1; Q3, n=10)
Osmolarity (mOsm/L) and freezing point (°C) of solutions (%) used for freezing spermatozoa (Me, Q1; Q3, n=10)

Вещество Substance	Концентрация Concentration	Осмолярность Osmolarity	Температура замерзания растворов веществ Freezing point of solutions
Трис(гидрокси-метил)аминометан: Tris(hydroxymethyl)aminomethane:	2,75	226 (200; 248)	-0,431 (-0,389; -0,496)
+ полисахариды *H. erinaceus BP16* + polysaccharides *H. erinaceus BP16*	1,0	284 (282; 284)	-0,520 (-0,520; -0,521)
+ полисахариды *G. applanatum* I.+ polysaccharides *G. applanatum* I.	1,0	276 (274; 282)	-0,519 (-0,513; -0,553)
+ полисахариды *L. edodes* J. + polysaccharides *L. edodes* J.	1,0	268 (266; 269)	-0,496 (-0,495; -0,496)
+ глицерин / glycerol	5,0	880 (801; 986)	-1,652 (-1,507; -1,840)

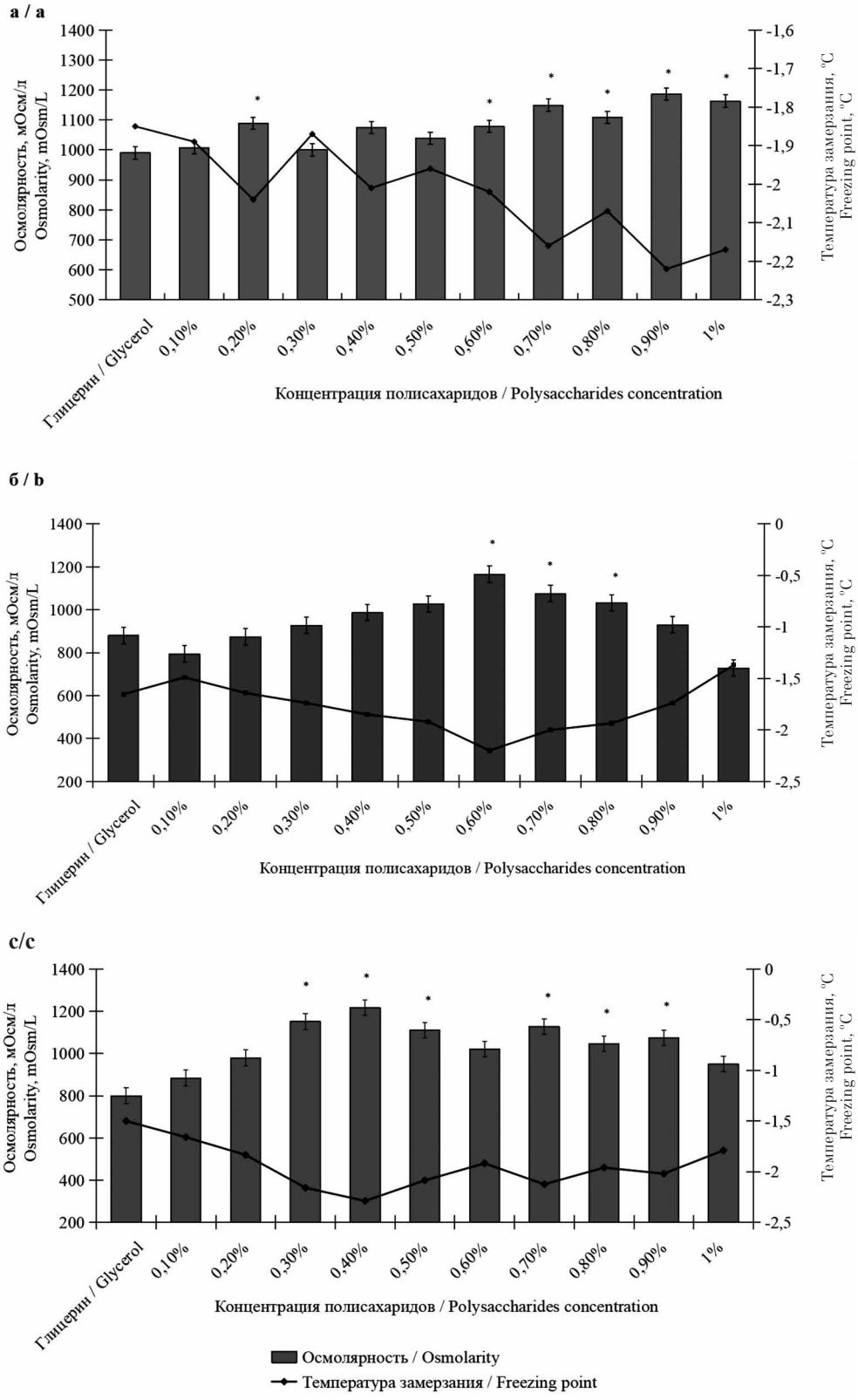

Рис. 1. Динамика изменения температуры замерзания и осмолярности раствора (n=10), содержащего глицерин (5,0%) и полисахариды *H. erinaceus* (а), *L. edodes* (б), *G. applanatum* (в) в различных концентрациях (0,1–1,0%). * – различие с величиной показателя «Глицерин» значимо (p<0,05)
Fig. 1. Dynamics of changes in freezing point and osmolarity of solution (n=10) containing glycerol (5,0%) and *H. erinaceus* (a), *L. edodes* (b), *G. applanatum* (c) polysaccharides in various concentrations (0,1–1,0%). * – the difference with the value of the "Glycerol" indicator is significant (p<0,05)

арабинозы или рибозы в различных комбинациях [15]. Ранее нами установлено, что в составе углеводных цепей полисахаридов широко известного своими биологическими свойствами базидиального гриба *H. erinaceus* ВР16 присутствуют в первую очередь глюкоза и галактоза, а также рамноза, фукоза, ксилоза, арабиноза и манноза [6, 7]. Преобладающим моносахаридом углеводных цепей *L. edodes* и *G. applanatum*, согласно данным литературы, является глюкоза [16], также присутствуют галактоза и манноза [17]. Можно предположить, что функциональные группы названных моносахаридов участвуют в процессах комплексообразования при смешивании спермы с консервантом и механизмах образования льда [18]. Например, криозащитное действие выявлено у полисахаридов мицелия и плодовых тел *Flammulina velutipes* [19], а также мицелия *Trametes ochracea* [4]. Кроме того, существует предположение о том, что проявлению у полисахаридов иммуномодулирующей активности способствует присутствие в его молекулах глюкозы и маннозы, к которым у макрофагов человека высокая специфичность [20]. Мы предполагаем, что возможным механизмом криозащитного эффекта у полисахаридов базидиальных грибов может быть также их антиоксидантное действие – способность прерывать цепную реакцию перекисного окисления липидов и блокировать повреждающее действие токсичными продуктами радикального процесса.

При смешивании спермы с разбавителем (ТРИС, глюкоза, мальтоза, лимонная кислота, глицерин, желток куриный, бидистиллированная вода) до охлаждения количество сперматозоидов фракции прогрессивно-подвижных

Таблица 2 / Table 2

Количество сперматозоидов (%) с разным характером движения после смешивания спермы с разбавителем и разбавителем с полисахаридами *H. erinaceus* ВР16 / *L. edodes* / *G. applanatum* до замораживания, а также через 28 сут хранения при –80 °С (Me, Q1–Q3)
Number of spermatozoa (%) with different movement patterns after mixing sperm with extender and extender with polysaccharides of *H. erinaceus* / *L. edodes* / *G. applanatum* before freezing, and after 28 days of storage at –80 °C (Me, Q1–Q3)

Серия / Series	Характер движения / Movement patterns		
	Прогрессивные подвижные Progressive motility	Непрогрессивные подвижные Non-progressive motility	Неподвижные No motility
Сперма / Sperm	53 (50–62)	25 (24–40)	16 (14–23)
Сперма с разбавителем / Sperm with extender	52 (50–55)	24 (23–42)	26 (19–27)
Сперма с разбавителем и полисахаридами *H. erinaceus* ВР16 / Sperm with extender and *H. erinaceus* ВР16polysaccharides	53 (49–70)	29 (18–31)	18 (15–34)
Сперма с разбавителем и полисахаридами *L. edodes* / Sperm with extender and *L. edodes* polysaccharides	49 (49–54)	34 (31–42)	17 (13–20)
Сперма с разбавителем и полисахаридами *G. applanatum* / Sperm with extender and *G. applanatum* polysaccharides	50 (45–53)	33 (32–48)	15 (14–23)
Через 28 суток хранения / After 28 days of storage			
Сперма с разбавителем / Sperm with extender	9 (6–13)	9 (8–12)	82 (79–87)
Сперма с разбавителем и полисахаридами *H. erinaceus* ВР16 / Sperm with extender and *H. erinaceus* ВР16polysaccharides	23 (17–28) *	10 (6–21)	66 (55–79) *
Сперма с разбавителем и полисахаридами *L. edodes* / Sperm with extender and *L. edodes* polysaccharides	22 (16–27) *	11 (7–23)	64 (55–80) *
Сперма с разбавителем и полисахаридами *G. applanatum* / Sperm with extender and *G. applanatum* polysaccharides	22 (14–27) *	15 (9–15)	67 (63–81) *

*Примечание: * – отличие от показателя «сперма с разбавителем» в данной серии статистически значимо p<0,05.*
*Note: * – the difference from the "sperm with extender" indicator in this series is statistically significant p<0.05.*

Таблица 3 / Table 3

Показатели кинематики у популяции прогрессивно-подвижных сперматозоидов после смешивания с разбавителем, в том числе с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 / *L. edodes* / *G. applanatum* до замораживания (Me, Q1–Q3)

Kinematic parameters in a population of progressively motile spermatozoa after mixing with a extender, including *H. erinaceus* BP16 / *L. edodes* / *G. applanatum* polysaccharides before freezing (Me, Q1–Q3)

Показатель кинематики Kinematic parameters	Сперма с разбавителем Sperm with extender	Сперма с разбавителем и полисахаридами *H. erinaceus* BP16 Sperm with extender and *H. erinaceus* BP16 polysaccharides	Сперма с разбавителем и полисахаридами *L. edodes* Sperm with extender and *L. edodes* polysaccharides	Сперма с разбавителем и полисахаридами *G. applanatum* Sperm with extender and *G. applanatum* polysaccharides
VAP (μm/s)	58,82 (46,75–66,69)	55,19 (41,18–56,90)	56,89 (40,37–65,57)	54,63 (39,12–65,14)
VSL (μm/s)	48,22 (33,30–57,71)	46,45 (32,08–52,26)	48,31 (33,08–58,16)	45,65 (31,23–53,28)
VCL (μm/s)	95,46 (74,82–110,86)	88,12 (73,45–86,87)	87,87 (72,92–107,72)	86,17 (66,61–101,49)
MAD (°)	50,65 (42,07–61,39)	54,10 (45,99–56,81)	55,90 (47,97–67,14)	50,35 (41,39–62,35)
LIN (%)	51,12 (42,98–58,47)	52,45 (43,19–52,45)	53,48 (42,09–60,29)	52,84 (44,86–61,05)
BCF (Hz)	90,08 (62,62–127,32)	75,11 (52,27–78,11)	65,01 * (49,70–93,25)	77,12 (57,84–100,75)

*Примечания к таблице 3 и рисунку 2: VAP – средняя траекторная скорость; VSL – прямолинейная скорость; VCL – криволинейная скорость; MAD – средний угловой градус; LIN (VSL/VCL) – линейность; BCF – перекрёстная частота биений; * – отличие от показателя с разбавителем статистически значимо p<0,05.*

*Notes to Table 3 and Figure 2: VAP – average path velocity; VSL – straight line velocity; VCL – curvilinear velocity; MAD – mean angular degree; LIN (VSL/VCL) – linearity; BCF – beat cross frequency; * – the difference from the indicator with the extender is statistically significant p<0.05.*

значимо не изменялось. При этом дополнительное введение в разбавитель любого из трёх используемых в работе типа полисахаридов в концентрации 0,25% также не имело эффекта (табл. 2). Это свидетельствует о том, что в используемые в работе полисахариды в их конечной концентрации в биологической среде 0,21% не влияют на кинематику клеток. Однако, как показали результаты, через 28 сут хранения биоматериала полисахариды способствуют сохранности подвижности гамет (табл. 2), следовательно, их применение в технологиях криоконсервации является важным.

Необходимо отметить, что полисахариды в среде разбавителя спермы после смешивания до охлаждения не оказывало значимого эффекта на показатели кинематики гамет (табл. 3). Исключением явилось снижение ($p<0,05$) перекрёстной частоты биений (BCF) при смешивании спермы с разбавителем, содержащим полисахариды *L. edodes*.

Показано (рис. 2), что через 28 суток консервации (–80 °C) в присутствии любого полисахарида в разведённой сперме более эффективно ($p<0,05$) сохраняются такие показатели, как скорость движения сперматозоидов по прямолинейному пути (VSL), скорость движения вдоль криволинейного пути (VCL), а также увеличивается показатель линейности движения (LIN), при этом показатель среднего углового смещения (MAD) снижается. Не изменяются показатели скорости движения сперматозоидов по среднему пути (VAP) и частота его пересечения (BCF). При этом целостность ДНК сперматозоидов также статистически выше у клеток, замороженных в присутствии полисахаридов *L. edodes* или *H. erinaceus* BP16 (рис. 3а). Количество жизнеспособных сперматозоидов, т. е. с мембраной, непроницаемой для красителя пропидий иодид (рис. 4, см. цв. вкладку VIII), также было статистически значимо выше у гамет, замороженных в присутствии данных полисахаридов (рис. 3б). Присутствие в среде сперматозоидов полисахаридов из *G. applanatum* при криоконсервации статистически значимого эффекта не оказало, однако имеет место тенденция в повышении показателей сохранности целостности ДНК и мембран клеток.

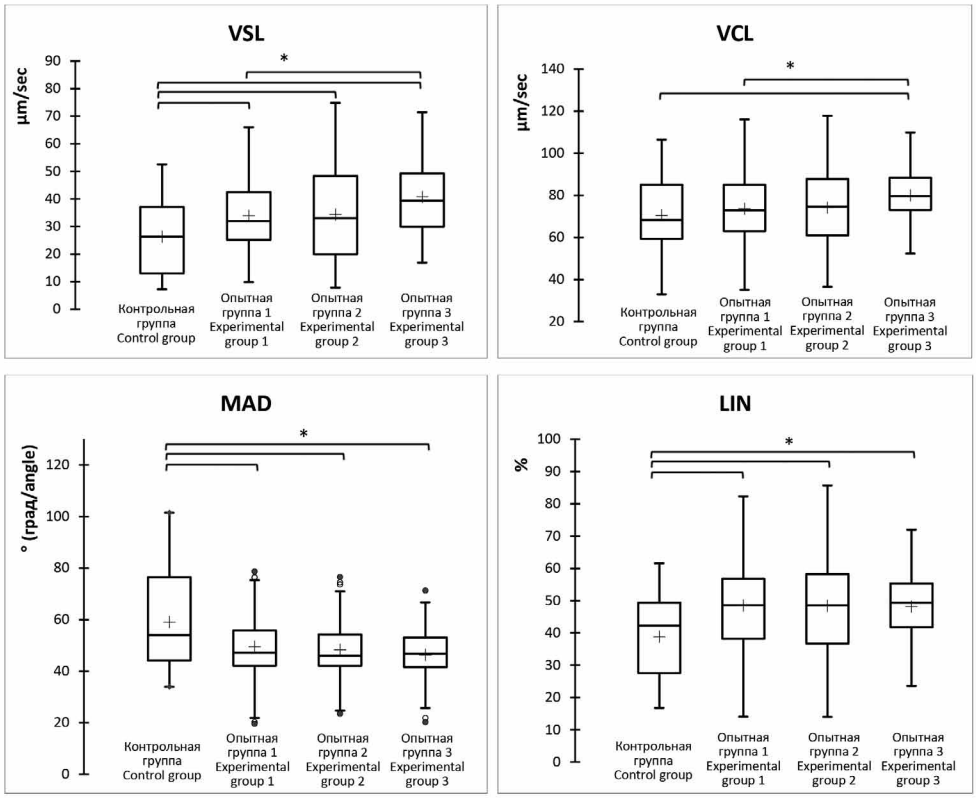

Рис. 2. Показатели подвижности у прогрессивной популяции сперматозоидов быков голштинской породы после 28 сут хранения при –80 °С в разбавителе на основе ТРИС (контрольная группа) и с добавлением в среду полисахаридов *G. applanatum* (опытная группа 1) / *L. edodes* (опытная группа 2) / *H. erinaceus* ВР16 (опытная группа 3); * – отличие между показателями статистически значимо $p<0,05$; условные обозначения см. в таблице 3

Fig. 2. Motility indices in a progressive population of Holstein bull spermatozoa after 28 days of storage at –80 °C in a TRIS-based extender (control group) and with the addition of *G. applanatum* (experimental group 1) / *L. edodes* (experimental group 2) / *H. erinaceus* BP16 (experimental group 3) polysaccharides in the medium; * – the difference between the indices is statistically significant $p<0,05$; for legend, see Table 3

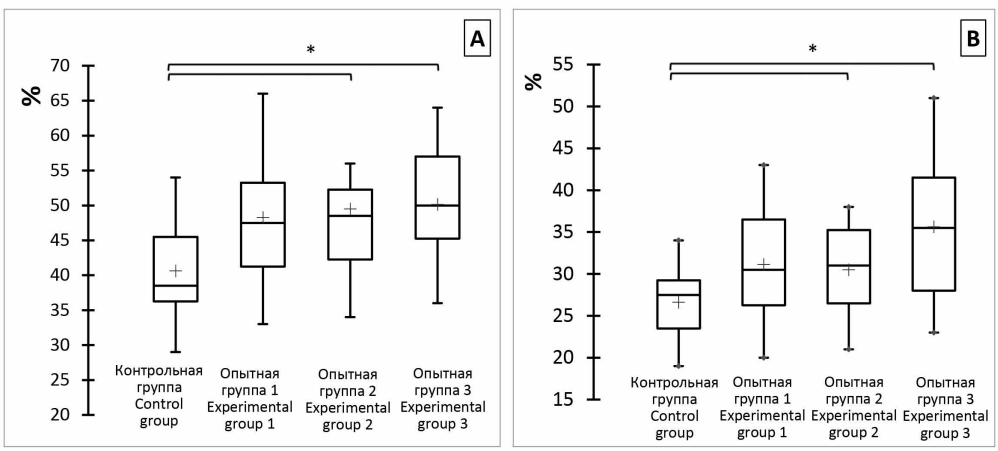

Рис. 3. Количество сперматозоидов (%) без повреждения ДНК (а) и клеточных мембран (б) после 28 сут хранения при –80 °С в разбавителе на основе ТРИС (контрольная группа) с добавлением в среду полисахаридов *G. applanatum* (опытная группа 1) / *L. edodes* (опытная группа 2) / *H. erinaceus* ВР16 (опытная группа 3); * – отличие между показателями статистически значимо $p<0,05$

Fig. 3. The number of spermatozoa (%) without damage to DNA (a) and cell membranes (b) after 28 days of storage at –80 °C in a TRIS-based extender (control group) with the addition of *G. applanatum* (experimental group 1) / *L. edodes* (experimental group 2) / H. *erinaceus* BP16 (experimental group 3) polysaccharides in the medium; * – the difference between the indicators is statistically significant $p<0,05$

Т. В. Полежаева, А. Н. Худяков, О. Н. Соломина, И. Г. Широких, О. О. Зайцева, М. И. Сергушкина, А. А. Широких, Д. В. Попыванов «Применение полисахаридов базидиальных грибов для криоконсервации спермы быков голштинской породы». С. 198.

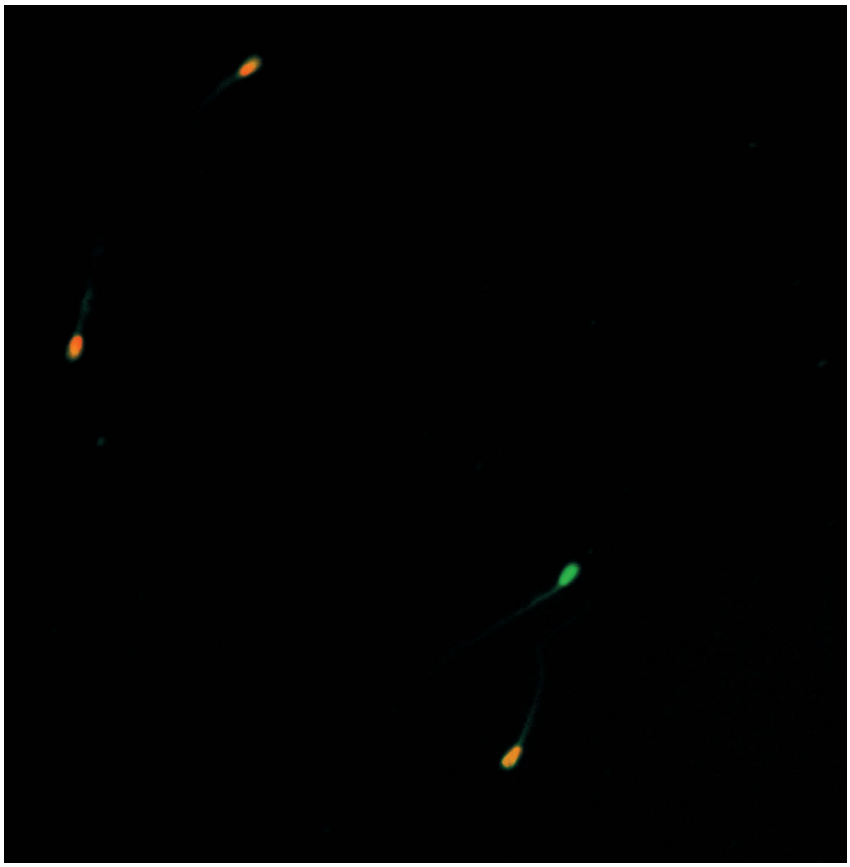

Рис. 4. Сперматозоиды быка с повреждённой мембраной (оранжевый цвет) и устойчивой к пропидий иодиду (зелёное окрашивание)
Fig. 4. Bull spermatozoa with damaged membrane (orange) and resistant to propidium iodide (green)

Заключение

В животном мире существует большое разнообразие механизмов, лежащих в основе образования, созревания, структуры и функционирования сперматозоидов. Фундаментальные исследования сперматологии направлены на изучение индивидуальной или популяционной приспособленности различных видов животных к изменяющимся условиям среды обитания. В связи с этим, крайне важно получать и длительно хранить генетический материал для последующего его использования. Как и в случае с редкими и находящимися под угрозой исчезновения видами, долгосрочное сохранение репродуктивных клеток сельскохозяйственных животных даёт дополнительные возможности для изучения и размножения генетически ценных пород животных в течение нескольких поколений. Для этих целей природоохранная селекция широко использует криобанки. Замораживание биологических образцов при температуре –80 °С (в промышленных морозильниках) или –196 °С (в резервуарах с жидким азотом) позволяет не только хранить материал, но и решать задачи, что ещё совсем недавно было невозможно.

Для эффективного хранения биоматериала нужны новые консерванты, поиск которых осуществляется в первую очередь среди природных полимеров – макромолекул, созданных самой природой без участия человека. Представленные в работе данные подтверждают эффективность применения полисахаридов базидиальных грибов с разным таксономическим положением – *G. applanatum*, *H. erinaceus* ВР16, *L. edodes* – в технологии криоконсервации спермы быков голштинской породы при –80 °С. В первую очередь, они могут быть использованы для сохранения подвижности гамет после отогрева, что является важным параметром фертильности. Нами выявлено, что через 28 сут хранения сперматозоидов при температуре –80 °С после их отогрева показатели кинематики у популяции прогрессивно подвижных гамет были значительно выше при условии нахождения в среде используемых полисахаридов. Кроме того, количество сперматозоидов без повреждения клеточной мембраны и ДНК было статистически выше при их замораживании в среде с полисахаридами из *H. erinaceus* ВР16 или *L. edodes*, что указывает на высокую перспективу применения данной группы веществ при разработке инновационных технологий длительного хранения генетического материала.

Исследование проведено согласно направлению НИР № FUUU-2022-0065 «Биофизические механизмы криозащиты биообъектов и взаимодействия специфических бактериофагов с рецепторами клеток иерсиний» и Государственного задания № FNWE-2025-0005 ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока.

References

1. Sponenberg D.P., Beranger J., Martin A.M., Couch C.R. Conservation of rare and local breeds of livestock // Rev. Sci. Tech. 2018. V. 37. No. 1. P. 259–267. doi: 10.20506/rst.37.1.2756

2. Braun V. The stuff of memories: planning hindsight in animal cryobanks // Soc. Stud. Sci. 2024. V. 54. No. 5. P. 728–748. doi: 10.1177/03063127241252081

3. Yeste M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs // Theriogenology. 2016. V. 85. No. 1. P. 47–64. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047

4. Polezhayeva T.V., Khudyakov A.N., Sergushkina M.I., Shirokikh I.G., Shirokikh A.A., Bezmeltseva O.M., Solomina O.N., Zaytseva O.O. Polypores of the Russian Plain as a source of polysaccharides with cryoprotective properties // Theoretical and Applied Ecology. 2017. No. 3. P. 103–110 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-3-103-109

5. Polezhaeva T.V., Shirokikh I.G., Sergushkina M.I., Nazarova Ya.I., Shirokikh A.A., Khudyakov A.N., Zaytseva O.O., Solomina O.N., Paturova I.G. Influence of polysaccharides from *Hericium erinaceus* BP 16 on phagocytic activity of human blood neutrophils // Theoretical and Applied Ecology. 2020. No. 2. P. 166–171 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2020-2-166-171

6. Shirokikh I.G., Polezhaeva T.V., Shirokikh A.A., Khudyakov A.N., Sergushkina M.I., Nazarova Ja.I., Paturova I.G. Cryoprotective properties of the polysaccharide fraction of the mushroom *Hericium erinaceus* BP 16 // Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 2020. V. 47. P. 1–6. doi: 10.1134/S1062359020010124

7. Solomina O.N., Sergushkina M.I., Shirokih A.A., Polezhaeva T.V., Shirokih I.G., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N. *Hericium erinaceus* BP 16 as a source of polysaccharides stabilizing the functions of bulls spermatozoa during hypothermic storage // Theoretical and Applied Ecology. 2021. No. 3. P. 212–218 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2021-3-212-218

8. Polezhaeva T.V., Solomina O.N., Khudyakov A.N., Shirokikh A.A., Popyvanov D.V., Sergushkina M.I., Zaitseva O.O., Shirokikh I.G. Basidial fungal polysaccharides increase the quality of bovine reproductive cells when frozen // Theoretical and Applied Ecology. 2024. No. 1. P. 40–53 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2024-1-040-053

9. Elkhateeb W.A., Zaghlol G.M., El-Garawani I.M., Ahmed E.F., Rateb M.E., Abdel Moneim A.E. *Ganoderma applanatum* secondary metabolites induced apoptosis

through different pathways: *in vivo* and *in vitro* anticancer studies // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 101. P. 264–277. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.058

10. Han Y., Huang J., Zhao C., Zhang F., Gu Y., Wang C., Jin E. *Hericium erinaceus* polysaccharide improves the microstructure, immune function, proliferation and reduces apoptosis of thymus and spleen tissue cells of immunosuppressed mice // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2023. V. 87. No. 3. P. 279–289. doi: 10.1093/bbb/zbac198

11. Roszczyk A., Turło J., Zagożdżon R., Kaleta B. Immunomodulatory properties of polysaccharides from *Lentinula edodes* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. No. 16. Article No. 8980. doi: 10.3390/ijms23168980

12. Ponomarenko E.A., Makarova O.V., Kosyreva A.M., Kondashevskaya M.V., Diatroptova M.A., Tsvetkov I.S., Stepanov A.A., Mikhailova L.P., Artemyeva K.A. Comparative characteristics of spermatogenic cells isolation methods // Clinical and experimental morphology. 2019. V. 8. No. 3. P. 55–63 (in Russian). doi: 10.31088/CEM2019.8.3.55-63

13. Ploskonos M.V. The application of eosin and propidium iodide in evaluation of vitality of human spermatozoa // Clinical laboratory diagnostics. 2014. No. 11. P. 22–25 (in Russian).

14. Martins C.F., Dode M.N., B o S.S., Rumpf R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA // Genet. Mol. Res. 2007. V. 6. No. 1. P. 94–104.

15. Zhang J., Liu Y., Tang Q., Zhou S., Feng J., Chen H. Polysaccharide of *Ganoderma* and its bioactivities // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1181. P. 107–134. doi: 10.1007/978-981-13-9867-4_4

16. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvić M. M., Todorović N., Jakovljević D., Van Griensven L.J.L.D. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* // J. Food Compos. Anal. 2012. V. 26. No. 1–2. P. 144–153. doi: 10.1016/j.jfca.2012.02.004

17. Chen S., Liu C., Huang X., Hu L., Huang Y., Chen H., Fang Q., Dong N., Li M., Tang W., Nie S. Comparison of immunomodulatory effects of three polysaccharide fractions from *Lentinula edodes* water extracts // J. Funct. Foods. 2020. V. 66. Article No. 103791. doi: 10.1016/j.jff.2020.103791

18. Carrión O., Delgado L., Mercade E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1 // Carbohydr. Polym. 2015. V. 117. P. 1028–1034. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.060

19. Kawahara H., Matsuda Y., Sakaguchi T., Arai N., Koide Y. Antifreeze activity of xylomannan from the mycelium and fruit body of *Flammulina velutipes* // Biocontrol. Sci. 2016. V. 21. No. 3. P. 153–159. doi: 10.4265/bio.21.153

20. Ferreira I.C.F.R., Heleno S.A., Reis F.S., Stojkovic D., Queiroz M.J.R.P., Vasconcelos M.H., Sokovic M. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities // Phytochemistry. 2015. V. 114. P. 38–55. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.011