Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi
dergipark.gov.tr/tutad
Araştırma Makalesi / Research Article

Turk J Agric Res
2018, 5(1): 58-64
© TÜTAD
ISSN: 2148-2306
e-ISSN: 2528-858X
doi: 10.19159/tutad.350951

Romanov Koyunları Amniyon Sıvısı ile Hyalüronidaz Aktivitesinin Araştırılması*

Mustafa Oğuzhan KAYA[1], Kıvanç İRAK[1], Seyrani MERSİN[2], Emrah YERLİKAYA[3], Hasan KARAGEÇİLİ[4]**

[1]*Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Siirt, TÜRKİYE*

[2] *Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Bilimler Bölümü, Siirt, TÜRKİYE*

[3]*Siirt Üniversitesi, Siirt Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Siirt, TÜRKİYE*

[4]*Siirt Üniversitesi, Siirt Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümü, Siirt, TÜRKİYE*

Geliş Tarihi/Received: 10.11.2017 **Kabul Tarihi/Accepted:** 25.12.2017

ORCID ID (Yazar sırasına göre / by author order)

orcid.org/0000-0002-8592-1567 orcid.org/0000-0001-9765-0330 orcid.org/0000-0001-7105-9622

orcid.org/0000-0003-4050-0790 orcid.org/0000-0001-6912-3998

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author: oguzhan@siirt.edu.tr

Özet: Sığır testis hyalüronidazı (Bovine Testicular Hyaluronidase, BTH) endüstriyel alanda, kanser çalışmalarında ve birçok hayvan uygulamalarında oldukça önemli bir enzimdir. Bu çalışmada, Romanov ırkı koyunların amniyon sıvıları BTH enzimi için alternatif yeni bir substrat kaynağı olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, ticari olarak satın alınan hyalüronik asit (HA) ile tespit edilen BTH aktivitesi 9.187 U mL^{-1} bulunurken, 35 farklı amniyotik keseden alınan sıvılar kullanılarak BTH aktivitesi 1.604-18.659 U mL^{-1} aralığında bulunmuştur. Romanov ırkı koyunların amniyon sıvısının HA içeriğinden dolayı BTH enzimi için bir substrat kaynağı olup olmadığına dair rapor edilen herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Çalışma sonunda ticari HA substrat olarak kullanıldığında hesaplanan BTH aktivitesi ile amniyon sıvıları kullanılarak elde edilen BTH aktiviteleri oldukça yakın olduğundan, Romanov ırkı koyunların amniyon sıvılarının yeni bir HA kaynağı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Romanov koyunu, hyalüronidaz, hyalüronik asit, amniyon sıvısı, substrat

Investigation of Hyaluronidase Activity with Amniotic Fluid on Romanov Sheep

Abstract: Bovine testicular hyaluronidase (BTH) is a very important enzyme in industrial field, cancer studies and in many animal applications. In this study, it was investigated whether amniotic fluid of Romanov sheep could be used as an alternative new substrate source for BTH enzyme. As a result of the study, the BTH activity was found as 9.187 U mL^{-1} with commercially available hyaluronic acid (HA), while the BTH activity of 35 different amniotic fluids was found between 1.604-18.659 U mL^{-1}. No information was reported on whether the amniotic fluids of the Romanov breed sheep were a source of substrate for the BTH enzyme due to the HA content. It was thought that amniotic fluid of the Romanov breed sheep could be a new HA source, as the BTH activity calculated using the commercial HA and the BTH activities obtained using amniotic fluid were very close.

Keywords: Romanov sheep, hyaluronidase, hyaluronic acid, amniotic fluid, substrate

*: Bu çalışmanın bir bölümü 20-22 Eylül 2017 tarihleri arasında düzenlenen, KROMATOGRAFİ'17 adlı kongrede sözlü sunum olarak sunulmuş ve özet bildiri olarak yayınlanmıştır.

1. Giriş

Doğrusal polisakkarit bir makromolekül olan ve suda iyi çözünürlüğe sahip hyalüronik asit (HA), tekrarlanan D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşur. Hücre dışı matriksin ana bileşeni olan HA; hücre adezyonunu, göç ve hızlı doku çoğalmasını etkileyen bir faktör olmasının yanı sıra (Pogrel ve ark., 1996; Kobayashi ve ark., 1999; Bot ve ark., 2008) rejenerasyon ve tümör hücrelerinin birkaç biyolojik özelliği ile de yakından ilişkilidir (Pogrel ve ark., 1996; Kobayashi ve ark., 1999; Song ve ark., 2014). Ayrıca HA hücre farklılaşmasını artıran, antienflamatuvar özelliği olan bir polisakkarit olup, osteoblastik kemik oluşumunu artırıcı etkiye sahiptir (Sasaki ve Watanabe, 1995; Karacal ve ark., 2005; Aydın ve ark., 2011; Özgenel ve ark., 2004).

Serviks uteri, büyük ölçüde kollagen, proteoglikan ve HA ihtiva eden fibröz bir dokudan oluşur. Hamilelik ilerledikçe bu bileşenlerde gözlemlenen değişim, hyalüronik asitte bir artış oluşturmaktadır (Osmers ve ark., 1993). Serviksin olgunlaşması, doğum esnasında serviksin yumuşayıp gevşemesi ve nemli (kaygan) hale gelmesi ile karakterizedir (Lopez Bernal ve ark., 1993). Bu değişiklikler doğum olaylarından daha önce hızlı ve seri bir şekilde gerçekleşen olgunlaşma süreçlerini yansıtır (Kobayashi ve ark., 1999).

Amniyon sıvısı, mukoid tarzda, hayvan türüne göre değişen miktarda olup, fetüse ait nazofarengeal sekresyonların yanısıra, anne karnından sıvıların difüzyon yolu ile kesenin içine dolarak oluşmaktadır. Bu sıvı, fetüsün anneye yapışmasını engellemekte, yavruyu fiziki darbelerden korumakta ve gebeliğin erken döneminde fetüse enerji kaynağı oluşturmaktadır. Semacan ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise, doğum sırasında doğum kanalının kayganlaştırılmasında önemli rol oynadığı gösterilmektedir.

Yapılan birçok çalışmayla; amniyon sıvısı, insülin benzeri büyüme faktörleri (Insulin-like growth factor I-II, IGF), epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF), fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor, FGF), fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler makromoleküllerden zengin bir sıvı olduğu görülmüştür. Bu büyüme faktörleri, hücre bölünmesinde ve yeni kan damarlarının oluşumunda oldukça önemli role sahip oldukları yine bu çalışmalarla tespit edilmiştir (Kumar ve Cotran, 1944; Merimee ve ark., 1984; Sasaki ve Watanabe, 1995; Karacal ve ark., 2005; Aydın ve ark., 2011). Bu faktörlerin yanı sıra amniyon sıvısı, HA ve HA aktive edici faktör (HASA) içermektedir (Merimee ve ark., 1984; Einhorn, 1995; Karacal ve ark., 2005; Aydın ve ark., 2011).

Hyalüronidaz (HAase), hyalüronik asitin N-asetil-d-glukozamin bağlarını parçalayarak doku geçirgenliğini arttırmasıyla, HA parçalayıcı bir enzim olarak rol oynar (Wang ve ark., 2015). Cheng ve ark. (2014) ve Huang ve ark. (2015) tarafından rapor edilen bir çalışmada, bazı kanser hastalarında kesinlik kazanmış kanser türleriyle anlamlı ilişkisi olduğu için, HAase yeni bir tümör işaretleyici türü olarak kabul edilmiştir. HAase tespiti için çoğunlukla türbidimetrik, viskometrik, kolorimetrik (Nossier ve ark., 2014), floresan algılama (Fudala ve ark., 2011) gibi cihazsal ve kimyasal destekli analiz içeren çeşitli yöntemler mevcuttur. Ancak HAase aktivitelerine yönelik stratejiler arasında, klasik yöntemler (Örneğin; türbidimetrik, viskozimetrik ve kolorimetrik yöntemler) genellikle duyarlılık ve seçicilikten yoksundur. Bu sebeplerden dolayı, HAase aktivitesini belirlemek için kolay ve doğru stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir (Yang ve ark., 2017).

BTH, hyalüronik asidi β-1,4-glikozidik bağından parçalayabilen bir endo-glikanohidrolazdır (EC 3.2.1.35) (Takagaki ve ark., 1994). Hyalüronik asidin BTH tarafından parçalanma mekanizması oldukça karmaşıktır. BTH aynı zamanda substratın parçalanma ve uzama tepkimelerini sırasıyla hidroliz ve transglikozilasyon tepkimeleriyle katalizler. Çünkü oligosakkaritler her iki tepkime için sıralı substratlar olarak hareket edebilir ve tepkime ürünlerini, nasıl üretildiklerini tespit etmek zordur. (Gorham ve ark., 1975; Highsmith ve ark., 1975; Takagaki ve ark., 1994; Nakatani, 2002; Hofinger ve ark., 2007; Deschrevel ve ark., 2008).

Bu çalışmada; Romanov ırkı koyunların doğumu esnasında, içeriğinde HA olduğu uzun zamandan beri bilinen amniyotik keseden amniyon sıvısı alınmıştır. Romanov amniyon sıvısının, BTH için alternatif bir substrat kaynağı olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. BTH için ticari HA ve amniyon sıvılarının her biri substrat olarak ayrı ayrı kullanılmış ve elde edilen BTH aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Bu çalışma için kullanılan hyalüronik asit (HA), Sigma Chemical Company'den; sodyum hidroksit, soydum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, sodyum format Merck'ten temin edilmiştir. Amniyon sıvıları Siirt Üniversitesi Keçi

Araştırma Merkezi'nden, testis numuneleri ise Siirt ve yöresindeki mezbahanelerden taze olarak alınmıştır. Ticari amaçlar için kesilen bu sığırların atıl durumdaki testis örnekleri deneysel çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Testis örneklerinin hazırlanması

Testisler küçük parçalara ayrılıp ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Homojenize edilen testis örneği 15000 rpm, +4 °C'de 60 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısım alınarak aynı gün deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (Kaya ve ark., 2015).

2.2.2. Enzim aktivite tayini

BTH aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Aktivite ölçümü için 0.05 mL enzim çözeltisi alınmış ve daha önceden hazırlanmış olan 1mL tampon (200 mM sodyum format pH 3.71) + substrat (12.3 mM HA çözeltisi) çözeltisine çabuk bir şekilde eklenmiştir. Sonra 37 ºC, 232 nm'de (Greiling, 1957; Suzuki ve ark., 2001; Kakizaki ve ark., 2010; Lee, 2011; Guo ve ark., 2014) 1 dakika içinde absorbansta meydana gelen değişim okunmuştur. Bu şekilde hyalüronik asidin N-asetilglukozamine (NAG) enzimatik dönüşüm hızı tespit edilmiştir. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlenmiş ve 1 ünite hyalüronidaz, dakikada meydana gelen N-asetilglukozaminin µmol'ü olarak tayin edilmiştir (Greiling, 1957; Suzuki ve ark., 2001; Lee, 2011).

2.2.3. BTH aktivitesinin hesaplanması

BTH aktivitesi; 232 nm'de, HA substratının 12.3 mM sabit derişimi kullanılarak aşağıda verilen Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır (Hoechstetter, 2005).

$$v[\mu mol\ l^{-1}\ min^{-1}] = \Delta A / (\Delta t \times \varepsilon \times l) \quad (1)$$

Eşitlikte; v, enzim aktivitesini; ΔA, absorbanstaki artışı; Δt, birim zamanı; ε_{232}= 4550 l mol^{-1} cm^{-1} sabitini ifade etmektedir.

2.2.4. Amniyon sıvılarının alınması

Doğumu başlayan koyunların yanında alışmalarını sağlamak için bekleyip, amniyon kesesi ile çıkan yavruların keselerin bütünlüğünü bozmadan tek kullanımlık 20 cc'lik enjektörler ile amniyosentez yapılmıştır. Doğum esnasında yırtılan amniyon keselerinden enjektör ucu takılmadan amniyonik sıvı aspire edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

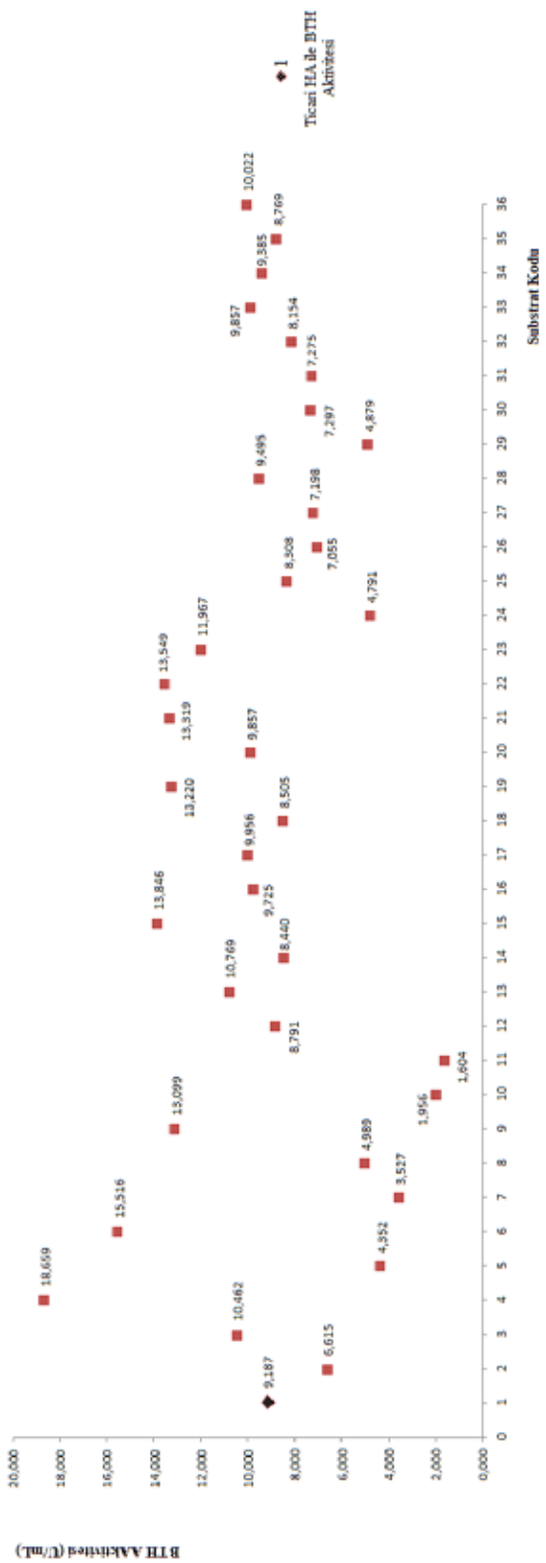
Bu çalışmada 35 farklı amniyotik keseden alınan sıvılara ve ticari olarak temin edilen HA'ya karşı BTH aktiviteleri dağılımı Şekil 1'de verilmiştir. Araştırma sonucunda, ticari olarak satın alınan HA ile tespit edilen BTH aktivitesi 9.187 U mL^{-1} bulunurken, 35 farklı amniyotik keseden alınan sıvılar kullanılarak BTH aktivitesi 1.604-18.659 U mL^{-1} aralığında bulunmuştur (Tablo 1 ve 2).

BTH birçok dokuda yaygın olarak bulunmasına rağmen memeli testislerinde oldukça bol bulunması, kolay ulaşılabilirliği, taze olarak çalışılma avantajları gibi nedenlerden dolayı enzim kaynağı olarak sığır testisi tercih edilmiştir.

BTH enziminin geniş substrat spesifikliğine sahip olması, preperatif organik kimya açısından önemlidir. BTH, son yıllarda birçok klinik çalışmalarda oldukça yoğun bir ilgi duyulduğu bilinmektedir. Ayrıca sığır testis hyalüronidazının, kanser çalışmalarında, endüstriyel alanda, suni tohumlamada önemli bir enzim olması (Laemmli, 1970; Alexander, 1977; Grenier ve Michaud, 1993; Jin ve ark., 2011; Tong ve ark., 2012) nedeniyle, yeni substrat kaynaklarının tespiti büyük önem arz etmektedir. Günümüzde ticari olarak kabul gören en iyi HA kaynakları; *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus*, sığır vitröz humör sıvısı, horoz tarağı ve insan göbek kordonu olarak bilinmektedir (Anonymous, 2017). Bu sebeple, ulaşılabilirliği kolay, daha ucuz, daha pratik ve özellikle atıl durumdaki biyolojik materyallerden olan amniyotik sıvının BTH için yeni bir substrat kaynağı olup olamayacağı yapılan bu çalışmayla değerlendirilmiştir.

Ticari HA ile BTH aktivitesi 9.187 U mL^{-1} olarak bulunmuşken, koyun amniyotik sıvılarına ait BTH aktivite ortalaması ise 9.006 U mL^{-1} olarak bulunmuştur (Tablo 1). Bu değerlerin birbirlerine yakınlığı görülmüş ve Romanov ırkı koyunların amniyon sıvılarının potansiyel yeni bir BTH substrat kaynağı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmanın devam ettiği dönemde, doğum yapan hayvanların arasında üçüz doğum yapan bir koyununun yavrularından ikisinin ölü olarak doğduğu görülmüş ve bu yavrulara ait amniyotik keseden alınan sıvılarla BTH aktiviteleri ölçülmüştür. Ölü doğan yavrulara ait keseden alınan sıvı ile BTH aktiviteleri 1.604 ve 1.956 U mL^{-1}, sağlıklı doğan yavrunun kesesinden alınan sıvıyla BTH aktivitesi ise 8.791 U mL^{-1} olarak hesaplanmıştır. 1.604 ve 1.956 U mL^{-1} değerleri 35



Şekil 1. BTH enziminin ticari HA ve otuz beş amniyotik sıvı ile elde edilen aktivite dağılım grafiği

farklı amniyon sıvısının substrat olarak kullanıldığında hesaplanan BTH aktiviteleri arasında en düşük iki değer olduğu saptanmıştır (Tablo 1 ve 2). Bu iki değerin dışlanmasıyla geriye kalan 33 BTH aktivite değerlerinin ortalaması ise 9.444 U mL^{-1} olarak bulunmuştur (Tablo 3). 9.444 U mL^{-1} değerinin ise ticari HA kullanılarak ölçülen 9.187 U mL^{-1}'lik BTH aktivitesinden daha yüksek bir değer olduğu görülmüş ve önem arz ettiği düşünülmüştür.

Tablo 1. Farklı substrat kaynakları ile BTH aktiviteleri (U mL^{-1})

Substrat kodu	BTH enzim aktivitesi	Substrat kodu	BTH enzim aktivitesi	Substrat kodu	BTH enzim aktivitesi	Substrat kodu	BTH enzim aktivitesi
Ticari HA	9.187	A-9*	1.956	A-18	13.220	A-27	9.495
A-1	6.615	A-10*	1.604	A-19	9.857	A-28	4.879
A-2	10.462	A-11*	8.791	A-20	13.319	A-29	7.297
A-3	18.659	A-12	10.769	A-21	13.549	A-30	7.275
A-4	4.352	A-13	8.440	A-22	11.967	A-31	8.154
A-5	15.516	A-14	13.846	A-23	4.791	A-32	9.857
A-6	3.527	A-15	9.725	A-24	8.308	A-33	9.385
A-7	4.989	A-16	9.956	A-25	7.055	A-34	8.769
A-8	13.099	A-17	8.505	A-26	7.198	A-35	10.022

A-: Farklı hayvanlardan alınan amniyotik sıvı örnekleri, A-9* ve A-10* : Üçüz doğumda ölü doğan yavrulara ait amniyotik sıvı örnekleri, A-11*: Üçüz doğumda sağlıklı doğan yavruya ait amniyotik sıvı örneği

Tablo 2. Substrat olarak amniyotik sıvıların kullanılmasıyla elde edilen BTH aktivite (U mL^{-1}) aralıkları ve adedi

BTH aktivite (U mL^{-1}) aralığı	Adet
0.000-5.000	7
5.001-10.000	17
10.001-15.000	9
15.001-20.000	2
Toplam	35

Tablo 3. BTH aktivite verileri

Aktivite	U mL^{-1}
Koyun amniyotik sıvılarına ait BTH aktivite ortalaması	9.006
Koyun amniyotik sıvılarına ait en yüksek ve en düşük BTH aktivitelerinin ortalaması	10.132
Koyun amniyotik sıvılarına ait en yüksek iki BTH aktivitesi ve en düşük iki BTH aktivitelerinin ortalaması	9.434
Koyun amniyotik sıvılarına ait en yüksek üç BTH aktivitesi ve en düşük üç BTH aktivitelerinin ortalaması	9.185
Ticari olarak temin edilen HA ile BTH aktivitesi	9.187
Ölü doğanların amniyotik sıvısı hariç BTH aktivite ortalaması	9.444

4. Sonuçlar

Literatürde HA kaynaklarının araştırılmasına dair bilgilere ulaşılmasına rağmen, Romanov ırkı koyunların amniyon sıvısının HA içeriğinden dolayı BTH enzimi için yeni bir substrat kaynağı olup olmadığına dair rapor edilen herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmanın yorumlanmasıyla, ticari HA kaynağı substrat olarak kullanıldığında hesaplanan BTH aktivitesi ile amniyon sıvıları kullanılarak elde edilen BTH aktiviteleri oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bu görüş doğrultusunda, Romanov ırkı koyunların amniyon sıvılarının yeni bir HA kaynağı olabileceği düşünülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışma; 2017-SİÜVET-41 no'lu proje ile Siirt Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş olup; Siirt Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafınca 19/04/2017 tarih ve 2017/04/02 karar numarası ile etik onayı almıştır.

Kaynaklar

Alexander, N.J., 1977. Surface structure of spermatozoa frozen for artificial insemination. *Andrologia*, 9(2): 155-161.

Anonymous, 2017. Hyaluronic Acid (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search? term=hyaluronic+acid&interface=All&N=0&mode=match%20partial max&lang=en&region=US&focus=product), (Erişim tarihi: 23.11.2017).

Aydın, H., Saraçoğlu, M., Kerimoğlu, G., Kerimoğlu, S., Topbaş, M., 2011. İnsan amniyon sıvısının posterolateral spinal füzyon üzerindeki etkileri: Deneysel bir ön çalışma. *Joint Diseases and Related Surgery*, 22(3): 166-171.

Bot, P.T., Hoefer, I.E., Piek, J.J., Pasterkamp, G., 2008. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Current Medicinal Chemistry*, 15(8): 786-791.

Cheng, D., Han, W., Yang, K., Song, Y., Jiang, M., Song, E., 2014. One-step facile synthesis of hyaluronic acid functionalized fluorescent gold nanoprobes sensitive to hyaluronidase in urine specimen from bladder cancer patients. *Talanta*, 130: 408-414.

Deschrevel, B., Tranchepain, F., Vincent, J.C., 2008. Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 27(5): 475-486.

Einhorn, T.A., 1995. Enhancement of fracture-healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 77(6): 940-956.

Fudala, R., Mummert, M.E., Gryczynski, Z., Gryczynski, I., 2011. Fluorescence detection of hyaluronidase. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(3): 473-477.

Gorham, S.D., Olavesen, A.H., Dodgson, K.S., 1975. Effect of ionic strength and pH on the properties of purified bovine testicular hyaluronidase. *Connective Tissue Research*, 3(1):17-25.

Greiling, H., 1957. Spectrophotometric method for the determination of bacterial hyaluron idase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, 309: 239-242.

Grenier, D., Michaud, J., 1993. Evidence for the absence of hyaluronidase activity in Porphyromonas gingivalis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(7):1913-1915.

Guo, X., Shi, Y., Sheng, J., Wang, F., 2014. A novel hyaluronidase produced by *Bacillus* sp. A50. *Plos One*, 9(4): e94156.

Highsmith, S., Garvin, J.H.J., Chipman, D.M., 1975. Mechanism of action of bovine testicular hyaluronidase. Mapping of the active site. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(18): 7473-7480.

Hoechstetter, J., 2005. Characterisation of Bovine Testicular Hyaluronidase and a Hyaluronate Lyase from Streptococcus Agalactiae. Universität Regensburg, Naturwissenschaftlichen Fakultät, Erlangung des Doktorgrades, Regensburg, Germany.

Hofinger, E.S.A., Bernhardt, G., Buschauer, A., 2007. Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: Comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction. *Glycobiology*, 17(9): 963-971.

Huang, Y., Song, C., Li, H., Zhang, R., Jiang, R., Liu, X., Zhang, G., Fan, Q., Wang, L., Huang, W., 2015. Cationic conjugated polymer/hyaluronan-doxorubicin complex for sensitive fluorescence detection of hyaluronidase and tumor-targeting drug delivery and ımaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(38): 21529-21537.

Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A, Chiba, K., Hirohashi, N., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12):4892-4896.

Kakizaki, I., Ibori, N., Kojima, K., Yamaguchi, M., Endo, M., 2010. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase. *FEBS Journal*, 277(7): 1776-1786.

Karacal, N., Kosucu, P., Cobanglu, U., Kutlu, N. 2005. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *The Journal of Surgical Research*, 129(2):283-287.

Kaya, M.O., Arslan, O., Guler, O.O., 2015. A new affinity method for purification of bovine testicular hyaluronidase enzyme and an investigation of the effects of some compounds on this enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(4): 524-527.

Kobayashi, H., Sun, G.W., Tanaka, Y., Kondo, T., Terao, T., 1999. Serum hyaluronic acid levels during pregnancy and labor. *Obstetrics and Gynecology*, 93(4): 480-484.

Kumar, V., Cotran, R.S., 1944. Basic Pathology. 5th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lee, J.H., 2011. Structural and Functional Studies on Group a Streptococcal Bacteriophage Hyaluronidase. University of Alabama, Degree of Doctor of Philosophy, Birmingham, Alabama.

Lopez Bernal, A., Watson, S.P., Phaneuf, S., Europe Finner, G.N., 1993. Biochemistry and physiology of preterm labour and delivery. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 7(3): 523-552.

Merimee, T.J., Grant, M., Tyson, J.E., 1984. Insulin-like growth factors in amniotic fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 59(4): 752-755.

Nakatani, H., 2002. Monte Carlo simulation of hyaluronidase reaction involving hydrolysis, transglycosylation and condensation. *The Biochemical Journal*, 365(3): 701-705.

Nossier, A.I., Eissa, S., Ismail, M.F., Hamdy, M.A., Azzazy, H.M., 2014. Direct detection of hyaluronidase in urine using cationic gold nanoparticles: A potential diagnostic test for bladder cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 7-14.

Osmers, R., Rath, W., Pflanz, M.A., Kuhn, W., Stuhlsatz, H.W., Szeverenyi, M., 1993. Glycosaminoglycans in cervical connective tissue during pregnancy and parturition. *Obstetrics and Gynecology*, 81(1): 88-92.

Özgenel, G.Y., Filiz, G., Özcan, M., 2004. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *British Journal of Plastic Surgery*, 57(5): 423-428.

Pogrel, M.A., Lowe, M.A., Stern, R., 1996. Hyaluronan

(hyaluronic acid) in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 41(7): 667-671.

Sasaki, T., Watanabe, C., 1995. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, 16(1): 9-15.

Semacan, A., Kaymaz, M., Fındık, M., Şirvanlı, A., Köker, A., 2015. Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Medipres Matbaacılık, Malatya, Türkiye.

Song, S., Chen, F., Qi, H., Li, F., Xin, T., Xu, J., Ye, T., Sheng, N., Yang, X., Pan, W., 2014. Multifunctional tumor-targeting nanocarriers based on hyaluronic acid-mediated and pH-sensitive properties for efficient delivery of docetaxel. *Pharmaceutical Research*, 31(4): 1032-1045.

Suzuki, A., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T., 2001. Preparation and inhibitory activity on hyaluronidase of fully O-sulfated hyaluro-oligosaccharides. *Glycobiology*, 11(1): 57-64.

Takagaki, K., Nakamura, T., Izumi, J., Saitoh, H., Endo, M., Kojima, K., Kato, I., Majima, M. 1994. Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ion-spray mass spectrometry. *Biochemistry*, 33(21): 6503-6507.

Tong, X.H., Wu, L.M., Jin, R.T., Luo, L.H., Luan, H.B., Liu, Y.S., 2012. Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes. *Human Reproduction*, 27(11):3208-3214.

Wang, Z., Li, X., Song, Y., Li, L., Shi, W., Ma, H., 2015. An upconversion luminescence nanoprobe for the ultrasensitive detection of hyaluronidase. *Analytical Chemistry*, 87(11): 5816-5823.

Yang, K., Liu, M., Wang, Y., Wang, S., Miao, H., Yang, L., Yang, X., 2017. Carbon dots derived from fungus for sensing hyaluronic acid and hyaluronidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251: 503-508.