

## Полисахариды базидиальных грибов повышают качество репродуктивных клеток быков при замораживании

© 2024. Т. В. Полежаева<sup>1</sup>, д. б. н., зав. лабораторией, О. Н. Соломина<sup>1</sup>, к. б. н., н. с., А. Н. Худяков<sup>1</sup>, к. б. н., с. н. с., А. А. Широких<sup>2</sup>, д. б. н., в. н. с., Д. В. Попыванов<sup>2</sup>, к. б. н., зав. лабораторией, М. И. Сергушкина<sup>1</sup>, м. н. с., О. О. Зайцева<sup>1</sup>, к. б. н., с. н. с., И. Г. Широких<sup>2</sup>, д. б. н., зав. лабораторией,

<sup>1</sup>Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, 167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, д. 50,

<sup>2</sup>Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого, 610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а, e-mail: ddic@yandex.ru, irgenal@mail.ru

К числу ключевых проблем экологии относится снижение разнообразия видов животных и растений на планете. Одним из возможных способов противодействия данной негативной тенденции является разработка передовых репродуктивных технологий по использованию гамет для восстановления генетического разнообразия. Важная роль в этом процессе отводится криобанкам. Традиционным способом длительного хранения репродуктивных клеток является их криоконсервация при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  с применением хладоограждающих сред на основе синтезированных веществ (глицерин, диметилсульфоксид и др.). Однако цитотоксичность, нарушение фертильности и другие недостатки при использовании традиционных криопротекторов являются причиной поиска новых эффективных заменителей. Кроме того, актуальным является и расширение температурного диапазона хранения биоматериала, в частности, – с использованием условий электрических морозильников. Широкий спектр биологического действия полисахаридов базидиальных грибов позволил сделать предположение об эффективности их применения в составе среды для криоконсервирования клеток. В данной работе представлены результаты сравнительного исследования параметров спермы быков голштинской породы, подвергнутой замораживанию до  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  и хранению при указанной температуре в течении 7 сут в среде сертифицированного GMP разбавителя для замораживания спермы быков и других жвачных животных AndroMed® (Minitübe, Германия) при дополнительном введении в его состав полисахаридов базидиальных грибов *Hericium erinaceus* BP16, *Flammulina velutipes* FARC D1 и *Ganoderma applanatum* GA. Значимым эффектом повышения качества репродуктивных клеток в используемой технологии криоконсервирования обладают полисахариды *Hericium erinaceus* BP16 и *Ganoderma applanatum* GA.

**Ключевые слова:** *Hericium erinaceus* BP16, *Flammulina velutipes* FARC D1, *Ganoderma applanatum* GA, полисахариды, AndroMed®, сперматозоиды, криоконсервирование.

## Basidial fungal polysaccharides increase the quality of bovine reproductive cells when frozen

© 2024. T. V. Polezhaeva<sup>1</sup> ORCID: 0000-0003-4999-3077, O. N. Solomina<sup>1</sup> ORCID: 0000-0001-5187-8698, A. N. Khudyakov<sup>1</sup> ORCID: 0000-0003-3757-8263, A. A. Shirokikh<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-7808-0376, D. V. Popyvanov<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-4978-4542, M. I. Sergushkina<sup>1</sup> ORCID: 0000-0002-3113-527X, O. O. Zaitseva<sup>1</sup> ORCID: 0000-0001-9427-0420, I. G. Shirokikh<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-3319-2729

<sup>1</sup>Institute of Physiology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, FRC Komi SC UB RAS, 50, Pervomayskaya St., Syktывkar, Russia, 167982,

<sup>2</sup>Federal Agricultural Research Center of North-East named N. V. Rudnitsky, 166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007, e-mail: ddic@yandex.ru, irgenal@mail.ru

The global decline in the animal and plant species diversity is among the key environmental problems of the modern world. One possible way to solve this problem is to develop advanced reproductive technologies using gametes to restore genetic diversity. Cryobanks play an important role in this. The traditional method of long-term storage of reproductive cells is their cryopreservation at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  using cryoprotective media based on synthesized substances (glycerin, dimethyl sulfoxide, etc.). The reason for searching new effective substitutes is cytotoxicity, impaired fertility and other disadvantages when using traditional cryoprotectors. In addition, it is relevant to expand the temperature range of biomaterial storage, in particular using the conditions of electric freezers. The wide range of biological effects of polysaccharides of basidiomycetes allowed us to make an assumption about the effectiveness of their use in the composition of the medium for cell cryopreservation. This paper presents the results of a comparative study of the effectiveness of polysaccharides of xylotrophic basidiomycetes in the composition of the medium for storage of the Holstein bull semen. The semen was frozen to  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  and stored at the specified temperature for 7 days in AndroMed® (Minitübe, Germany) – certified extender for freezing the semen of bulls and other ruminants. Additional introduction into its composition of polysaccharides from the basidiomycetes *Hericium erinaceus* BP16 / *Ganoderma applanatum* GA significantly improves the quality of reproductive cells in the used cryopreservation technology.

**Keywords:** *Hericium erinaceus* BP16, *Flammulina velutipes* FARC D1, *Ganoderma applanatum* GA, polysaccharides, AndroMed®, spermatozoa, cryopreservation.

К числу ключевых экологических проблем современности относится снижение разнообразия видов животных и растений на планете. Мир переживает шестое массовое вымирание, которое в отличие от предыдущих событий, вызвано деятельностью человека и является самым значительным по утрате биоразнообразия. Скорость сокращения видов животных и растений в 1000–10 000 раз превышает естественную, что является катастрофической угрозой нашему собственному выживанию. Утрата любого биологического вида может явиться угрозой как отдельным биоценозам, так и экологической системе в целом. Виды, находящиеся под угрозой исчезновения в связи с сокращением их численности или в связи с уменьшением ареалов обитания, не смогут самостоятельно выжить без помощи человека. Одним из возможных способов решения данной экологической проблемы является разработка передовых репродуктивных технологий по использованию гамет для восстановления генетического разнообразия и воспроизводства особей исчезающих видов [1]. Важную роль в этом процессе выполняют криобанки. Большинство криобанков занимается вопросами криоконсервации гамет (в первую очередь, спермы) и эмбрионов. Их основная цель состоит в получении потомства с использованием вспомогательных репродуктивных технологий, которые включают в себя искусственное оплодотворение, экстракорпоральное оплодотворение и трансплантацию эмбрионов. Кроме того, данные технологии имеют огромное значение в развитии животноводства. В частности, метод криоконсервирования спермы быка является одним из основных технологических приёмов интенсификации мясного и молочного скотоводства на основе генотипической селекции. Научные разработки в области криобиологии спермы

сельскохозяйственных животных ведутся в различных направлениях.

Традиционным способом длительного хранения репродуктивных клеток является их криоконсервация при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  с применением хладоограждающих сред на основе синтезированных веществ: глицерин, диметилсульфоксид и др. [2, 3]. Однако, токсичность, нарушение фертильности и другие недостатки использования указанных выше протекторов являются причиной поиска новых эффективных заменителей. Состав и физико-химические свойства консервирующих сред являются определяющими при подготовке спермы к низкотемпературному хранению или замораживанию. Актуальным является также расширение температурного диапазона хранения биообъекта, в частности с использованием условий электрических морозильников.

Продукт сертифицированного GMP производства Minitübe – разбавитель для замораживания спермы быков и других жвачных животных AndroMed® обеспечивает высокую сохранность сперматозоидов при температурах жидкого азота или его паров, не содержит ингредиенты животного происхождения, не несёт риск микробиологического заражения [4], но вопрос о сохранности гамет при других температурах с использованием AndroMed® остаётся открытым. Установлено, что при добавлении 2–4% экстракта древесины луназии горькой (*Lunasia amara* Blanco), обладающего антиоксидантными свойствами, в разбавитель Andromed® увеличивается подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, хранившихся при  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течении 5 сут [5].

Исследования последних 10–15 лет свидетельствуют о том, что базидиальные грибы являются доступным источником биологически активных веществ. В частности, препараты,

получаемые на основе полисахаридного комплекса *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., оказывают не только антиоксидантный эффект [6], но и гепатопротекторный [7], гиполипидемический [8], антимикробный [9], противоопухолевый [10], иммуномодулирующий [11], гастропротекторный [12], нейропротекторный [13] и другие. Полисахариды из плодовых тел *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer оказывают выраженное иммуностимулирующее, антиоксидантное, омолаживающее, снижающее уровень холестерина, противоопухолевое действие [14, 15]. Кроме того, имеющийся в составе данного базидиального гриба ксилотрофный обладает антифризным эффектом [16]. Соединения с выраженными противоопухолевыми, антибактериальными, противогрибковыми свойствами содержит *Ganoderma applanatum* ((Pers.) Pat.) [17, 18].

Широкий спектр биологического действия полисахаридов базидиальных грибов позволил сделать предположение об эффективности их применения в составе среды для разбавления и замораживания спермы AndroMed®.

Цель работы – определение эффективности применения полисахаридов ксилотрофных базидиальных грибов разного таксономического положения: *Hericium erinaceus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum* в составе сертифицированного разбавителя для спермы быков и других жвачных животных AndroMed® при температуре электрического морозильника –5 °С.

### Объекты и методы исследования

В работе были использованы мицелиальные культуры природных изолятов ксилотрофных базидиальных грибов *Hericium erinaceus* (Russulales: Hericiaceae) BP16 (регистрационный номер EU784264.1 в NSBI), *Flammulina velutipes* (Agaricales: Physalacriaceae) FARC D1 (OR985108.1 в NSBI), *Ganoderma applanatum* (Polyporales: Ganodermataceae) GA (ON130353.1 в NSBI).

Мицелиальные культуры *H. erinaceus* BP16 и *F. velutipes* FARC D1 выращивали на суслоагаре (пивное сусло, разведённое водой до 4° по шкале Баллинга). Посевной мицелий каждого из грибов выращивали на стерильном зерне овса при 28 °С. Для получения плодовых тел грибов использовали субстрат из соломы, зерна и дубовых опилок, взятых в объёмном соотношении 6:3:1. В подготовленный автоклавированием (1 Ати, 30 мин) субстрат асептически вносили посевной зерновой мицелий

в количестве 5% от массы субстрата одного из грибных штаммов. Ёмкости с засеянным субстратом инкубировали при комнатной температуре (20±1 °С) до появления плодовых тел. После сбора плодовые тела высушивали при 60 °С для сохранения ценных свойств.

Для извлечения полисахаридов сухую биомассу грибов *H. erinaceus* BP16 и *F. velutipes* FARC D1 измельчали и заливали горячей дистиллированной водой (70 °С). По истечении 8 ч экстракции полисахариды осаждали добавлением 96% этанола (1:4, V/V). Полученный осадок отделяли центрифугированием (13 000 об./мин, в течение 40 мин), растворяли в дистиллированной воде (1:1, V/V), высушивали на воздухе.

Качественный и количественный состав моносахаридов в составе углеводных цепей полученных фракций грибов *H. erinaceus* BP16 и *F. velutipes* FARC D1 определяли, как было описано ранее [19].

Полисахариды гриба *G. applanatum* GA получали из культуральной жидкости. Для этого изолят выращивали в жидкой среде из пивного сусла, разведённого до 4° по Баллингу, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 20 сут при температуре 25 °С. С целью выделения фракции полисахаридов культуральная жидкость была отфильтрована от мицелиальной биомассы и упарена при температуре 50 °С до постоянной массы.

Осмолярные концентрации (мОсм/л) и температуры замерзания водных растворов веществ определяли с помощью осмометра-криоскопа ОСКР-1 (НПП «Буревестник», Россия). Оценивали 25% водный раствор разбавителя для замораживания сперматозоидов быка и других жвачных животных AndroMed® (Minitübe, Германия), а также 12,5% раствор AndroMed®, в котором концентрация полисахаридов *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA составила 0,25%. Абсолютная погрешность при определении осмолярной концентрации вещества в диапазоне измерений от 0 до 500 мОсм/л составляла 2,0; температуры замерзания в диапазоне от –0,930 до –3,720 °С составляла ±0,010. Исследуемый раствор, объёмом 0,3 мл, помещали в пластиковую кювету, погружали в неё измерительный элемент и устанавливали в камеру прибора.

Быки-производители голштинской породы (n = 20; возраст 5–6 лет) – постоянные доноры спермы, содержались на предприятии АО «КировПлем» (Россия). Условия содержа-

ния поддерживались оптимальными и одинаковыми для каждого быка. Сперму собирали с использованием искусственного влагалища (42 °С). Свежеполученную сперму разбавляли в соотношении 1:1 с 25% водным раствором AndroMed® (Minitübe, Германия) в контрольной серии или с 25% водным раствором AndroMed® с добавлением полисахаридной фракции *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA в концентрации 0,4% в опытной группе. Следовательно, конечная концентрация веществ в сперме составила 12,5% и 0,2% соответственно. Смесь разливали по полимерным коническим микропробиркам по 0,5 мл и помещали в воздушную среду холодильника ТВЛ-К 050Б (ЗАО «ИнСовт») при –5 °С для хранения. Отогрев осуществляли в водной ванне при +37 °С через 7 сут хранения.

Анализ биологических параметров спермы проводили с помощью системы Аргус-CASA, которая включает фазово-контрастный микроскоп (CX43RF Olympus, Япония), программное обеспечение, цифровую камеру, ПК, укомплектованный принадлежностями. Для этого каплю спермы быков вносили в счётную камеру Маклера (Counting chamber Makler®, Sefi Medical, Israel) и накрывали покровным стеклом. Исследовали каплю спермы на следующих этапах: после взятия, после смешивания с опытным и контрольным растворами, после отогрева.

Подвижность сперматозоидов, распределение скорости и кинематика были проанализированы с помощью компьютерного анализа их движения (частота кадров 60 Гц/сек, количество кадров 30, минимальный контраст клеток 15, минимальный размер клетки (пиксель) 8, интенсивность клеток, пороговая прямолинейность 80, средний VAP 25  $\mu\text{m/s}$ , низкий уровень VAP 5,0, VSL 0,05  $\mu\text{m/s}$ ). **Вся совокупность зафиксированных клеток делилась по характеру движения на три популяции – прогрессивные, непрогрессивные и неподвижные.** В работе рассматриваются только прогрессивно подвижные сперматозоиды, как основной объект дальнейшей консервации. У популяции прогрессивно подвижных сперматозоидов оценивали следующие показатели: криволинейную скорость VCL (мкм/с), прямолинейную скорость VSL (мкм/с), среднюю скорость пути VAP (мкм/с), амплитуду бокового смещения головы ALH (мкм), среднее угловое смещение MAD (град), линейность LIN (%), колебание WOB (%), прямолинейность STR (%), перекрёстная частота биений BCF (Гц). Оценивали не менее 200 спермато-

зоидов по каждому параметру подвижности из предусмотренных протоколом исследования программы АргусCASA.

Оценку целостности ДНК сперматозоидов проводили по методу [20] с использованием микроскопа тринокулярного люминесцентного Микромед 3 ЛЮМ (Россия). Для этого на предметном стекле при 37 °С делали мазок. Стёкла высушивали на воздухе с последующим погружением в раствор Карнуа (60% этанола, 30% хлороформа и 10% ледяной уксусной кислоты, 1 г хлорида железа) на 120 мин при комнатной температуре (25 °С) в гистологических банках. Затем предметные стёкла высушивали на воздухе вертикально, обрабатывали буфером (15 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и 80 ммоль/л лимонной кислоты; pH 2,5) в течение 10 мин при 75 °С. Далее окрашивали раствором акридинового оранжевого (0,2 мг на мл дистиллированной воды) из расчёта 300 мкл на предметное стекло. Головку сперматозоида оценивали на наличие повреждённой и интактной ДНК под микроскопом (увеличение  $\times 400$ ; возбуждение/барьерный фильтр 490/550 нм). При оранжево-красной флуоресценции ДНК считали повреждённой, при зелёной флуоресценции – неповреждённой. Подсчёт проводили на 100 клеток (%).

Оценку нарушений упаковки хроматина в сперматозоидах выполнили с помощью окраски гамет раствором анилинового синего [20]. Для этого на предметном стекле при 37 °С делали мазок из исследуемой спермы. После высушивания стекло помещали в раствор красителя (0,5 г анилинового синего, 48 мл бидистиллированной воды, 2 мл ледяной уксусной кислоты) на 5 мин. Далее промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и подсчитывали число окрашенных и неокрашенных гамет на 100 клеток (%) с помощью светового микроскопа Nikon H550S (Япония).

Для определения нормальности проводили анализы с использованием теста Шапиро-Уилка. Результаты исследования представлены в виде медианы, 25-го и 75-го центилей (Me, Q1–Q3). Для оценки различий использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, считая различия значимыми при  $p < 0,05$ . Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения «StatTech ver. 3.1.1».

### Результаты и обсуждение

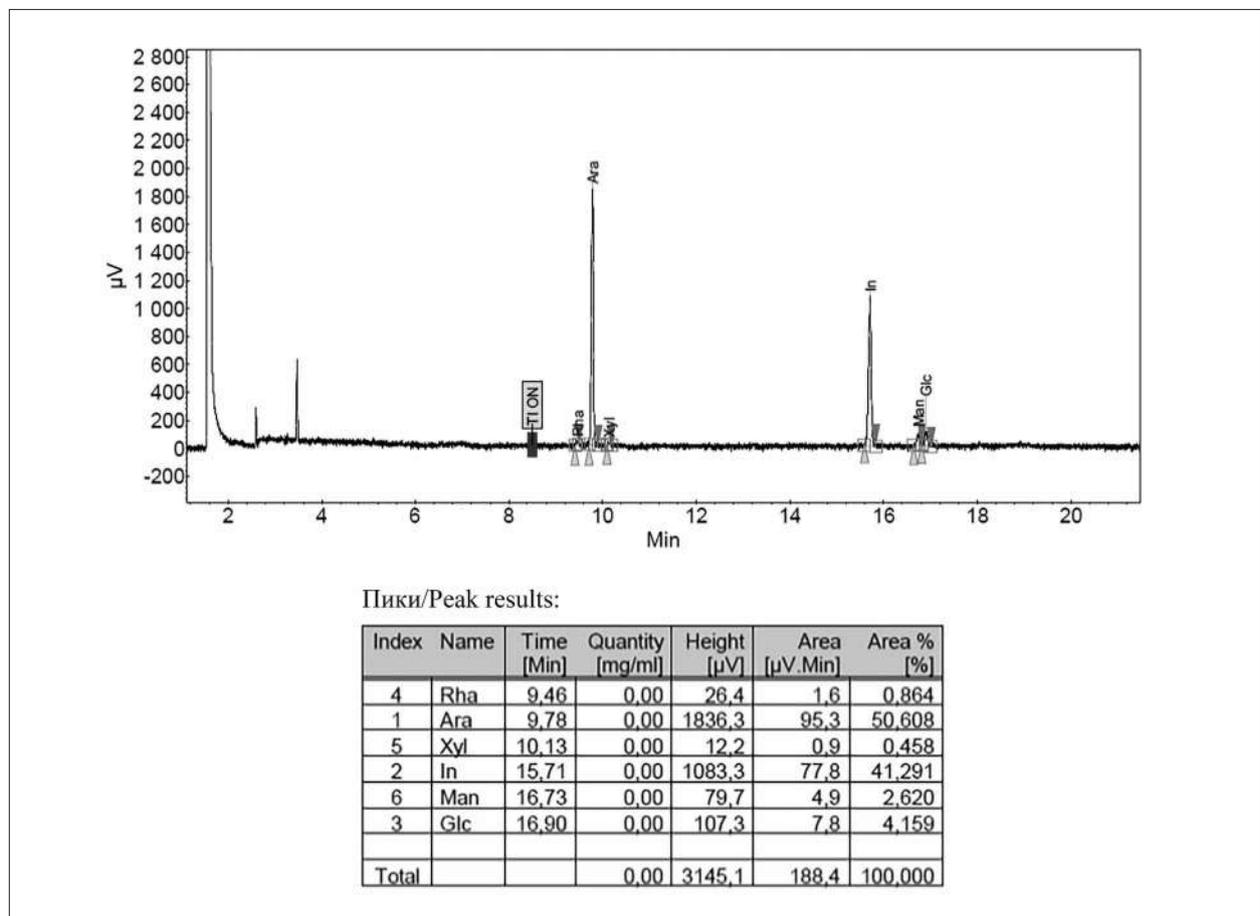
Ранее нами установлено, что в составе углеводных цепей полисахаридов *H. erinaceus*

ВР16 присутствуют остатки следующих нейтральных моносахаридов: рамнозы (2,35%), фукозы (2,68%), ксилозы (0,3%), арабинозы (6,79%), маннозы (5,01%), глюкозы (9,14%) и галактозы (9,62%) [19, 21]. Согласно данным литературы, углеводные цепи *F. velutipes* содержат глюкозу, маннозу и ксилозу в соотношении 3,5:0,8:1,4 [16]. Из плодовых тел искусственно культивированного гриба *F. velutipes* FARC D1 выделена полисахаридная фракция, в составе углеводных цепей которой с помощью газо-жидкостной хроматографии идентифицированы остатки рамнозы, ксилозы, арабинозы, маннозы и глюкозы в соотношении 1:0,1:50:3:4 (рис. 1). Из литературы известно, что в составе *G. applanatum* GA глюкоза является преобладающим моносахаридом [22].

Анализ современных исследований в области криоконсервации биологических объектов указывает на то, что использование

природных полимеров при замораживании биологических объектов является эффективным. Структура данных веществ богата функциональными группами, образующими связи с молекулами воды [23]. Способностью модулировать процесс кристаллизации льда обладают, в первую очередь, углеводные компоненты. Особое внимание уделяется макромолекулам, имеющим в своём составе углеводную основу – от гликозидов до полисахаридов [24, 25]. По данным литературы, криозащитным действием могут обладать полисахариды некоторых базидиальных грибов. В частности, ксилосманнан из мицелия и плодовых тел базидиального гриба *Flammulina velutipes* [16], полисахаридная фракция мицелия грибов *Trametes ochracea* [26] или *Hericium erinaceus* [19].

С помощью криоскопического метода установлено, что полисахариды *H. erinaceus* ВР16 в концентрации 0,2% повышают осмо-



**Рис. 1.** Результаты газо-жидкостной хроматографии: разделение моносахаридов (Rha – рамноза, Xyl – ксилоза, Ara – арабиноза, Man – манноза и Glc – глюкоза) в виде соответствующих ацетатов полиолов после полного кислотного гидролиза полисахаридной фракции *F. velutipes* FARC D1. Мио-инозит (In) использован в качестве внутреннего стандарта  
**Fig. 1.** Gas-liquid chromatography results: monosaccharide separation (Rha – rhamnose, Xyl – xylose, Ara – arabinose, Man – mannose and Glc – glucose) in the form of the corresponding polyol acetates after complete acid hydrolysis of the *F. velutipes* FARC D1 polysaccharide fraction. Myo-inositol (In) is an internal standard

лярность 12,5% раствора AndroMed® с 615 до 720 мОсм/л, что способствует изменению температуры его замерзания с  $-1,15$  до  $-1,35$  °C. Полисахариды *F. velutipes* FARC D1 соответственно повышают осмолярность 12,5% раствора AndroMed® до 790 мОсм/л, что способствует изменению температуры его замерзания до  $-1,48$  °C, а полисахариды *G. applanatum* GA – до 932 мОсм/л и до  $-1,75$  °C соответственно. Таким образом, используемые в работе полисахариды в разной степени влияют на криоосмотические свойства 12,5% водного раствора AndroMed®. Более выраженный эффект выявлен для полисахаридов *Ganoderma applanatum*. Также показано, что 1% водные растворы *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA имеют близкую осмолярность 47 / 43 и 41 мОсм/л и температуру кристаллизации  $-0,071$  /  $-0,063$ ,  $-0,059$  °C соответственно. Возможно, между полисахаридами и криопротектором глицерином, который присутствует в составе AndroMed®, образуются комплексы. Данные комплексы, по нашему мнению, связывают больше молекул воды, чем каждый компонент по отдельности. На это указывает повышение осмолярности раствора AndroMed® в присутствии полисахарида.

Мы полагаем, что в присутствии комплексов «глицерин-полисахарид» на начальных этапах охлаждения температура кристаллизации воды в клетках будет смещаться в диапазон более низких температур. Это позволит постепенно замедлить клеточный метаболизм и скорость образования льда, что будет способствовать появлению мелкоячеистой и менее травматичной структуры льда, обеспечит выживаемость сперматозоидов. Кроме того, полисахариды являются крупными молекулами, которые не способны проникать через клеточную мембрану, следовательно, свой защитный эффект они оказывают во внеклеточной среде, тогда как глицерин имеет малый размер молекулы и способен проникать через мембрану. Важно отметить, что образование комплексов между глицерином и полисахаридами может уменьшить токсичность протектора.

Установлено, что при смешивании спермы перед охлаждением с раствором AndroMed® количество (% Me, Q1–Q3) прогрессивно подвижных сперматозоидов статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижается, а непрогрессивно подвижных повышается при добавлении полисахаридов *H. erinaceus* BP16 или *F. velutipes* FARC D1 (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Количество сперматозоидов (%) с разным характером движения после смешивания спермы с разбавителем AndroMed®, в том числе с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA до замораживания (Me, Q1–Q3)  
 Number of spermatozoa (%) with different movement patterns after mixing sperm with AndroMed® extender, including *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA polysaccharides before freezing (Me, Q1–Q3)

Серия Series	Характер движения / Movement patterns		
	Прогрессивные подвижные Progressive motility	Непрогрессивные подвижные Non-progressive motility	Неподвижные Immobile
Сперма / Sperm	53 (50,5–54)	26 (13–30,5)	21 (13–18)
Сперма с AndroMed® Sperm with AndroMed®	61 (46–66,5)	14 (12,5–14)	36 (15,5–40)
Сперма с AndroMed® и полисахаридами <i>H. erinaceus</i> BP16 Sperm with AndroMed® and <i>H. erinaceus</i> BP16 polysaccharides	41 (38–43)*	33 (17–36,5)*	27 (23–47)
Сперма с AndroMed® и полисахаридами <i>F. velutipes</i> FARC D1 / Sperm with AndroMed® and <i>F. velutipes</i> FARC D1 polysaccharides	27 (19–34,5)*	36 (27,5–44)*	36 (35–38)
Сперма с AndroMed® и полисахаридами <i>G. applanatum</i> GA Sperm with AndroMed® and <i>G. applanatum</i> GA polysaccharides	52 (47,5–53)	26 (20,5–32)	21 (19–25,5)

Примечание: \* – отличие от показателя сперма с AndroMed® статистически значимо  $p < 0,05$ .  
 Note: \* – the difference from the sperm with AndroMed® is statistically significant  $p < 0.05$ .

Таблица 2 / Table 2

Показатели подвижности у популяции прогрессивных сперматозоидов после смешивания с разбавителем AndroMed® (контрольная группа), в том числе с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 (опытная группа) до замораживания (Me, Q1–Q3)  
 Motility indicators in a population of progressive mobile spermatozoa after mixing with AndroMed® extender (control), including *H. erinaceus* BP16 polysaccharides (experimental) before freezing (Me, Q1–Q3)

Показатель кинематики Kinematics indicator	Контрольная группа Control		Опытная группа Experimental	
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3
VAP (µm/s)	47,94	35,49–57,98	40,40*	25,12–53,20
VSL (µm/s)	33,31	20,36–44,71	30,78	18,74–39,73
VCL (µm/s)	74,65	56,79–90,39	69,27	56,19–83,82
ALH (µm)	2,13	1,73–2,99	2,27	1,88–3,02
MAD (°)	50,09	43,69–59,44	53,94	46,89–59,41
LIN (%)	46,34	28,73–57,28	44,13	30,67–52,38
WOB (%)	65,16	56,52–72,78	56,46*	39,58–68,07
STR (%)	75,28	55,95–86,74	75,71	57,38–92,63
BCF (Hz)	7,99	3,51–12,44	6,00*	4,26–8,66

Примечания: VAP – средняя траекторная скорость; VSL – прямолинейная скорость; VCL – криволинейная скорость; ALH – амплитуда бокового отклонения головы; MAD – средний угловой градус; LIN (VSL/VCL) – линейность; WOB (VAP/VCL) – раскачивание; STR (VSL/VAP) – прямолинейность; BCF – перекрёстная частота биений; \* – отличие от показателя AndroMed® статистически значимо  $p < 0,05$ .

Notes: VAP – average trajectory speed; VSL – straight line speed; VCL – curvilinear speed; ALH – amplitude of lateral head deviation; MAD – average angular degree; LIN (VSL/VCL) – linearity; WOB (VAP/VCL) – swinging; STR (VSL/VAP) – straightness; BCF – cross beat frequency; \* – the difference from the AndroMed® indicator is statistically significant  $p < 0.05$ .

При этом наблюдается статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение некоторых показателей кинематики. Например, в опытах с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 снижаются показатели подвижности VAP (мкм/с), WOB (%), BCF (%) (табл. 2).

Установлено, что через 1 сут хранения материала при  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  и последующего отогрева способность к прогрессивному движению сохраняется у единичных сперматозоидов в среде AndroMed®, тогда как при температуре  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  подвижность гамет даже через 7 сут хранения материала остаётся на уровне, достаточном для использования отогретой спермы при оплодотворении (порядка 45% клеток сохраняют способность к движению). В связи с этим дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния полисахаридов базидиальных грибов при  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ .

Репродуктивные клетки животных особо чувствительны к факторам криоконсервирования. Повреждение липидного матрикса приводит к потере целостности мембраны, снижению подвижности сперматозоидов, потере фертильности [27–31]. Для предотвращения данных нарушений к сперме перед воздействием холода принято добавлять антиоксиданты, моно-, ди- или трисахариды [31–33]. Анализ данных литературы [16, 19, 21, 34, 35] указывает на то, что полисахариды бази-

диальных грибов возможно смогут оказать защитный эффект при низкотемпературном хранении репродуктивных клеток.

Показано, что после отогрева биообъекта через 7 сут хранения материала при температуре  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  характер движения гамет сохраняется на уровне среды AndroMed®, за исключением опытов с добавлением полисахаридов *F. velutipes* FARC D1 (табл. 3). В последнем случае сперматозоиды утрачивают способность к поступательному движению после 7 сут хранения при  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ .

Следует отметить, что присутствие полисахаридов в среде AndroMed® статистически значимо улучшает показатели подвижности у популяции прогрессивно подвижных сперматозоидов. Например, при наличии в среде разбавителя полисахаридов, выделенных из *H. erinaceus* BP16 показатели VCL (мкм/с), VSL (мкм/с), VAP (мкм/с), ALH (мкм), BCF (Гц) и WOB (%) были статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ), чем в среде одного разбавителя (табл. 4). При наличии в среде разбавителя полисахаридов из *G. applanatum* GA (рис. 2) показатели VCL (мкм/с), VSL (мкм/с), VAP (мкм/с), BCF (Гц), STR (%) и MAD (град) также были статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ).

Оценка целостности ДНК сперматозоидов, подвергнутых охлаждению до  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  в течении

Таблица 3 / Table 3

Количество сперматозоидов (%) с разным характером движения после смешивания спермы с разбавителем AndroMed®, в том числе с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA после 7 сут хранения при -5 °С (Me, Q1-Q3)  
 Number of spermatozoa (%) with different patterns of movement after mixing sperm with AndroMed® diluent, including *H. erinaceus* BP16 / *F. velutipes* FARC D1 / *G. applanatum* GA polysaccharides after 7 days of storage at -5 °С (Me, Q1-Q3)

Серия Series	Характер движения / Patterns of movement		
	Прогрессивные подвижные Progressive mobile	Непрогрессивные подвижные Non-progressive mobile	Неподвижные Immobile
Сперма с AndroMed® Sperm with AndroMed®	12 (9-15,5)	23 (16,5-37,5)	60 (50,5-73)
Сперма с AndroMed® и полисахаридами <i>H. erinaceus</i> BP16 Sperm with AndroMed® and <i>H. erinaceus</i> BP16 polysaccharides	14 (9-15)	24 (21-27)	63 (60-67)
Сперма с AndroMed® и полисахаридами <i>F. velutipes</i> FARC D1 / Sperm with AndroMed® and <i>F. velutipes</i> FARC D1 polysaccharides	4,5 (3,75-5,75)*	6 (5,75-6,25)*	89 (88,25-89,75)*
Сперма с AndroMed® и полисахаридами <i>G. applanatum</i> GA Sperm with AndroMed® and <i>G. applanatum</i> GA polysaccharides	10 (6-13)	32 (29-36)	56 (54,5-62)

Примечание: \* – отличие от показателя сперма с AndroMed® статистически значимо  $p < 0,05$ .  
 Note: \* – the difference from the sperm with AndroMed® is statistically significant  $p < 0.05$ .

Таблица 4 / Table 4

Показатели подвижности у прогрессивной популяции сперматозоидов после 7 суток хранения при -5 °С в растворе AndroMed® (контрольная группа) и AndroMed® с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 (опытная группа), Me, Q1-Q3 / Motility indicators in a progressive population of sperm after 7 days of storage at -5 °С in AndroMed® solution (control) and AndroMed® with *H. erinaceus* BP16 polysaccharides (experiment), Me, Q1-Q3

Показатель Indicator	Контрольная группа Control	Опытная группа Experimental
VAP (µm/s)	20,71 (18,30-25,60)	24,27 (19,64-27,65)*
VSL (µm/s)	14,61 (11,59-18,26)	18,54 (13,85-22,11)*
VCL (µm/s)	56,03 (38,92-59,56)	61,42 (55,67-66,72)*
ALH (µm)	3,08 (2,88-3,29)	3,50 (3,22-3,70)*
MAD (°)	54,42 (46,99-60,41)	53,77 (49,23-62,91)
LIN (%)	29,30 (22,17-32,21)	27,75 (21,58-39,55)
WOB (%)	34,93 (32,42-39,13)	38,99 (33,31-46,75)*
STR (%)	84,82 (66,48-88,18)	79,54 (66,43-87,92)
BCF (Гц)	3,69 (3,09-4,77)	4,35 (3,89-5,25)*

Примечания: VAP – средняя траекторная скорость; VSL – прямолинейная скорость; VCL – криволинейная скорость; ALH – амплитуда бокового отклонения головы; MAD – средний угловой градус; LIN (VSL/VCL) – линейность; WOB (VAP/VCL) – раскачивание; STR (VSL/VAP) – прямолинейность; BCF – перекрёстная частота биений; \* – отличие от показателя AndroMed® статистически значимо  $p < 0,05$ .

Note: VAP – average trajectory speed; VSL – straight line speed; VCL – curvilinear speed; ALH – amplitude of lateral head deviation; MAD – average angular degree; LIN (VSL/VCL) – linearity; WOB (VAP/VCL) – swinging; STR (VSL/VAP) – straightness; BCF – cross beat frequency; \* – the difference from the AndroMed® indicator is statistically significant  $p < 0.05$ .

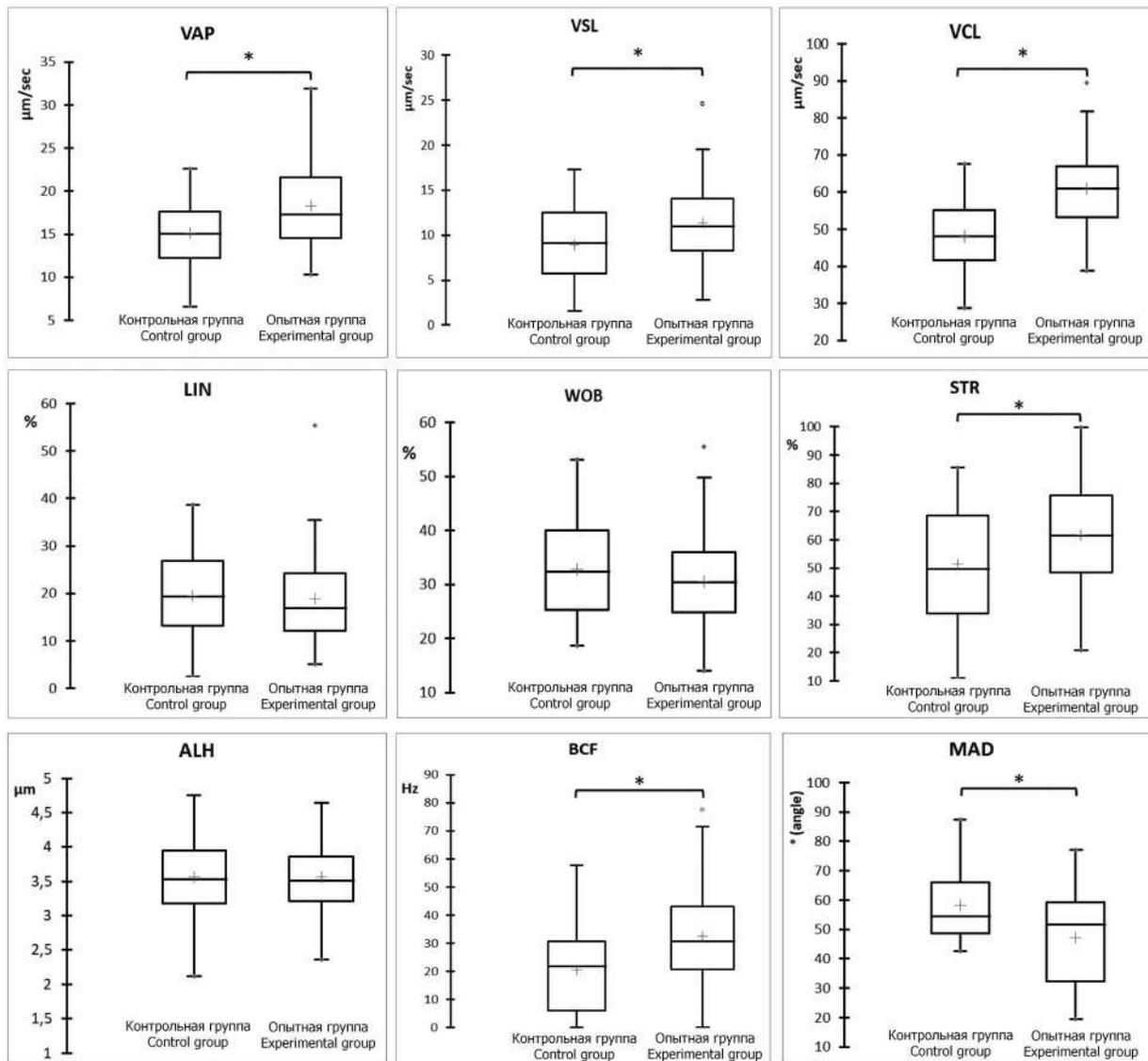
7 сут, выполненная по методу [20] с использованием акридинового оранжевого, показала, что количество гамет с оранжево-красной флуоресценцией, следовательно, с повреж-

дённой ДНК, во всех случаях оставалось на низком уровне и составляло 2-4% (рис. 3).

С этими данными коррелируют результаты окрашивания сперматозоидов с помощью

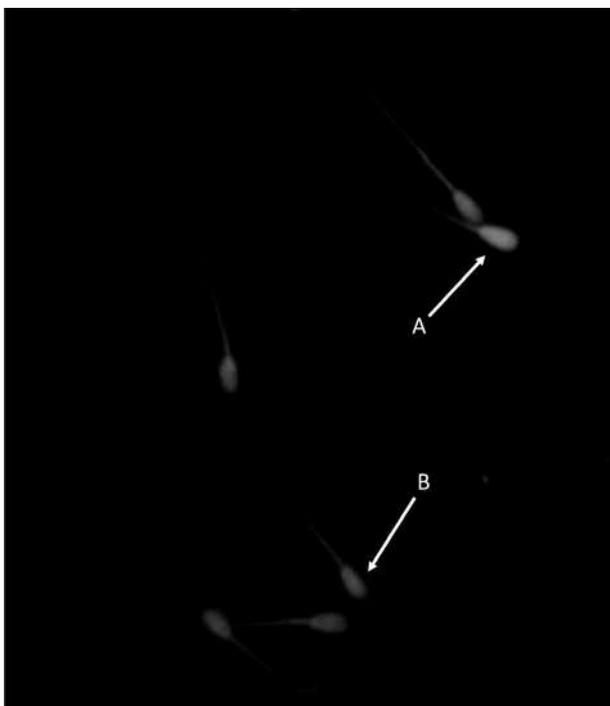
анилинового синего, который обладает большой тропностью к белкам в повреждённом хроматине сперматозоидов. Это связано с наличием остаточных гистонов и увеличением доступности основных групп нуклеопротеида. Нарастание окрашивания сперматозоидов анилиновым синим служит подтверждением нарушения целостности хроматина (рис. 4).

Принято считать, что механические повреждения биологических мембран растущими кристаллами льда являются главными причинами снижения устойчивости клеток к негативному воздействию холода [32]. Мы полагаем, что отсутствие повреждений ядерного хроматина при температуре  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  обусловлено отсутствием кристаллизации внеклеточной воды, а также всех видов вну-

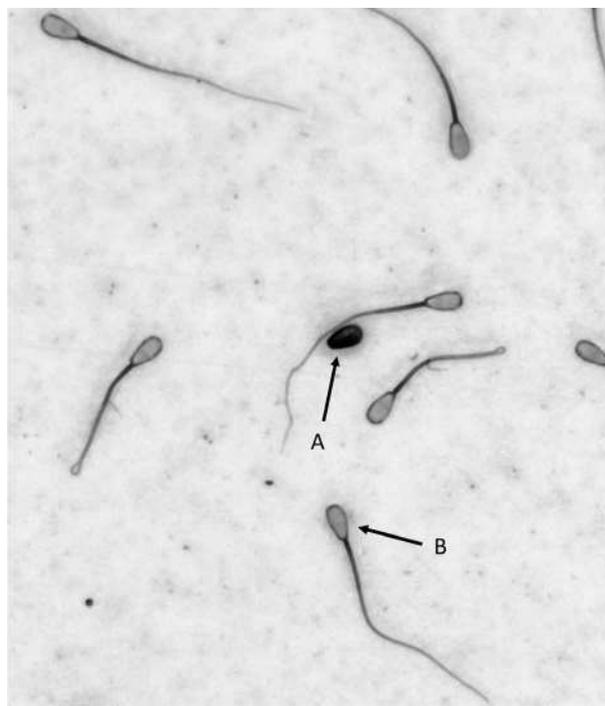


**Рис. 2.** Показатели подвижности у прогрессивной популяции сперматозоидов быков голштинской породы после 7 сут хранения при  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  в 12,5% растворе AndroMed® (контрольная группа) и AndroMed® с 0,2% полисахаридами *G. applanatum* GA (опытная группа); \* – отличие от показателя AndroMed® статистически значимо  $p < 0,05$ ; VAP – средняя траекторная скорость; VSL – прямолинейная скорость; VCL – криволинейная скорость; ALH – амплитуда бокового отклонения головы; MAD – средний угловой градус; LIN (VSL/VCL) – линейность; WOB (VAP/VCL) – колебание; STR (VSL/VAP) – прямолинейность; BCF – перекрёстная частота биений

**Fig. 2.** Motility indicators in a progressive population of spermatozoa of Holstein bulls after 7 days of storage at  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a 12,5% AndroMed® solution (control group) and AndroMed® with 0,2% *G. applanatum* GA polysaccharides (experimental group); \* – the difference from the AndroMed® indicator is statistically significant  $p < 0.05$ ; VAP – average trajectory speed; VSL – straight line speed; VCL – curvilinear speed; ALH – amplitude of lateral head deviation; MAD – average angular degree; LIN (VSL/VCL) – linearity; WOB (VAP/VCL) – fluctuation; STR (VSL/VAP) – straightness; BCF – cross beat frequency



**Рис. 3.** Сперматозоиды быка с различной реакцией на акридиновый оранжевый. А – сперматозоид с повреждённой ДНК. В – жизнеспособный сперматозоид  
**Fig. 3.** Bull sperm with different reactions to acridine orange. А – sperm with damaged DNA. В – viable sperm



**Рис. 4.** Сперматозоиды быка с различной реакцией на анилиновый синий. А – сперматозоид с повреждённой ДНК. В – жизнеспособный сперматозоид  
**Fig. 4.** Bull sperm with different reactions to aniline blue. А – sperm with damaged DNA. В – viable sperm

триклеточной (свободная, связанная, фиксированная) [36]. Важно отметить, что при этой температуре метаболизм в клетках замедляется незначительно, следовательно, в условиях температуры переохлаждения полисахариды базидиальных грибов, обладающие антиоксидантным действием, способны прерывать цепную реакцию перекисного окисления липидов и уменьшать негативное действие токсичных продуктов радикального процесса. Данная особенность была показана нами ранее при гипотермическом (+6 °С) хранении спермы быков в среде с полисахаридами *H. erinaceus* BP16 [21].

### Заключение

Одним из возможных способов сохранения биологического разнообразия на планете может быть разработка инновационных репродуктивных технологий по замораживанию половых клеток исчезающих видов животных и растений, длительному хранению биоматериала в криобанках и использованию его для восстановления генетического разнообразия. В связи с чем, актуальным является поиск новых эффективных криоконсервантов и рас-

ширение температурного диапазона хранения биоматериала. Широкий спектр биологического действия полисахаридов базидиальных грибов позволил сделать предположение об эффективности их использования в новых протоколах криоконсервирования гамет. Подвижность сперматозоидов является важным параметром фертильности и коррелирует с другими показателями жизнеспособности. В работе показано, что через 7 сут хранения сперматозоидов быков голштинской породы в условиях температуры переохлаждения при -5 °С в среде сертифицированного GMP разбавителя для замораживания спермы быков и других жвачных животных AndroMed® (Minitübe, Германия) основные показатели кинематики (VSL – скорость движения гамет по прямолинейному пути, VCL – скорость вдоль криволинейного пути, VAP – скорость на среднем пути, BCF – частота пересечения среднего пути) у популяции прогрессивно подвижных сперматозоидов были значительно выше при условии нахождения в среде полисахаридов *Hericium erinaceus* BP16 или *Ganoderma applanatum* GA.

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют об эффективности

применения полисахаридов ксилотрофных базидиальных грибов разного таксономического положения *Hericium erinaceus*, *Ganoderma applanatum* в составе среды для хранения спермы быков при температуре электрического морозильника  $-5^{\circ}\text{C}$ .

*Работа выполнена в рамках НИР № FUUU-2022-0065 «Биофизические механизмы криозащиты биообъектов и взаимодействия специфических бактериофагов с рецепторами клеток иерсиний» и Государственного задания № FNWE-2022-0005 ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока.*

### Литература

1. Bolton R.L., Mooney A., Pettit M.T., Bolton A.E., Morgan L., Drake G.J., Appeltant R., Walker S.L., Gillis J.D., Hvilson C. Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking // *Reproduction & Fertility*. 2022. V. 3. No. 3. P. 121–146. doi: 10.1530/RAF-22-0005
2. Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends // *Animal Reproduction Science*. 2000. V. 60–61. P. 349–355. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00125-1
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. Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen // *Theriogenology*. 2003. V. 60. No. 2. P. 269–279. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01369-9
5. Bintara S., Panjono, Aji R.N. The effect of Sanrego wood (*Lunasia amara* Blanco) extract addition to the Andromed® diluent on sperm quality of Belgian Blue Cross-breeds bull // *Advances in Biological Sciences Research*. 2022. V. 19. P. 371–375. doi: 10.2991/absr.k.220305.057
6. Liu J., Du C., Wang Y., Yu Z. Anti-fatigue activities of polysaccharides extracted from *Hericium erinaceus* // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015. V. 9. No. 2. P. 483–487. doi: 10.3892/etm.2014.2139
7. Cui F., Gao X., Zhang J., Liu M., Zhang C., Xu N., Zhao H., Lin L., Zhou M., Jia L. Protective effects of extracellular and intracellular polysaccharides on hepatotoxicity by *Hericium erinaceus* SG-02 // *Current Microbiology*. 2016. V. 73. No. 3. P. 379–385. doi: 10.1007/s00284-016-1073-1
8. Yang B.K., Park J.B., Song C.H. Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus* // *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 2003. V. 67. No. 6. P. 1292–1298. doi: 10.1271/bbb.67.1292
9. Kim S.P., Moon E., Nam S.H., Friedman M. *Hericium erinaceus* mushroom extracts protect infected mice against *Salmonella typhimurium* – induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. V. 60. No. 22. P. 5590–5596. doi: 10.1021/jf300897w
10. Liu J.Y., Hou X.X., Li Z.Y., Shan S.H., Chang M.C., Feng C.P., Wei Y. Isolation and structural characterization of a novel polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting bodies and its arrest of cell cycle at *S*-phase in colon cancer cells // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. V. 157. No. 15. P. 288–295. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.162
11. Wu F., Zhou C., Zhou D., Ou S., Zhang X., Huang H. Structure characterization of a novel polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting bodies and its immunomodulatory activities // *Food & Function*. 2018. V. 9. No. 1. P. 294–306. doi: 10.1039/c7fo01389b
12. Wang X.Y., Yin J.Y., Zhao M.M., Liu S.Y., Nie S.P., Xie M.Y. Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities // *Carbohydrate Polymers*. 2018. V. 186. P. 100–109. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.004
13. Li I.C., Lee L.Y., Tzeng T.T., Chen W.P., Chen Y.P., Shiao Y.J., Chen C.C. Neurohealth properties of *Hericium erinaceus* mycelia enriched with erinacines // *Behavioural Neurology*. 2018. Article No. 58026324. doi: 10.1155/2018/5802634
14. Dong Y.R., Cheng S.J., Qi G.H., Yang Z.P., Yin S.Y., Chen G.T. Antimicrobial and antioxidant activities of *Flammulina velutipes* polysaccharides and polysaccharide-iron(III) complex // *Carbohydrate Polymers*. 2017. V. 161. P. 26–32.
15. Zhang Y., Li H., Yang X., Jin G., Zhang Y. Cognitive-enhancing effect of polysaccharides from *Flammulina velutipes* on Alzheimer’s disease by compatibilizing with ginsenosides // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. V. 112. P. 788–795. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.040
16. Kawahara H., Matsuda Y., Sakaguchi T., Arai N., Koide Y. Antifreeze activity of xylomannan from the mycelium and fruit body of *Flammulina velutipes* // *Biocontrol Science*. 2016. V. 24. No. 3. P. 153–159. doi: 10.4265/bio.24.153.
17. Luo Q., Wei X.Y., Yang J., Luo J.F., Liang R., Tu Z.C., Cheng Y.X. Spiro meroterpenoids from *Ganoderma applanatum* // *Journal of Natural Products*. 2017. V. 80. No. 1. P. 61–70. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00431
18. Elkhateeb W.A., Zaghlool 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 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. V. 101. P. 264–277. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.058.
19. Shirokikh I.G., Polezhaeva T.V., Shirokikh A.A., Khudyakov A.N., Sergushkina M.I., Nazarova Ja.I., Paturo-

- va I.G. Cryoprotective properties of the polysaccharide fraction of the mushroom *Hericium erinaceus* BP16 // *Biology Bulletin*. 2020. V. 47. P. 1–6. doi: 10.1134/S1062359020010124
20. Martins C.F., Dode M.N., Bo 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 // *Genetics and Molecular Research*. 2007. V. 6. No. 1. P. 94–104.
21. Соломина О.Н., Сергушкина М.И., Широких А.А., Полежаева Т.В., Широких И.Г., Зайцева О.О., Худяков А.Н. *Hericium erinaceus* BP16 как источник полисахаридов, стабилизирующих функции сперматозоидов быков при гипотермическом хранении // *Теоретическая и прикладная экология*. 2021. № 3. С. 212–218. doi: 10.25750/1995-4301-2021-3-212-218
22. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvic M.M., Todorović N., Jakovljević D., Leo J.L.D., Griensven V. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012. V. 26. P. 144–153.
23. Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В., Ханина Л.А. О некоторых путях создания криопротекторов // *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1981. Т. 16. № 6. С. 3–8.
24. Ogawa A., Mizui S., Chida Y., Shimizu M., Terada S., Ohura T., Kobayashi K., Yasukawa S., Moriyama N. Rakkyo fructan as a cryoprotectant for serum-free cryopreservation of mammalian cells // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014. V. 118. No. 1. P. 101–106. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.010
25. Carrión O., Delgado L., Mercade E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1 // *Carbohydrate Polymers*. 2015. V. 117. P. 1028–1034. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.060
26. Полежаева Т.В., Худяков А.Н., Сергушкина М.И., Широких И.Г., Широких А.А., Безмельцева О.М., Соломина О.Н., Зайцева О.О. Тримероидные трутовики Русской равнины как источник полисахаридов с криопротекторными свойствами // *Теоретическая и прикладная экология*. 2017. № 3. С. 103–109. doi: 10.25750/1995-4301-2017-3-103-109
27. Baumber J., Ball B.A., Gravance C.G., Medina V., Davies-Morel M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation // *Journal of Andrology*. 2000. V. 21. No. 6. P. 895–902. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x
28. Cassani P., Beconi M.T., O'Flaherty C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen // *Animal Reproduction Science*. 2005. V. 86. No. 1–2. P. 163–173. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.06.006
29. Mandal R., Badyakar D., Chakrabarty J. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation // *Advances in Andrology*. 2014. Article No. 190542. doi: 10.1155/2014/190542
30. Khalil W.A., El-Harairy M.A., Zeidan A.E.B., Hassan M.A.E., Mohey-Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: structural and ultrastructural insights // *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2018. V. 6. P. S49–S56. doi: 10.1016/j.ijvsm.2017.11.001
31. Stanishevskaya O.I., Silyukova Yu., Fedorova E., Pleshonov N., Kurochkin A., Tereshina V.M., Ianutsevich E. Effects of trehalose supplementation on lipid composition of rooster spermatozoa membranes in a freeze/thaw protocol // *Animals*. 2023. V. 13. No. 6. Article No. 1023. doi: 10.3390/ani13061023
32. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. Кишинев: Stiinta, 2003. 336 с.
33. Zhang X., Hu Z.T., Li Y., Li Y.X., Xian M., Guo S.M., Hu J.H. Effect of *Astragalus* polysaccharides on the cryopreservation of goat semen // *Theriogenology*. 2022. V. 193. P. 47–57. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.08.007
34. Smiderle F.R., Carbonero E.R., Mellinger C.G., Sasaki G.L., Gorin P.A., Iacomini M. Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes* // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. No. 19. P. 2189–2196. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.06.022
35. Santos-Neves J.C., Pereira M.I., Carbonero E.R., Gracher A.H., Gorin P.A., Sasaki G.L., Iacomini M. A gel-forming beta-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida* // *Carbohydrate Research*. 2008. V. 343. No. 9. P. 1456–1462. doi: 10.1016/j.carres.2008.03.001
36. Сведенцов Е.П. Криоконсерванты для живых клеток. Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ УрО РАН, 2010. 80 с.

## References

- Bolton R.L., Mooney A., Pettit M.T., Bolton A.E., Morgan L., Drake G.J., Appeltant R., Walker S.L., Gillis J.D., Hvilson C. Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking // *Reproduction & Fertility*. 2022. V. 3. No. 3. P. 121–146. doi: 10.1530/RAF-22-0005
- Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends // *Animal Reproduction Science*. 2000. V. 60–61. P. 349–355. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00125-1
- 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
- Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen // *Theriogenology*. 2003. V. 60. No. 2. P. 269–279. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01369-9

5. Bintara S., Panjono, Aji R.N. The effect of Sanrege wood (*Lunasia amara* Blanco) extract addition to the Andromed® diluent on sperm quality of Belgian Blue Cross-breeds bull // *Advances in Biological Sciences Research*. 2022. V. 19. P. 371–375. doi: 10.2991/absr.k.220305.057
6. Liu J., Du C., Wang Y., Yu Z. Anti-fatigue activities of polysaccharides extracted from *Hericium erinaceus* // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015. V. 9. No. 2. P. 483–487. doi: 10.3892/etm.2014.2139
7. Cui F., Gao X., Zhang J., Liu M., Zhang C., Xu N., Zhao H., Lin L., Zhou M., Jia L. Protective effects of extracellular and intracellular polysaccharides on hepatotoxicity by *Hericium erinaceus* SG-02 // *Current Microbiology*. 2016. V. 73. No. 3. P. 379–385. doi: 10.1007/s00284-016-1073-1
8. Yang B.K., Park J.B., Song C.H. Hypolipidemic effect of an Exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus* // *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 2003. V. 67. No. 6. P. 1292–1298. doi: 10.1271/bbb.67.1292
9. Kim S.P., Moon E., Nam S.H., Friedman M. *Hericium erinaceus* mushroom extracts protect infected mice against *Salmonella typhimurium* – induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. V. 60. No. 22. P. 5590–5596. doi: 10.1021/jf300897w
10. Liu J.Y., Hou X.X., Li Z.Y., Shan S.H., Chang M.C., Feng C.P., Wei Y. Isolation and structural characterization of a novel polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting bodies and its arrest of cell cycle at S-phase in colon cancer cells // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. V. 157. No. 15. P. 288–295. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.162
11. Wu F., Zhou C., Zhou D., Ou S., Zhang X., Huang H. Structure characterization of a novel polysaccharide from *Hericium erinaceus* fruiting bodies and its immunomodulatory activities // *Food & Function*. 2018. V. 9. No. 1. P. 294–306. doi: 10.1039/c7fo01389b
12. Wang X.Y., Yin J.Y., Zhao M.M., Liu S.Y., Nie S.P., Xie M.Y. Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities // *Carbohydrate Polymers*. 2018. V. 186. P. 100–109. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.004
13. Li I.C., Lee L.Y., Tzeng T.T., Chen W.P., Chen Y.P., Shiao Y.J., Chen C.C. Neurohealth properties of *Herichium erinaceus* mycelia enriched with erinacines // *Behavioural Neurology*. 2018. Article No. 58026324. doi: 10.1155/2018/5802634
14. Dong Y.R., Cheng S.J., Qi G.H., Yang Z.P., Yin S.Y., Chen G.T. Antimicrobial and antioxidant activities of *Flammulina velutipes* polysaccharides and polysaccharide-iron(III) complex // *Carbohydrate Polymers*. 2017. V. 161. P. 26–32.
15. Zhang Y., Li H., Yang X., Jin G., Zhang Y. Cognitive-enhancing effect of polysaccharides from *Flammulina velutipes* on Alzheimer's disease by compatibilizing with ginsenosides // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. V. 112. P. 788–795. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.040
16. Kawahara H., Matsuda Y., Sakaguchi T., Arai N., Koide Y. Antifreeze activity of xylomannan from the mycelium and fruit body of *Flammulina velutipes* // *Biocontrol Science*. 2016. V. 21. No. 3. P. 153–159. doi: 10.4265/bio.21.153.
17. Luo Q., Wei X.Y., Yang J., Luo J.F., Liang R., Tu Z.C., Cheng Y.X. Spiro meroterpenoids from *Ganoderma applanatum* // *Journal of Natural Products*. 2017. V. 80. No. 1. P. 61–70. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00431
18. Elkhateeb W.A., Zaghlool 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 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. V. 101. P. 264–277. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.058.
19. 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* BP16 // *Biology Bulletin*. 2020. V. 47. P. 1–6. doi: 10.1134/S1062359020010124
20. Martins C.F., Dode M.N., Báo 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 // *Genetics and Molecular Research*. 2007. V. 6. No. 1. P. 94–104.
21. Solomina O.N., Sergushkina M.I., Shirokikh A.A., Polezhaeva T.V., Shirokikh I.G., Zaitseva O.O., Khudyakov A.N. *Hericium erinaceus* BP16 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
22. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvic M.M., Todorović N., Jakovljević D., Leo J.L.D., Griensven V. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012. V. 26. P. 144–153.
23. Schrago M.I., Guchock M.M., Kalugin Yu.V., Khanina L.A. Some ways to create cryoprotectants // *Problemy Gematologii i Perelivaniia Krovi*. 1981. V. 16. No. 6. P. 3–8 (in Russian).
24. Ogawa A., Mizui S., Chida Y., Shimizu M., Terada S., Ohura T., Kobayashi K., Yasukawa S., Moriyama N. Rakkyo fructan as a cryoprotectant for serum-free cryopreservation of mammalian cells // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014. V. 118. No. 1. P. 101–106. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.010
25. Carrión O., Delgado L., Mercade E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1 // *Carbohydrate Polymers*. 2015. V. 117. P. 1028–1034. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.060

26. 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. 103–109 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-3-103-109
27. Baumber J., Ball B.A., Gravance C.G., Medina V., Davies-Morel M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation // *Journal of Andrology*. 2000. V. 21. No. 6. P. 895–902. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x
28. Cassani P., Beconi M.T., O’Flaherty C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen // *Animal Reproduction Science*. 2005. V. 86. No. 1–2. P. 163–173. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.06.006
29. Mandal R., Badyakar D., Chakrabarty J. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation // *Advances in Andrology*. 2014. Article No. 190542. doi: 10.1155/2014/190542
30. Khalil W.A., El-Harairy M.A., Zeidan A.E.B., Hassan M.A.E., Mohey-Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: structural and ultrastructural insights // *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2018. V. 6. P. S49–S56. doi: 10.1016/j.ijvsm.2017.11.001
31. Stanishevskaya O.I., Silyukova Yu., Fedorova E., Pleshanov N., Kurochkin A., Tereshina V.M., Ianutsevich E. Effects of trehalose supplementation on lipid composition of rooster spermatozoa membranes in a freeze/thaw protocol // *Animals*. 2023. V. 13. No. 6. Article No. 1023. doi: 10.3390/ani13061023
32. Boronchuk G.V., Balan I.V. *Cryomembranology*. Kishinev: Stiinta, 2003. 336 p. (in Russian).
33. Zhang X., Hu Z.T., Li Y., Li Y.X., Xian M., Guo S.M., Hu J.H. Effect of *Astragalus* polysaccharides on the cryopreservation of goat semen // *Theriogenology*. 2022. V. 193. P. 47–57. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.08.007
34. Smiderle F.R., Carbonero E.R., Mellinger C.G., Sasaki G.L., Gorin P.A., Iacomini M. Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes* // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. No. 19. P. 2189–2196. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.06.022
35. Santos-Neves J.C., Pereira M.I., Carbonero E.R., Gracher A.H., Gorin P.A., Sasaki G.L., Iacomini M. A gel-forming beta-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida* // *Carbohydrate Research*. 2008. V. 343. No. 9. P. 1456–1462. doi: 10.1016/j.carres.2008.03.001
36. Svedentsov E.P. *Cryoprotectants for living cell*. Syktyvkar: Komi Scientific Center of the Russian Academy of Sciences Publ., 2010. 80 p. (in Russian).