

КОНЦЕНТРАЦІЯ СПОЛУЧНО-ТКАНИННИХ БІОПОЛІМЕРІВ ЦЕРВІКАЛЬНОГО СЛИЗУ КОРІВ ЗА РІЗНИХ СТАДІЙ ЕСТРАЛЬНОГО ЦИКЛУ ТА АНАФРОДИЗІЇ

Бондаренко Ірина Вікторівна

кандидат ветеринарних наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0002-1019-3446
bondarenkoirina173@gmail.com

Лазоренко Андрій Борисович

кандидат ветеринарних наук, доцент
Сумський національний аграрний університет, м. Суми, Україна
ORCID: 0000-0002-0916-3901
Lazorenkoandrej@gmail.com

Своєчасне виявлення еструсу в корів – запорука успішного штучного осіменіння в господарствах України. Дотепер застосовують різні методи виявлення рефлексу нерухомості, це і візуальний контроль за станом зовнішніх статевих органів на тлі зміни поведінки, контакт з бугаєм-пробником, кількісні та якісні зміни шийкового слизу.

Стан цервікального слизу, є найбільш інформативним, оскільки його фізико-хімічні зміни не лишаються непоміченими при застосуванні будь-яких методів діагностування еструсу. Не зважаючи на цей факт, дотепер чимало характеристик шийкового секрету лишаються недослідженими, особливо біохімічні та фізико-хімічні показники за різних стадій та станів відтворної функції.

З метою вивчення регенеративно-відновлюваних процесів, та для діагностики непліддя, досліджено динаміку концентрації гексоз сполучених з білком, глікозаміногліканів та глікопротеїнів цервікального слизу маточного поголів'я корів дослідних господарств під час різних стадій естрального циклу та за анафродизії.

Дослідження проводились на коровах чорно-рябої та швіцької порід, а також на коровах симентальської та бурої молочної порід. Матеріалом для досліджень був цервікальний слиз, відібраний з цервікального каналу матки корів віком 3-10 років, під час еструсу, розквіту жовтого тіла, передбачуваної тички та в клінічно здорових корів, що не проявляли статеву циклічність після перехворювання на ендометрит і затримку посліду більш ніж 30 днів.

Для взяття цервікального слизу, проводили санітарний туалет зовнішніх статевих органів корів. Вводили в піхву стерильне піхове дзеркало, після чого, застосовуючи додаткове джерело освітлення, за допомогою стерильного шприца й приєданого до нього катетера, забирали слиз із каудальної частини цервікального каналу. Після взяття, слиз заморожували для зберігання при температурі -20°C . Перед проведенням досліджень, зразки слизу відтаювали при кімнатній температурі, гомогенізували з 0,5-н розчином NaOH та залишали при $+4^{\circ}\text{C}$ на 2 години. Надалі гомогенат центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15хв. Фактичний вміст білково-вуглеводних сполук у зразках гомогенатів слизу розраховували з урахуванням співвідношення (об'єму слизу – 0,5-н розчин NaOH). У надосадовій рідині визначали вміст гексоз сполучених з білками, глікозаміногліканів та глікопротеїнів фракційним методом у орциноловій реакції із фракціонуванням етанолом та цетилпіридіним хлористим. Фотометрія проб здійснювалась при 540 нм із довжиною оптичного шляху 10 мм. Фактичний вміст дослідних сполук виражається у г/л або мг/л за калібрувальним графіком який показує залежність: оптична густина, це концентрація гексоз. Принцип методу: протеїни за рахунок гексоз, осаджуються в присутності 96% етанолу. Вивільнені в результаті гідролізу при 80°C гексози, вступають у взаємодію з орциновим реактивом (1,6% розчин орцину й концентрована сірчана кислота) забарвлюючи реактогенну суміш помаранчевим кольором, насиченість якого пропорційна до концентрації гексоз у пробі. Гексози глікозаміногліканів визначали так само, проте осаджували 1% розчином цетилпіридінію хлориду.

З'ясовано роль гексоз сполучених з білком, глікозаміногліканів та глікопротеїнів в процесі трансформації статевих органів підчас їх підготовки до осіменіння та запліднення. В результаті проведених досліджень, виявлено достовірну різницю вмісту гексоз сполучених з білком, глікозаміногліканів та глікопротеїнів протягом різних стадій естрального циклу та за анафродизії.

З'ясовано, що в шийковому секреті корів під час прояву рефлексу нерухомості, достовірно зростає кількість глікозаміногліканів та глікопротеїнів, за рахунок зміни біофізичних властивостей та зростання кількості гонадальних гормонів та ферментів.

Еструс характеризується достовірним зростанням глікозаміногліканів та глікопротеїнів у цервікальному секреті корів, що обумовлено зміною біофізичних властивостей шийкового слизу за рахунок зростання ферментів та гонадальних гормонів.

У постморбідному періоді, а саме після перехворювання на ендометрит і затримання посліду, вміст глікозаміногліканів та глікопротеїнів шийкового секрету достовірно знижується, порівняно з показником за еструсу.

Ключові слова: корови, естральний цикл, еструс, цервікальний слиз, глікозаміноглікани, гексози сполучені з білками, глікопротеїни, анафродизія.

DOI <https://doi.org/10.32782/bsnau.vet.2023.1.4>

Вступ. Успішне відтворення великої рогатої худоби – це передумова рентабельності молочного скотарства, тому розробка методик, способів чи тестів, що дозволяють точно визначити оптимальний час осіменіння – важлива й актуальна проблема. Дотепер, дослідники пропонували різні методики діагностики еструсу. В першу чергу, це візуальний контроль, що базується на спостереженні за зміною поведінки, який на жаль, має достатньо низьку достовірність й застосовується лише в комплексі з іншими методами діагностики еструсу. Фізико-хімічні властивості цервікального секрету доволі інформативні, оскільки під час охоти кардинально змінюються, проте показники кількості, прозорості та в'язкості в різних авторів (Healy, et al., 2015; Hanumant et al., 2019; Damarany, 2020; Abd-ElHafeez et al., 2020; Yildiz et al., 2021) мають суттєві розбіжності.

Цервікальний слиз, це в'язко-еластичний гель, який продукують епітеліальні клітини шийки матки. Він містить 95-99% води, а також гетерогенну сітку міцел глікоротеїнів, відповідальних за кристалізацію слизу. Під час охоти, за наростання концентрації естрогенів, ендцервікальна секреція – максимальна. Слиз набуває водянистої консистенції та лужного рН, міцели розміщуються паралельно одна-одній, створюючи, таким чином, систему каналців необхідних для penetрації сперматозоїдів. За розквіту жовтого тіла, кількість слизу мінімальна, він густішає й має кисле рН, а система каналців з міцелярних містків формує щільну сітку, яка перешкоджає транспорту спермійв (Yildiz et al., 2021).

Цервікальний слиз відіграє важливу роль за осіменіння та запліднення, оскільки являє собою біологічне середовище, яке контролює виживаність, здатність до міграції та капацитації спермійв. Окрім цього, шийковий секрет є хімічним та фізичним бар'єром для мікроорганізмів (Maher et al., 2018; Adnane et al., 2017).

Цервікальний слиз є гідрогелем, що складається з речовин високої та низької щільності. До першої групи належать розчинні білки, електроліти, органічні сполуки. Інша складова об'єднує макромолекули муцину, котрі обумовлюють реологічну здатність шийкового секрету. Фізико-хімічні властивості слизу кардинально змінюються протягом різних стадій та феноменів естрального циклу, а кількість, фізичний стан, склад, та мікроскопічна структура, суттєво впливають на результативність осіменіння (Healy et al., 2015; Dadarwal et al., 2017).

Описані в науковій літературі якісні показники шийкового секрету діаметрально різняться у різних дослідників. Так, окремі автори стверджують, що в'язкість за діеструсу значно вища ніж під час проеструсу та еструсу, тоді як інші вказують, на зростання вищевказаного показника під час охоти, й набування максимального значення в момент овуляції. Рівень рН шийкового слизу на початок охоти, також кардинально різниться за різними авторами від 7,4-8,0 (Marie Le Berre, et al., 2021), до - 8,57 (Dadarwal et al., 2017).

Незважаючи на постійну увагу науковців щодо вивчення складу та властивостей цервікального слизу, багато показників лишаються недослідженими, тому потреба в доповненні знань актуальна дотепер. Так,

дотепер, не визначений біохімічний та фізико-хімічний склад біополімерів на властивості цервікального секрету за різних станів статевої функції, а відтак обмежена можливість розробки прогностичних тестів щодо результативності осіменіння корів. Оскільки цервікальний секрет, це вагоме інформативне джерело щодо діагностики статевої охоти, перебігу вагітності, та розвитку патологічних процесів, то доцільним, і економічно обґрунтованим є вивчення ролі глікозаміногліканів, гексоз сполучених із білком та глікопротеїнів в зв'язку з його властивостями протягом різних стадій статевого циклу, й особливо за розвитку анафродизії. Дані дослідження сприяють розумінню суті фізіологічної перебудови відтворної системи, й відкривають можливості для розробки діагностично-прогностичних тестів.

Цервікальний слиз корів - унікальна біологічна речовина, з чималим інформаційним потенціалом, який можливо отримати досліджуючи якісний та кількісний вміст його протеїнів і глікозаміногліканів. За овуляції шийковий секрет кристалізується за рахунок максимального збільшення глікогену й сумарної кількості вуглеводів. Взагалі, кількість глікозаміногліканів, яка прямо залежать від концентрації та співвідношення статевих гормонів, може бути діагностично-прогностичним показником овуляції та запліднення. Неколагенові структурні глікопротеїни формують матрикс, який об'єднуючі всі компоненти, створює єдину структуру шийкового секрету. Наукові дослідження дають можливість стверджувати, що кількісний та якісний склад шийкового секрету, взагалі характеризує перебіг різних стадій естрального циклу та вказує на розвиток анафродизії. Клітинний склад шийкового секрету, також достовірно ілюструє динаміку й закономірності відновлення функціональної активності статевої системи (Damarany, 2020; Abd-ElHafeez et al., 2020; Yildiz et al., 2021).

Шийковий слиз надійно захищає матку від рясної мікрофлори піхви, завдяки унікальному клітинному складу, що має бактерицидні властивості, й достатньо щільній консистенції, яка протягом вагітності та майже всіх стадій естрального циклу дозволяє утримуватися останньому в цервікальному каналі. Лужне середовище шийкового секрету під час осіменіння захищає спермії, створюючи тимчасовий резервуар для їх руху та капацитації (Ningwal et al. 2018; Hanumant et al., 2019; Tiwari, et al. 2019).

Продукується шийковий секрет клітинами слизової оболонки цервікса, а його об'єм залежить від комбінації та концентрації гонадальних гормонів в організмі корови. В'язкість слизу змінюється завдяки молекулярному складу, а концентрація загального білку під час різних стадій естрального циклу, має більші коливання ніж динаміка крові. Перед овуляцією різко зростає концентрація білку, з якого формуються своєрідні структурно-механічні конструкції, що забезпечують транспорт спермійв. Протягом різних стадій естрального циклу, в цервікальному секреті містяться: клітини епітелія ендометрія та цервікса, лейкоцити, вміст маткових залоз, порожнини матки, яйцепроводів, та фолікула (Nakano et al., 2015; Parikh, 2018).

Досліджені й описані симптом розтягнення, показник електропровідності та рН цервікального слизу протягом еструсу, які корелюють з рівнем продукування естрогенів під час овуляції. Вивчено феномен арборизації (кристалізація слизу під час висихання на повітрі з формування малюнку «листіків папороті» з характерним розташуванням гілочок під прямим кутом) в зв'язку зі ступенем зрілості фолікула. Арборизація, виникає внаслідок взаємодії складових шийкового секрету, таких як KBr, NaCl, KCl з катаболітами прогестерону та естрогенів. За розквіту жовтого тіла, слиз набуває щільності й однорідності. Цитологічна картина шийкового секрету, залежно від клітинного складу, може вказувати на запальний процес, деструктивно-клітинну ферментацію та десквамацію клітин епітелію шийки матки та ендометрія (Semeniuk et al., 2009).

Отже, органолептичні показники шийкового секрету, це складові діагностики еструсу, а вивчення молекулярного складу слизу, зокрема гексоз сполучених з білками, глікозаміногліканів та глікопротеїнів, дозволить створити прогностично-діагностичні тести готовності статевої системи до овуляції, запліднення та нидації зиготи.

Мета досліджень. Задачею наших досліджень було визначити й проаналізувати зміни вмісту гексоз сполучених з білками, глікозаміногліканів та глікопротеїнів у цервікальному слизу маточного поголів'я корів під час різних стадій статевого циклу, та за анафродизії в порівняльному аспекті.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводились в ВЛТ ПЗ «Михайлівка» Лебединського району Сумської області на коровах чорно-рябої та швіцької порід, а також в СФГ «Віталія» Буринського району Сумської області на коровах симентальської та бурої молочної порід. Матеріалом для досліджень був цервікальний слиз, відібраний з цервікального каналу матки корів віком 3-10 років, під час еструсу (n=5), розквіту жовтого тіла (n=5), передбачуваної тічки (n=5) та в клінічно здорових корів, що не проявляли статевої циклічності після перехворювання на ендометрит (n=5) і затримку посліду (n=5) більш ніж 30 дб.

Для взяття цервікального слизу, проводили санітарний туалет зовнішніх статевих органів корів. Вводили в піхву стерильне піхвове дзеркало, після чого, застосовуючи додаткове джерело освітлення, за допомогою стерильного шприца й приєданого до нього катетера, забирали слиз із каудальної частини цервікального каналу. Після взяття, слиз заморожували для зберігання при температурі -20°C. Перед проведенням досліджень, зразки слизу відтаювали при кімнатній температурі, гомогенізували з 0,5-н розчином NaOH та залишали при +4°C на 2 години. Надалі гомогенат центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15хв. Фактичний вміст білково-вуглеводних сполук у зразках гомогенатів слизу розраховували з урахуванням співвідношення (об'єму слизу – 0,5-н розчин NaOH). У надосадовій рідині визначали вміст гексоз сполучених з білками, глікозаміногліканів та глікопротеїнів фракційним методом за І.В.Неверовим та Н.І.Титаренко (1979) у орциноловій реакції із фракціонуванням етанолом та цетилпіридіним хлористим. Фотометрія проб здійснювалась при 540 нм із довжиною оптичного шляху 10 мм. Фактичний вміст дослідних сполук виражається у г/л або мг/л за калібрувальним графіком який показує залежність: оптична густина, це концентрація гексоз. Принцип методу: протеїни за рахунок гексоз, осаджуються в присутності 96% етанолу. Вивільнені в результаті гідролізу при 80°C гексози, вступають у взаємодію з орциновим реактивом (1,6% розчин орцину й концентрована сірчана кислота) забарвлюючи реактогенну суміш помаранчевим кольором, насиченість якого пропорційна до концентрації гексоз у пробі. Гексози глікозаміногліканів визначали так само, проте осаджували 1% розчином цетилпіридінію хлориду. Отриманий цифровий матеріал оброблено методами варіаційної статистики із використанням параметричного t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень. дані, отримані під час досліджень наведені в таблиці 1.

Отримані дані вказують, що під час еструсу вміст глікозаміногліканів цервікального слизу достовірно збіль-

Таблиця 1

**Динаміка вмісту білково-вуглеводних сполук цервікального слизу корів
за різних стадій статевого циклу та стану статевої функції**

Показники	Клінічно здорові			Тварини, що перехворіли на:		P1<	P2<	P3<	P4<	P5<
	охота (рефлекс нерухомості), n=5	7-8 доба ст. цик. (розквіт жовт тіла) n=5	17-18 доба ст. циклу (передбачув. про-еструс), n=5	ендометрит, n=5	затримку посліду, n=5					
Глікозаміноглікани, г/л	3,35±0,24	2,02±0,22	2,22±0,19	1,84±1,18	1,82±1,2	0,001	0,002	н.д.	0,005	0,006
Глікопротеїни, г/л	1,8±0,14	1,38±0,13	1,98±0,11	1,31±0,21	1,43±0,05	0,05	н.д.	0,003	0,002	0,001
Гексози сполучені з білками г/л	5,15±0,4	3,4±0,2	4,0±0,17	3,15±0,38	3,25±0,24	0,002	0,002	0,041	0,007	0,003

Примітки:

P1- 0 день стат. цик. порівняно із 7-8 днем ст. цик.;

P2- 0 день стат. цик. порівняно з 17-18 днем ст. цик.;

P3 -7-8 днем ст. цик. порівняно з 17-18 днем ст. цик.;

P4 -0 день стат. цик. порівняно клінічно здоровими тваринами, що перехворіли на ендометрит;

P5- 0 день стат. цик. порівняно з клінічно здорові тварини, яка перехворіли на затримку посліду.

шується в 3,34 рази ($p < 0,001$) порівняно з 7-8 добою статевого циклу з $2,02 \pm 0,22$ до $3,35 \pm 0,24$ г/л. Рівень глікозаміногліканів ($2,22 \pm 0,19$ г/л) під час передбачуваного проєструсу, недостовірно збільшується за показник розквіту жовтого тіла, на 2,22, а порівняно з охотою, достовірно зростає на 3,34 ($p < 0,002$).

Кількість глікозаміногліканів цервікального слизу корів, що одужали після ендометриту ($1,84 \pm 1,18$ г/л) та затримання посліду ($1,82 \pm 1,2$ г/л) достовірно зменшувалася відносно подібного показнику корів в охоті на 45,07 % ($P < 0,05$), та на 45,67 % ($P < 0,06$) відповідно.

Вивчаючи динаміку глікопротеїнів цервікального слизу корів протягом статевого циклу та за анафродизії, ми з'ясували наступне: концентрація вищезазначених під час еструсу ($1,8 \pm 0,14$) була достовірно більшою на 23,3 % ($P < 0,05$) порівняно з аналогічним показником під час розквіту жовтого тіла ($1,38 \pm 0,13$), проте недостовірно меншою на 9,1 % відносно показника передбачуваного проєструсу ($1,98 \pm 0,11$). Достовірно більшим на 30,3 % був вміст глікопротеїнів під час проєструсу порівняно з показником розквіту жовтого тіла.

Кількість глікопротеїнів шийкового слизу тварин постморбідного стану була наступною: після ендометриту ($1,31 \pm 0,21$ г/л); затримання посліду ($1,43 \pm 0,05$ г/л). Вищевказані показники були достовірно меншими за аналогічний відсоток корів під час еструсу на 27,2% ($P < 0,05$), та на 20,6% ($P < 0,06$) відповідно.

Вміст гексоз сполучених з білками за еструсу ($5,15 \pm 0,4$) був достовірно більшим ($P < 0,002$) на 33,9 % порівняно з періодом розквіту жовтого тіла ($3,4 \pm 0,2$), та на 22,3 % ($P < 0,002$) порівняно з передбачуваним проєструсом ($4,0 \pm 0,17$).

Достовірно зменшувався на 15,0% ($P < 0,041$) вміст гексоз сполучених з білками під час розквіту жовтого тіла відносно передбачуваного проєструсу.

Концентрація гексоз сполучених з білками шийкового слизу корів перехворілих ендометритом ($3,15 \pm 0,38$) та затримкою посліду ($3,25 \pm 0,24$), достовірно знижувалася на 38,8% ($P < 0,007$) та 36,9 % ($P < 0,003$) відповідно, в порівнянні з аналогічним показником під час еструсу.

Обговорення. Напевно, достовірно збільшення глікозаміногліканів під час охоти, це наслідок участі останніх в процесах модифікації властивостей цервікального слизу, пенетрації та активації акросоми сперміїв (Handrow, et al. 1982). Даний процес відбувається на тлі зростання гонадотропних гормонів, які регулюють вміст полісахаридів (Gomes et al. 2009; Cubas et al. 2010). Дослідники стверджують, що окрім активації пенетрації, глікозаміноглікани впливають і на швидкість руху сперміїв за рахунок активації оболонки процесу транслокації кальцію та інших необхідних речовин (Li et al., 2006). Науковці зазначають (Ohgita, et al., 2019), що накопичення глікозаміногліканів (останні, крім іншого, створюють власний високий негативний заряд) на поверхні оболонки, свідчить про попередню взаємодію вищевказаних з речовинами позаклітинного матриксу до моменту остаточного їх засвоєння спермієм.

Зменшення вмісту глікозаміногліканів цервікального слизу корів, що одужали після ендометриту та затри-

мання посліду, вірогідно можна пояснити зміною властивостей цервікального слизу, зумовленою розладами гормонального фону організму корів за постморбідного стану.

За нестачі необхідної концентрації глікозаміногліканів та глікопротеїнів, слизові канали втрачають необхідну структуру, перешкоджаючи руху сперміїв. Достатньо заперечливі дані науковців, щодо концентрації в шийковому секреті глікозаміногліканів та глікопротеїнів протягом різних стадій естрального циклу. Так, (Voskresenskyi, et al., 2010) твердить, що овуляція можлива за умов певного співвідношення ЛГ до ФСГ, на фоні помітного зменшення загальних глікозаміногліканів і їх фракцій, а за розквіту жовтого тіла, концентрація останніх помітно зростає. Та й взагалі, дисбаланс глікозаміногліканів та глікопротеїнів у шийковому секреті викликає неплоддя.

Молекулам слизу властива здатність об'єднуватися в полімерні конструкції, або формувати розширену тривимірну мережу, тобто змінювати біологічні властивості та фізичний стан слизу за рахунок білкових включень, ферментів та гормонів. На нашу думку, достовірно зростання глікопротеїнів протягом проєструсу та еструсу, обумовлене саме тим, що вищевказані регулюють рН-залежну трансформацію шийкового слизу з золю в гель, та водянистий стан (Morales et al., 1993; Cao et al. 1999).

На нашу думку, достовірно зниження глікопротеїнів за постморбідного стану, обумовлене дисбалансом гонадальних гормонів. Як відомо, саме естрогени та прогестерон визначають взаємодію молекул слизу, переважна кількість яких є глікопротеїнами. Естрогени та прогестерон взаємодіють з клітинною мембраною, або з рецептором цитоплазми гормонозалежної клітини, й транспортуються в ядро. Дисбаланс гонадальних стероїдів, зумовлює достовірно зменшення глікопротеїнів протягом постморбідного періоду, й обумовлює відсутність необхідної зміни біофізичних властивостей цервікального секрету, характерних для кожної стадії статевого циклу.

Співвідношення лютеїнізуючого та фолікулоstimулюючого гормонів регулює полісахаридний склад шийкового слизу, а концентрація глікопротеїнів та глікозаміногліканів, може бути маркером та прогностичним критерієм овуляції, оскільки молекули глікопротеїнів формують паралельно розташовані канали, за допомогою яких спермії дістаються яйцепроводів.

Дослідження інших авторів, свідчать про достовірно збільшення глікозаміногліканів цервікального слизу під час овуляції, та що концентрація останніх може бути індикатором овуляції за менструального циклу, й прогностичним тестом запліднення (Semeniuk et al., 2009).

Очевидно, різке зростання кількості фолікулоstimулюючого й лютеїнізуючого гормонів протягом проєструсу та еструсу, яке активує секрецію глікогену, кислих глікозаміногліканів, та глікопротеїнів, обумовлює достовірно зростання гексоз сполучених з білками.

Достовірно зниження концентрації гексоз сполучених з білками шийкового слизу в корів, що перехворіли на ендометрит та затримку посліду, в порівнянні з аналогічним показником під час еструсу, свідчить про необхідність обґрунтованих методів корекції.

Перспектива подальших досліджень, це пошук та опрацювання ефективних методів корекції відтворної здатності корів за постморбідного стану.

Висновки. 1. Еструс характеризується достовірним зростанням глікозаміногліканів та глікопротеїнів у цервікальному секреті корів, що обумовлено зміною біофізич-

них властивостей шийкового слизу за рахунок зростання ферментів та гонадальних гормонів.

2. За постморбідного періоду, а саме у тварин перехворілих на ендометрит і затримання посліду, вміст глікозаміногліканів та глікопротеїнів шийкового секрету був достовірно нижчим, порівняно з аналогічним показником під час еструсу.

Бібліографічні посилання:

1. Abd-ElHafeez, A.M., Amin, A.M.S., Ramadan, M.H., Helal, A., and Mohamed, M.Y., (2020). The most applicable physical properties of cervical mucus correlated with high pregnancy rate in egyptian cows under heat stress condition. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 8(s2): 122-131. doi: /10.17582/journal.aavs/2020/8.s2.122.131.
2. Adhane, M., Chapwanya, A., Kaidi, R., Meade, K., and O'Farrelly, C. (2017) Profiling inflammatory biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM) postpartum: potential early indicators of bovine clinical endometritis. *Theriogenology*, 103, 117–122. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.039.
3. Cao, X., Bansil, R. and Bhaskar, K.R., (1999). pH-dependent conformational change of gastric mucin leads to sol-gel transition. *Biophys J*, 76(3), 1250-1258. doi:10.1016/S0006-3495(99)77288-7.
4. Cubas, J. J., Simões, R. S., Oliveira-Filho, R. M., Simões, M. J., Baracat, E. C., and Soares, J. M., (2010). Glycosaminoglycan distribution in the rat uterine cervix during the estrous cycle. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 65(7), 703–708. doi:10.1590/S1807-59322010000700009.
5. Dadarwal, D., Palmer, C., and Griebel, P. (2017). Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. *Theriogenology*, 104, 62–71. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.08.010.
6. Damarany, A.I., (2020). Physical traits of vaginal mucus discharge and their relations to conception rate of egyptian baladi cows. *Egypt. J. Anim. Prod.*, 57(2), 63-70. doi: 10.21608/ejap.2020.104019.
7. Deepak N., Sant P.N., Sudarshan K., Ameeta K., Madhu S. and Ranjit A. (2018). Biochemical Profile of Cervico-Vaginal Mucus in Relation to Fertility in Crossbred Cows and Heifers. *Journal of Animal Research*, 8(2), 331-334. doi: 10.30954/2277-940X.04.2018.25.
8. Gomes, R. C. T., Verna, C., Nader, H. B., dos Santos Simões, R., Dreyfuss, J. L., Martins, J. R. M., and Soares Jr, J. M. (2009). Concentration and distribution of hyaluronic acid in mouse uterus throughout the estrous cycle. *Fertility and sterility*, 92(2), 785-792.
9. Hanumant, D., Tiwari, R.P., Chaturvedani, A.K., Paikra, D., Chandrakar, C. and Ratre, P., (2019). Analysis of corporeal characteristics of cervico-vaginal mucus in cows. *Pharma Innov. J.*, 8(3), 261-64.
10. Handrow, R. R., Lenz, R. W., & Ax, R. L. (1982). Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), 1326-1332.
11. Hryshchenko, O.V., Abu, K.A., Storchak, A.V., and Shevchenko, O.Y. (2009). Osobennosty obmena u raspredeleniya hlykozamynohlykanov v plodovykh obolochkakh u patsyentok s prezhdnevremennym yzlytyem okoloploдных vod pry nedonoshennoi beremennosti. [Prakt. medycyna], 15(3), 26-32.
12. Lee, C.N., Ax, R.L., (1984). Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci*;67(9), 2006-2009. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81536-2. PMID: 6436345.
13. Marie Le Berre, Jared Q. Gerlach, Catherine Loughrey, Aileen Creavin, Katarzyna Pluta, Mary Gallagher, Stephen D. Carrington, Lokesh Joshi, and Michelle Kilcoyne, (2021). Correction for 'Examination of oestrus-dependent alterations of bovine cervico-vaginal mucus glycosylation for potential as optimum fertilisation indicators. *Mol. Omics*, 17, 338–346, doi: 10.1039/D0MO00193G.
14. Maher, M.A., Sayyed, T.M. and Elkhoully N., (2018). Cervical mucus removal prior to intrauterine insemination: a randomized trial. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, 125(7), 841–847. doi: 10.1111/1471-0528.15003.
15. Mahmoud, A. I., & Parrish, J. J. (1996). Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 43(4), 554-560.
16. Modi, L.C., Suthar, B.N., Nakhasi, H.C., Sharma V.K. and Panchasara, H.H. (2011). Physical characteristics of oestral cervical mucus and conception rate in repeate breeder Kankrej cattle. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 5(4), 416-423.
17. Morales, P., Roco, M., Vigil, P. (1993). Human cervical mucus: relationship between biochemical characteristics and ability to allow migration of spermatozoa. *Hum Reprod*, 8(1), 78-83. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137879. PMID: 8458932.
18. Ningwal, D., Nema, S.P., Kumar, S., Kushwah, A. and Shivhare, M., (2018). Rheological properties of cervico-vaginal mucus in relation to fertility in crossbred cows and heifers. *Int. J. Adv. Res.*, 6(6), 495-500. doi: 10.21474/IJAR01/7236.
19. Nakano, F.Y., Lea, R.B., and Esteves, S.C. (2015). Insights into the role of cervical mucus and vaginal pH in unexplained infertility. *Med. Exp.*, 2(2), 1-8. doi: 10.5935/MedicalExpress.2015.02.07.
20. Ohgita, T., Takechi-Haraya, Y., Nadai, R., Kotani, M., Tamura, Y., Nishikiori, K., Nishitsuji, K., Uchimura, K., Hasegawa, K., Sakai-Kato, K., Akaji, K., and Saito, H. (2019). A novel amphipathic cell-penetrating peptide based on the N-terminal glycosaminoglycan binding region of human apolipoprotein E. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1;1861(3), 541-549. doi: 10.1016/j.bbmem.2018.12.010. Epub 2018 Dec 15. PMID: 30562499.
21. Parikh, S.S., Patbandha, T.K., Savaliya, B.D., Makwana, R.B., Raval, R.J. and Kapadiya, P.S., (2018). Association of estrous behaviour and cervical mucus properties with conception in Gir cows. *J. Pharma. Phytochem.*, 7(s1), 310-314.
22. Rathod, V. (2016). Therapeutic efficacy of GnRH and hCG analogue in non-infectious repeat breeding crossbred cows. M.V.Sc Thesis (Department of Veterinary Gynaecology and Obstetrics), Nanaji Deshmukh Veterinary Science University, Jabalpur (M.P).

23. Semeniuk, L.M., Demianenko, L.V., Chernukha, L.S., and Kryzhanivska, O.I. (2020). Sklad tsevirikalnoho slyzu yak pokaznyk fertylnosti zhinok zi znyzhenoiu lubrykatsiieiu ta nedostatnistiu androheniv. *Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery/ Klinichna endokrynolohiia ta endokrynna khirurhiia*. 1(69), 43-50. doi: 10.30978/CEES-2020-1.
24. Siregar, T.N., Agustina, I., Masyitah, D., Azhar, A., Dasrul, D., Thasmi, C.N., Sulaiman, R., and Daud, R. (2017). Physical properties of cervical mucus of repeat breeder Aceh cattle. *J. Vet.*, 18(3), 378-382. doi: 10.19087/jveteriner.2017.18.3.378.
25. Siregar, T.N., Armansyah, T., Panjaitan, B., Gholib, G., Herrialifian, H., Sutriana, A., Abidin, Z., Reynaldi, M.A., Razak, F. Artaliani, Y. and Yuswar, Y., (2019). Changes in cervical mucus as an indicator of fertility in Aceh cattle. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 7(4), 306-314. doi: 10.17582/journal.aavs/2019/7.4.306.314.
26. Verma, K.K., Prasad, S., Kumaresan, A., Mohanty, T.K., Layek, S.S., Patbandha, T.K. and Chand, S., (2014). Characterization of physico-chemical properties of cervical mucus in relation to parity and conception rate in Murrah buffaloes. *Vet. World*, 7(7), 467-471. doi: 10.14202/vetworld.2014.467-471.
27. Voskresenskyi, S.L., Hrudnytskaia, E.N., Serzhan, T.A., Kamyshnykov, V.S., Zubovskaia, E.T., and Kyrylenko, V.P. (2010). Krytery efektyvnosti khyrurhycheskoho lechenia patsyentok s syndromom polykystoznykh yaychnykov v zavysymosti ot kolychestva hlykozamynohlykanov v tsevirikalnoi slyzy. [Reproduktyvnoe zdorove v Belarusy], 4, 64–72.
28. Yıldız, A. (2021). The validity of the scores of cervical mucus during artificial insemination for estimating the probability of conceiving in clinically healthy cows. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 7(1), 58-65. doi: 10.17582/journal.vsr/2021.7.1.58.65.

Bondarenko I. V., Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Lazorenko A. B., Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

Concentration of connective tissue biopolymers of cervical mucus of cows at different stages of the estrus cycle and anaphrodisia

Timely detection of estrus in cows is the key to successful artificial insemination in Ukrainian farms. Until now, various methods of detecting the immobility reflex are used, including visual control of the condition of the external genitalia against the background of changes in behavior, contact with a test bull, quantitative and qualitative changes in cervical mucus. The condition of the cervical mucus is the most informative, since its physical and chemical changes do not go unnoticed when using any methods of diagnosing estrus. Despite this fact, until now many characteristics of cervical secretion remain unexplored, especially biochemical and physicochemical indicators at different stages and states of reproductive function. In order to study the regenerative and restorative processes and to diagnose infertility, the dynamics of the concentration of hexoses conjugated with protein, glycosaminoglycans and glycoproteins of the cervical mucus of the uterine herd of cows of experimental farms during different stages of the estrous cycle and during anaphrodisiacs were studied. The research was conducted on cows of the black-spotted and Swedish breeds, as well as on cows of the Simmental and brown dairy breeds. The material for research was cervical mucus, collected from the cervical canal of the uterus of cows aged 3-10 years, during estrus, the flowering of the corpus luteum, expected estrus, and from clinically healthy cows that did not show sexual cyclicity after contracting endometritis and delaying litter for more than 30 days To collect cervical mucus, a sanitary toilet of the external genitalia of cows was performed. A sterile vaginal speculum was inserted into the vagina, after which, using an additional light source, mucus was collected from the caudal part of the cervical canal using a sterile syringe and a catheter attached to it. After collection, the mucus was frozen for storage at a temperature of -20°C. Before the research, mucus samples were thawed at room temperature, homogenized with 0.5 N NaOH solution and left at +4°C for 2 hours. Further, the homogenate was centrifuged at 3000 rpm. within 15 minutes The actual content of protein-carbohydrate compounds in samples of mucus homogenates was calculated taking into account the ratio (volume of mucus - 0.5 N NaOH solution). In the supernatant, the content of hexoses combined with proteins, glycosaminoglycans and glycoproteins was determined by the fractional method in the orcinol reaction with fractionation with ethanol and cetylpyridine chloride. Photometry of the samples was carried out at 540 nm with an optical path length of 10 mm. The actual content of the test compounds is expressed in g/l or mg/l according to the calibration graph that shows the dependence: optical density is the concentration of hexoses. Principle of the method: proteins due to hexoses are precipitated in the presence of 96% ethanol. The hexoses released as a result of hydrolysis at 80°C interact with the orcin reagent (1.6% solution of orcin and concentrated sulfuric acid), coloring the reactogenic mixture in an orange color, the saturation of which is proportional to the concentration of hexoses in the sample. Hexoses of glycosaminoglycans were determined in the same way, but were precipitated with a 1% solution of cetylpyridinium chloride. The role of protein-bound hexoses, glycosaminoglycans, and glycoproteins in the process of transformation of genital organs during their preparation for insemination and fertilization has been clarified. As a result of the research, a significant difference in the content of protein-bound hexoses, glycosaminoglycans, and glycoproteins during various stages of the estrous cycle and during anaphrodisiacs was revealed. It was found that the number of glycosaminoglycans and glycoproteins significantly increases in the cervical secretion of cows during the manifestation of the immobility reflex, due to changes in biophysical properties and an increase in the number of gonadal hormones and enzymes. Estrus is characterized by a significant increase in glycosaminoglycans and glycoproteins in the cervical secretion of cows, which is caused by a change in the biophysical properties of the cervical mucus due to the increase in enzymes and gonadal hormones. In the post-morbid period, namely after endometritis and retention of litter, the content of glycosaminoglycans and glycoproteins in the cervical secretion decreases significantly, compared to the indicator during estrus.

Key words: cows, estrous cycle, estrus, cervical mucus, glycosaminoglycans, hexoses combined with proteins, glycoproteins, anaphrodisia.