



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci, 31 (2016)  
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)  
doi: 10.7161/omuanajas.269994



Bazı yem ve gübre sanayi kimyasallarının hyalüronidaz üzerine *in vitro* etkileri

Mustafa Oğuzhan Kaya<sup>a\*</sup>, Emrah Yerlikaya<sup>b</sup>, Mehmet Arif Özyazıcı<sup>c</sup>, Kıvanç İrak<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye

<sup>b</sup>Siirt Üniversitesi, Siirt Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Siirt, Türkiye

<sup>c</sup>Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Siirt, Türkiye

\*Sorumlu yazar/corresponding author: m.oguzhankaya@gmail.com

Geliş/Received 29/04/2016

Kabul/Accepted 31/10/2016

ÖZET

Bu çalışmada, terapötik ve çeşitli tıbbi alanlarda yayılma faktörü olarak kullanılan, glikoteknolojik uygulamalar ve suni tohumlamada önemli derecede etkili siğır testis hyalüronidazı (BTH: bovine testicular hyaluronidase) üzerine yem ve gübre sanayisinde sıkça kullanılan bazı kimyasalların *in vitro* etkileri araştırılmıştır. BTH, amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ve afinite jeli (Sepharose-4B-L- tirozin-m-anisidin) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan BTH enzimi üzerine Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O ve İndol-Bütirik Asitin inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Bu kimyasallar için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 7.097, 5.775, 6.854, 5.317, 4.617, 4.265 × 10<sup>-2</sup> mM olarak bulunmuş ve araştırma sonucunda, IC<sub>50</sub> değeri 4.265 × 10<sup>-2</sup> mM ile indol-bütirik asit (IBA) en güçlü inhibisyon etkisi gösteren yapı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler:  
Gübre  
Hyalüronidaz  
İnhibisyon  
Suni tohumlama  
Yem

*In vitro* effects of some forage industry chemicals on hyaluronidase

ABSTRACT

This study investigates *in vitro* effects of some chemicals, used as a spreading factor on therapeutic and various medical fields and applied frequently in forage and fertilizer industry on bovine testicular hyaluronidase (BTH) which is substantially effective in glucotechnological applications and delivery of artificial insemination. BTH was purified through ammonium sulfate precipitation method and affinity gel (Sepharose-4B-L- tyrosine -m-anisidine). The inhibiton effects of Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O and indole-butyric acid were determined on purified BTH. IC<sub>50</sub> values of these chemicals were found as 7.097, 5.775, 6.854, 5.317, 4.617, 4.265 × 10<sup>-2</sup> mM respectively and at the end of research, indole-butyric acid (IBA) was found as the strongest inhibitory effect compound by the value of IC<sub>50</sub> with 4.265 × 10<sup>-2</sup> mM.

Keywords:  
Fertilizer  
Hyaluronidase  
Inhibition  
Artificial insemination  
Forage

© OMU ANAJAS 2016

1. Giriş

“Hyalüronidaz” terimi; Karl Meyer ve arkadaşları tarafından 1940 yılında, söz konusu enzimin hyalüronik asiti (HA) parçalamasından dolayı bu ifadeyle tanıtılmıştır (Gladys ve ark., 1940). Hyalüronidazlar çok sayıda dokularda ve organizmalarda tespit edilmiştir. Örneğin bunlar bazı bakteriler (bakteriyofaj-bakteriyel hyalüronidaz), patojenik fungi (Candida, Streptomisler) ve omurgasız hayvanlardır (kabuklular, böcekler). Omurgalılarıdaki hyalüronidazlar; kertenkele ve yılan zehrinde, testislerde, karaciğer, böbrek ve lenfatik sistem gibi çeşitli somatik dokularda

bulunmaktadır. Farklı dokulardan izole edilmiş hyalüronidazların, moleküler kütlesi, substrat spesifikliğı, optimum pH’sı ve substrat bozunum mekanizmaları farklıdır (Sluis, 1987; Kreil, 1995; Frost ve ark., 1996; Csoka ve ark., 1997).

Memeli testis ekstraktlarının hyalüronidaz aktivitesi içerdiği uzun zamandır bilinmektedir (Grais ve Glick, 1948). Memeli testis ekstraktlarından ve diğer dokulardan elde edilen hyalüronidazlar, bir “yayılma faktörü” olarak görev görebilirler. Nitekim, hyalüronidazların anti-viral aşular, boyalar ve toksinlerin enjeksiyonunun difüzyonunu kolaylaştırıcı madde olduğu 1928 yılında Duran-Reynals tarafından gösterildiği bildirilmektedir

(Hochstetter 2005). Büyükbaş ve küçükbaş testis hyaluronidaz preparatları yıllardır terapötik ve çeşitli tıbbi alanlarda bir yayılma faktörü olarak uygulanmaktadır (Baumgartner ve Moritz, 1988). 1997 yılında ana çözünebilir hyaluronidazın boğa testis ekstraktlarında bulunduğu tespit edilmiş ve membrana bağlı PH-20 enziminin bir parçası olduğu anlaşılmıştır (Meyer ve ark., 1997).

PH-20 proteini; hyaluronidaz aktivitesi sayesinde kumulus ooforusun (gelişen graaf folikülünde yumurtayı çevreleyen folikül boşluğuna doğru çıkıntı yapan granulos hücreleri kümesi) hyaluronik asit komponentinin depolimerizasyonu ile penetrasyonu ve sperm-zona pellusida etkileşimi gibi birçok fonksiyona sahiptir (Cherr ve ark., 2001).

Literatürde sığır testis hyaluronidazını (Bovine testicular hyaluronidase, BTH) farklı oranlarda inhibe eden çeşitli kimyasallara dair birçok veri bulunmaktadır (Botzki ve ark., 2004; Hertel ve ark., 2006; Kakizaki ve ark., 2010; Kaya, 2013; Kaya ve ark., 2014). Öte yandan yapılan literatür taramasında; hayvan besiciliğinde, gerek yem sanayinde kullanılan katkı maddelerinde, gerekse yem bitkileri tarımında kullanılan gübrelerin yapısında bulunan ve bu çalışmada da incelenen bazı kimyasallara yönelik veriler yer almaktadır (Jackson ve ark., 1927; Saadullah ve ark., 1981; Rushing ve ark., 1985; Pant ve ark., 1996; Boling ve ark., 1998; Mahmood ve ark., 2011; Kleigrew ve ark., 2012; Dai ve ark., 2013; Luo ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015; Kazemi-Bonchenari ve ark., 2016). Ancak çalışmamızda kullanılan kimyasallarla ilgili olarak sığır testis hyaluronidazı üzerine rapor edilmiş herhangi bir inhibisyon çalışmasının olmayışı, bu çalışmanın önemi daha da arttırmaktadır.

Bu çalışmada; yem ve gübre sanayinde sıklıkla kullanılan bazı kimyasalların, suni tohumlamada etkin bir rol oynayan sığır testis hyaluronidazı üzerine *in vitro* etkileri araştırılarak, söz konusu kimyasalların her biri için inhibisyon sabitlerinden biri olan IC<sub>50</sub> değerlerinin tespiti amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Araştırmada kullanılan kimyasallar

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B, m-anisidin, L-tirozin, Hyaluronik asit, tris (hidroksimetil) aminometan HCl (Tris-HCl), Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>), C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub> ve indol-bütirik asit (IBA) Sigma Chemical Comp.'den; Sodyum hidroksit, Trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, fosforik asit, sodyum azotür, sodyum nitrat, sodyum tiyosiyanat ve sodyum siyanür Merck A.G'den; metanol, etanol, amonyum persülfat ve dekstroz Riel de Haen A.G'den temin edilmiştir.

### 2.2. Testis örneğinin hazırlanması

Testis numuneleri, mezbahaneden kesim sonrası taze alınarak küçük parçalara ayrılıp ekstraksiyon tamponunda (8,20 g (0,1 mol) CH<sub>3</sub>COONa ve 8,77 g (0,15 mol) NaCl 950 mL distile suda çözülerek, 1M HCl ile pH'sı 5.4'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı) homojenize edilmiştir. Homojenize edilen testis örneği 15000 rpm'de +4 °C'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım (supernatant) alınarak aynı gün deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

### 2.3. Enzimin aktivite tayini

Hyaluronidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon (200 mM sodyum format (HCOONa) pH 3.71) + substrat (12,3 mM hyaluronik asit çözeltisi) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 232 nm'de (Suzuki ve ark., 2001; Kakizaki ve ark., 2010; Fallis, 2013; Guo ve ark., 2014) 1 dakikadaki 37 °C'de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde hyaluronik asitin N-asetilglukozamine (NAG) enzimatik dönüşüm hızı tespit edilmiştir. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlenmiş ve 1 ünite hyaluronidaz dakikada meydana gelen NAG'in µmol'u olarak tayin edilmiştir (Suzuki ve ark., 2001; Fallis 2013).

### 2.4. Amonyum sülfat çöktürmesi

Araştırmamızda BTH enzimini sığır testisinden saflaştırmak için afinite kromatografisi tekniğini uygulamadan önce ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu amaçla % 40–60 amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmıştır (Kaya ve ark., 2014).

### 2.5. Afinite jelinin sentezi

#### 2.5.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

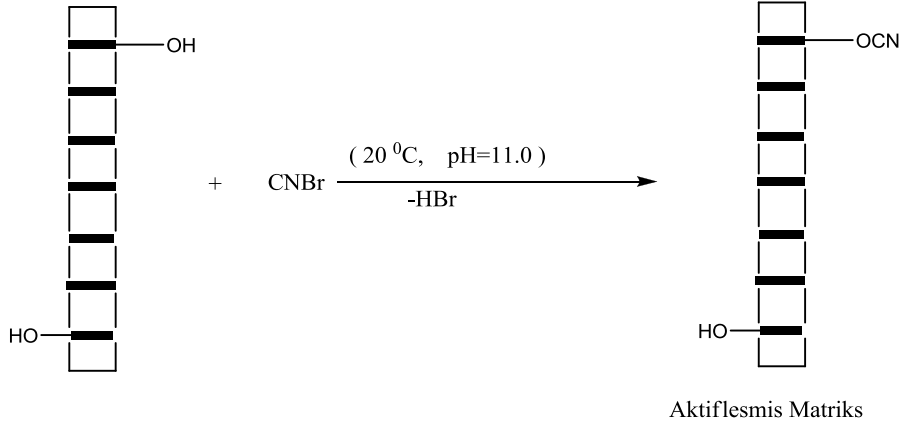
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve tepkime bu pH'da muhafaza edildi. Tepkimeye pH değişmeye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 1).

#### 2.5.2. L-tirozinin bağlanması

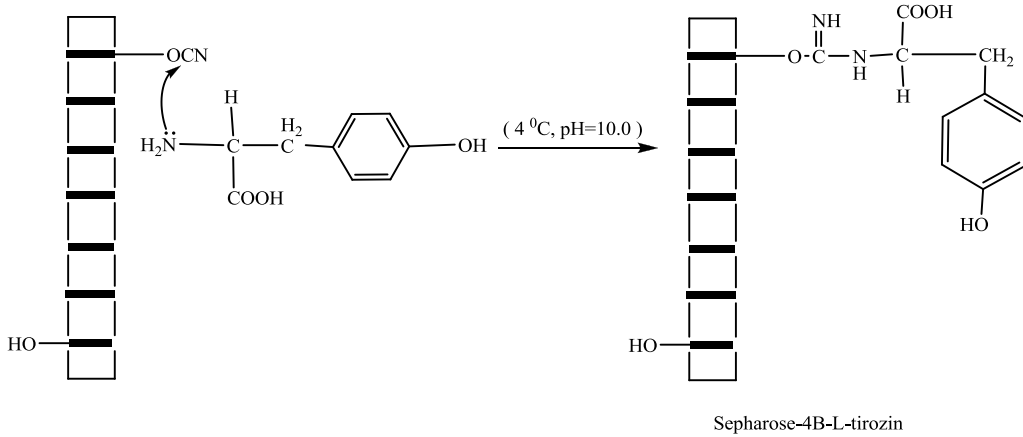
CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4 °C'de

bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorpsiyon vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece tepkimeye girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>

tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL’si içine alındı (Şekil 2).



Şekil 1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi



Şekil 2. L-Tirozinin bağlanması

### 2.5.3. m-Anisidin bileşiğinin bağlanması

25 mg m-anisidin 0 °C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C’deki 5 mL çözelti, m-anisidin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika tepkimededen sonra diazolanmış bulunan m-anisidin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5’a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 3).

### 2.5. BTH'nin afinite jeliyle saflaştırılması

Önceki çalışmamızda grubumuz tarafından sentezlenen afinite jeli (Sepharose-4B-L-tirozin-m-anisidin) için 0.025 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.5 M NaCl, 50 mM m-anisidin içeren pH:4.0 elüsyon tamponu kullanılarak BTH enzimi saflaştırılmıştır (Kaya ve ark., 2014).

### 2.6. BTH aktivitesinin hesaplanması

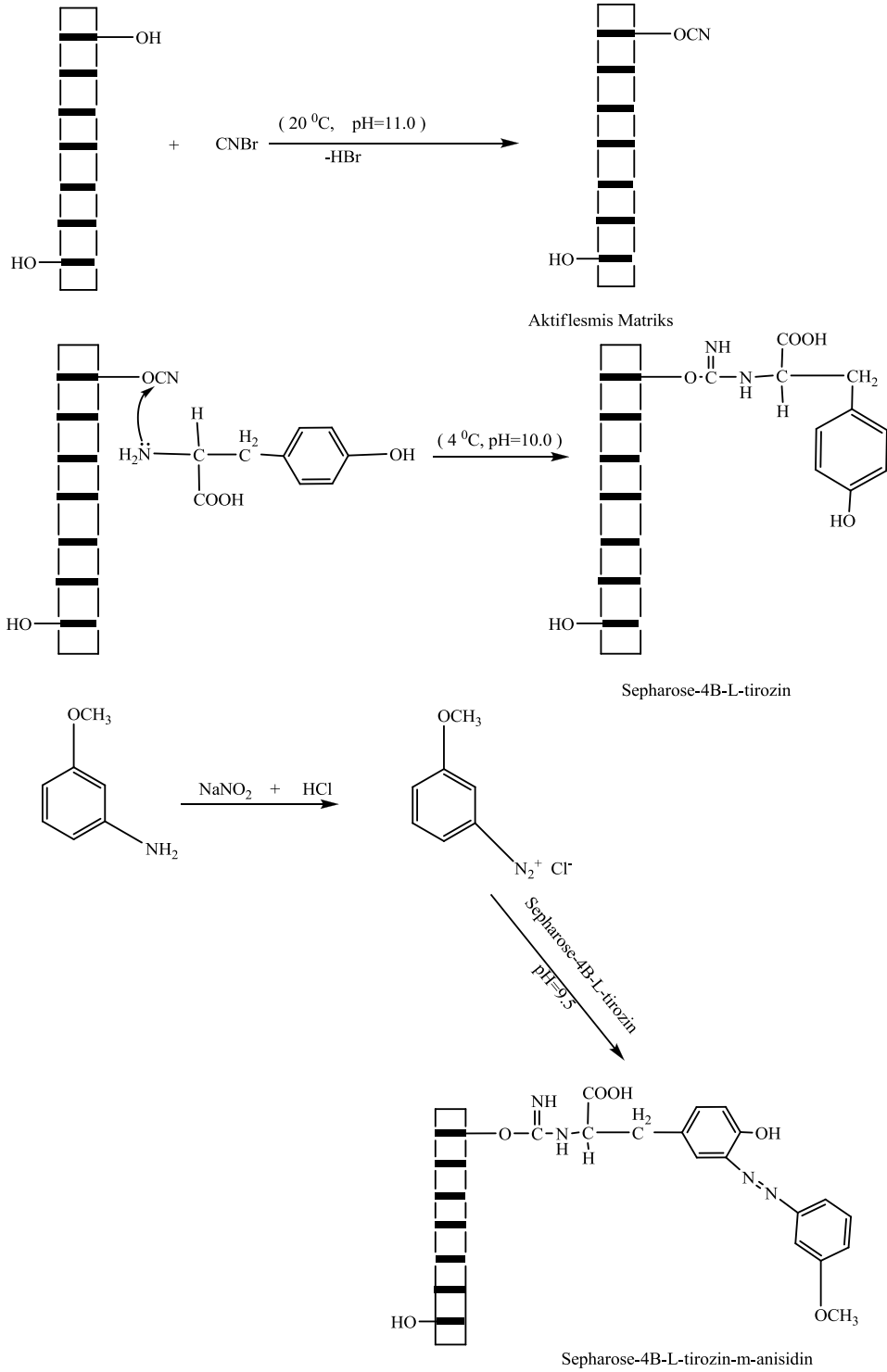
BTH aktivitesi; 232 nm’de, hyalüronik asit substratının 12.3 mM sabit derişimi kullanılarak aşağıda verilen Eşitlik 1’e göre hesaplanmıştır (Hoechstetter, 2005).

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

Eşitlikte; v, enzim aktivitesini; ΔA, absorbanstaki artışı; Δt, birim zamanı; ε<sub>232</sub>= 4550 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; l, ışın yolunu (1 cm) ifade etmektedir.

### 2.7. İnhibisyona sebep olan seçilmiş kimyasalların IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi

Yem ve gübre sanayinde sıklıkla kullanılan farklı kimyasalların IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12.3 mM sabit derişiminde çalışılmıştır. İlk olarak, seçilen kimyasalların olmadığı ortamda enzim aktivitesi



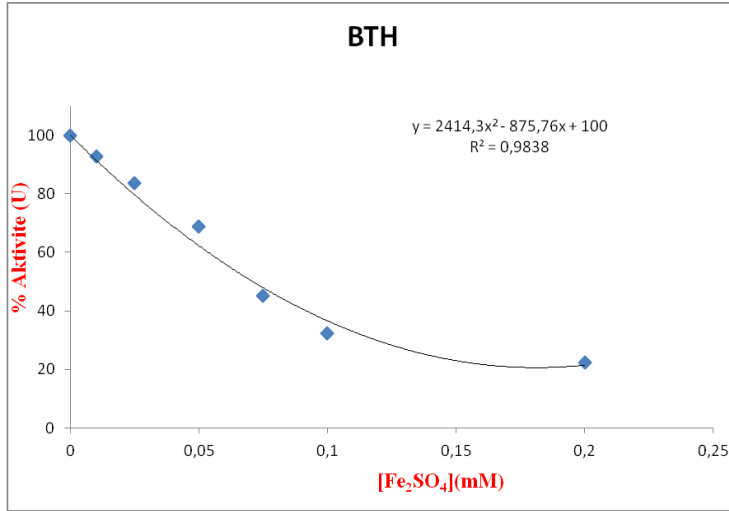
Şekil 3. m-anisidin bileşiğinin bağlanması

bulunmuştur. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kullanılmıştır. Seçilmiş olan kimyasalların değişik derişimlerine karşılık gelen absorbanlar 232 nm’de köre karşı okunmuş ve elde edilen absorban değerlerinden % enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. % Enzim aktivitesi-[İnhibitör] grafiklerinden yararlanarak her bir seçilen

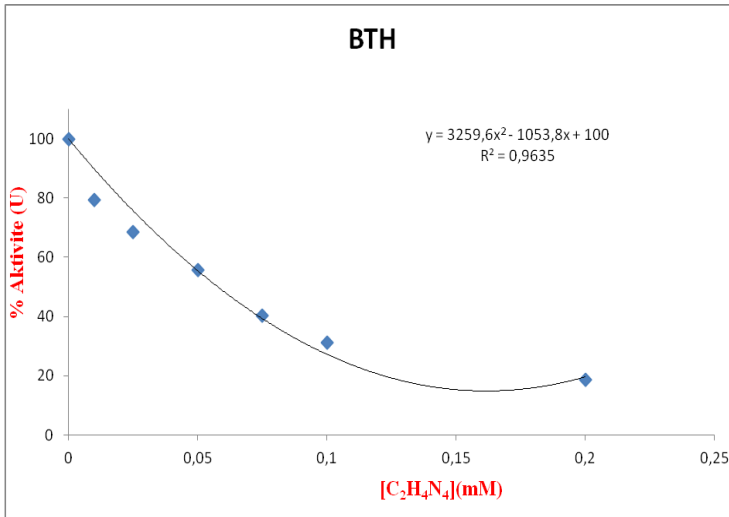
kimyasal için IC<sub>50</sub> değerleri regresyon analizi ile tespit edilmiştir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

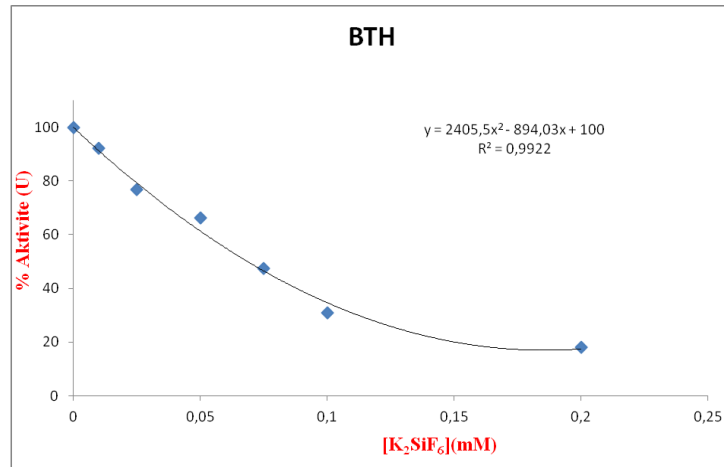
Çalışmada inhibitör olarak incelenen kimyasallara ait elde edilen regresyon eğrileri Şekil 4-10’da verilmiştir.



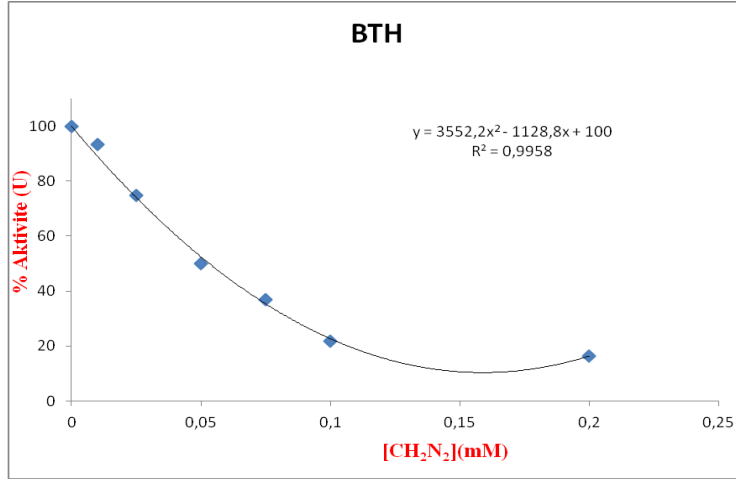
Şekil 4. BTH enzimi üzerine % aktivite-[Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] grafiği



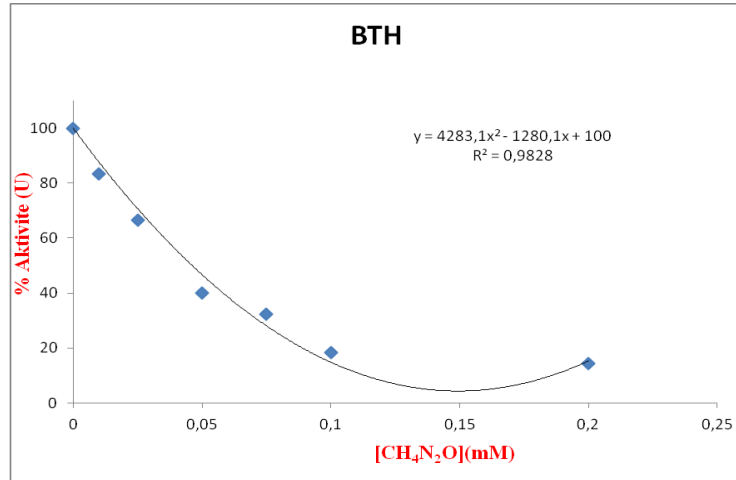
Şekil 5. BTH enzimi üzerine % aktivite-[ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>] grafiği



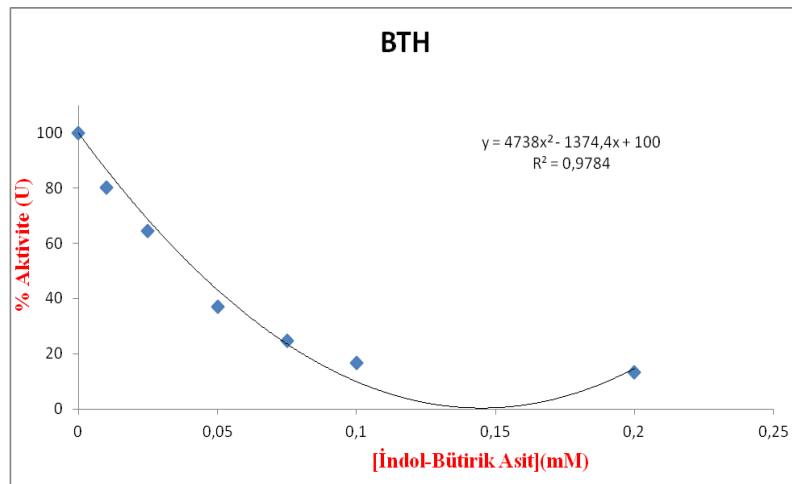
Şekil 6. BTH enzimi üzerine % aktivite-[ K<sub>2</sub>SiF<sub>6</sub>] grafiği



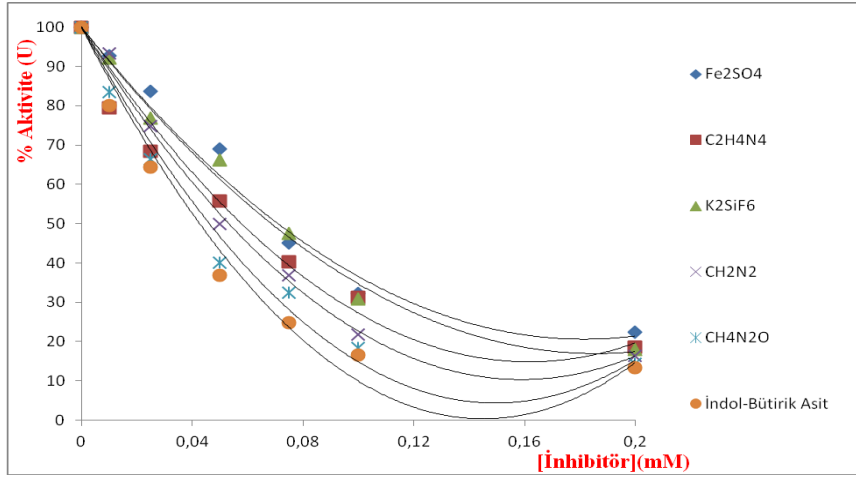
Şekil 7. BTH enzimi üzerine % aktivite-[CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>] grafiği



Şekil 8. BTH enzimi üzerine % aktivite-[CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O] grafiği



Şekil 9. BTH enzimi üzerine % aktivite-[İndol-bütirik asit] grafiği



Şekil 10. BTH enzimi üzerine  $Fe_2SO_4$ ,  $C_2H_4N_4$ ,  $K_2SiF_6$ ,  $CH_2N_2$ ,  $CH_4N_2O$  ve İndol-Bütirik Asitin % aktivite-[İnhibitör] grafiği

Regresyon eğrilerinden yararlanılarak belirlenen  $IC_{50}$  değerleri ise Çizelge 1'de sunulmuştur. Buna göre  $4.265 \times 10^{-2}$  mM  $IC_{50}$  değeriyle indol-bütirik asit (IBA) en güçlü inhibitör ve  $7.097 \times 10^{-2}$  mM  $IC_{50}$  değeriyle de  $Fe_2SO_4$  en zayıf inhibitör etkisi gösteren yapı olduğu tespit edilmiştir. Diğer bileşiklerin  $C_2H_4N_4$ ,  $K_2SiF_6$ ,  $CH_2N_2$  ve  $CH_4N_2O$ 'nun da çalışılan derişimlerde BTH'ı belirli ölçüde inhibe ettikleri gözlemlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan seçilmiş kimyasallar ve  $IC_{50}$  değerleri

| Bileşiğin İsmi     | $IC_{50}$ ( $\times 10^{-2}$ mM) |
|--------------------|----------------------------------|
| $Fe_2SO_4$         | 7.097                            |
| $C_2H_4N_4$        | 5.775                            |
| $K_2SiF_6$         | 6.854                            |
| $CH_2N_2$          | 5.317                            |
| $CH_4N_2O$         | 4.617                            |
| İndol-Bütirik Asit | 4.265                            |

BTH enziminin daha ekonomik ve hızlı bir şekilde saflaştırılması gereklidir. Çünkü enzimin geniş substrat spesifikliğine sahip olması, preparatif organik kimya açısından önemlidir. BTH enzimine, son yıllarda birçok klinik çalışmalarda oldukça yoğun bir ilgi duyulduğu bilinmektedir. Ayrıca BTH'nin, kanser çalışmalarında, endüstriyel alanda ve bu çalışmanın en önemli hedeflerinden olan suni tohumlamada öneminin de olması daha pratik saflaştırma metodlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır (Laemmli, 1970). Bu nedenle, saflaştırma tekniği olarak uygulaması oldukça kolay olan amonyum sülfat çöktürme işlemi ve önceki çalışmamızda grubumuz tarafından sentezlenen afinite jeli (Sephrose-4B-L-tirozin-m-anisidin) kullanılarak BTH enzimi saflaştırılmıştır (Kaya ve ark., 2014).

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.

Araştırmada, enzim kaynağı olarak kullanılan testis örnekleri sığırlardan temin edilmiştir. Söz konusu enzimin suni tohumlamada son derece etkili olduğu (Alexander, 1977; Grenier ve ark., 1993; Jin ve ark., 2011; Tong ve ark., 2012) bilindiğinden ve sığırların beslenmesinde en önemli kaba yem kaynaklarından olan yem bitkileri tarımında uygulanan gübreleme işlemi göz önünde bulundurularak, yem ve gübre sanayinde sıklıkla kullanılan kimyasalların bu çalışmada son derece önemli unsurlar olduğu düşünülmüştür.

Literatürde BTH enzimi aynı kaynaktan farklı yöntemlerle saflaştırmış ve enzimin inhibisyon mekanizmasına ışık tutmak amacıyla değişik yapıların inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada ise sığır testisinden saflaştırılan BTH enzimi üzerine  $Fe_2SO_4$ ,  $C_2H_4N_4$ ,  $K_2SiF_6$ ,  $CH_2N_2$ ,  $CH_4N_2O$  ve İndol-Bütirik Asitin *in vitro* etkileri incelenmiştir. Ayrıca BTH'nin fizyolojik fonksiyonlara sahip önemli bir enzim olduğu da düşünülürse söz konusu seçilmiş kimyasal yapıların enzim üzerinde nasıl etkili olduğunun saptanmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. Literatürde rapor edilmiş çeşitli çalışmalarda (Guthrie, 1969; Tanyıldızı ve Bozkurt, 2003; Kaya ve ark., 2014) semenlerden elde edilen hyaluronidazların motilite (hareketliliği) ve bakteriyolojik ataklara karşı etkisinin araştırılmasına dair bilgilere ulaşılmasına rağmen BTH enzimi üzerindeki etkilerin hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamış olması çalışmanın önemini ve orjinallliğini daha da arttırmaktadır. Bu inhibitörlerin, saf enzim üzerinde çalışılması, sonuçların güvenilirliği açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Çünkü saf olmayan herhangi bir biyolojik sıvıda uygulanan bileşiklerin, istenilen enzimle etkileşmesi diğer non-spesifik proteinler tarafından engellenebilir.

Sonuç olarak; saflaştırılan BTH enzimi üzerine  $Fe_2SO_4$ ,  $C_2H_4N_4$ ,  $K_2SiF_6$ ,  $CH_2N_2$ ,  $CH_4N_2O$  ve İndol-Bütirik Asitin inhibisyon etkileri belirlenmiş ve  $IC_{50}$

değeri  $4.265 \times 10^{-2}$  mM ile indol-bütirik asit (IBA) en güçlü inhibisyon etkisi gösteren yapı olduğu tespit edilmiştir.

## Teşekkür

Bu çalışma, Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (2015-SİÜVET-03) desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Alexander, N.J., 1977. Surface structure of spermatozoa frozen for artificial insemination. *Andrologia*, 9(2): 155-161.
- Baumgartner, G., Moritz, A., 1988. *Hyaluronidase*. Springer-Verlag Wien New York, 1-8.
- Boling, S.D., Edwards, H.M., Emmert, J.L., Biehl, R.R., Baker, D.H., 1998. Bioavailability of Iron in Cottonseed Meal, Ferric Sulfate, and Two Ferrous Sulfate By-Products of the Galvanizing Industry. *Poultry Science*, 77: 1388-1392.
- Botzki, A., Rigden, D.J., Braun S., Nukui, M., Salmen, S., Hoehstetter, J., Bernhardt, G., Dove, S., Jedrzejak, M.J., Buschauer, A., 2004. L-Ascorbic Acid 6-Hexadecanoate, a Potent Hyaluronidase Inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(44): 45990-45997.
- Cherr, G.N., Yudin, A.I., Overstreet, J.W., 2001. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol*, 20(8): 515-25.
- Csoka, T.B., Frost, G.I., Stern, R., 1997. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion & Metastasis*, 17(6): 297-311.
- Dai, Y., Di, H.J., Cameron, K.C., He, J.Z., 2013. Effects of nitrogen application rate and a nitrification inhibitor dicyandiamide on methanotroph abundance and methane uptake in a grazed pasture soil. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(12): 8680-8689.
- Fallis, A., 2013. Structural and functional studies on group A streptococcal bacteriophage hyaluronidase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9): 1689-1699.
- Frost, G.I., Csóka, T., Stern, R. 1996. The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 8(44): 419-434.
- Gladys, L., Hobby, P.H.D., Martin H., Dawson M.D., Karl Meyer, M.D., Eleanor, C., 1940. The relationship between spreading factor and Hyaluronidase, 9: 109-123.
- 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): 1-8.
- Guthrie, R.D., 1969. *Macromolecules*. Carbohydrate Chemistry, 2: 215-216.
- Hertel, W., Peschel, G., Ozegowski, J.H., Müller, P.J., 2006. Inhibitory Effects of Triterpenes and Flavonoids on the Enzymatic Activity of Hyaluronic Acid-Splitting Enzymes. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 339: 313-318.
- Hoehstetter, J., 2005. Characterisation of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae*. *Tez*, 1-239.
- Jackson, J., New, R., Fellow, S., 1927. Metabolism of Tryptophane. *The Journal Of Biological Chemistry*, 84: 1-21.
- 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.
- Kaya, M.O., 2013. Yeni bir metodla hyaluronidaz enziminin saflaştırılması ve bazı bileşiklerin bu enzim üzerine etkilerinin araştırılması. *Tez*; 1-123.
- Kaya, M.O., Arslan, O., Güler, O.O. 2014. 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*, 6366: 1-4.
- Kazemi-Bonchenari, M., Salem, A.Z.M., Ghasemi, E., 2016. Effect of urea supplementation in diet based on barley grain or corn silage on performance, digestion, rumen fermentation and microbial protein synthesis in Holstein bull calves. *Indian Journal of Animal Sciences*, 86(3): 313-317.
- Kleigrewe, K., Niehaus, E.M., Wiemann, P., Tudzynski, B., Humpf, H.U., 2012. New approach via gene knockout and single-step chemical reaction for the synthesis of isotopically labeled fusarin c as an internal standard for the analysis of this fusarium mycotoxin in food and feed samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(34): 8350-8355.
- Kreil, G., 1995. Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(9): 1666-1669.
- Laemmlis, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Luo, J., Ledgard, S., Wise, B., Welten, B., Lindsey, S., Judge, A., Sprosen, M., 2015. Effect of dicyandiamide (DCD) delivery method, application rate, and season on pasture urine patch nitrous oxide emissions. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4): 453-464.
- Mahmood, T., Ali, R., Latif, Z., Ishaque, W., 2011. Dicyandiamide increases the fertilizer N loss from an alkaline calcareous soil treated with 15N-labelled urea under warm climate and under different crops. *Biology and Fertility of Soils*, 47(6): 619-631.
- Meyer, M.F., Kreil, G., Aschauer, H., 1997. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Letters*, 413(2): 385-388.
- Pant, B., Kohda, H., Namera, A., 1996. Clonal propagation of *Cnidium officinale* by shoot tip culture. *Planta Medica*, 62(3): 281-283.
- Rushing, L.G., Hansen, E.B.J., Thompson, H.C.J., 1985. Analysis of D-penicillamine by gas chromatography utilizing nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography*, 337(1): 37-46.
- Saadullah, M., Haque, M., Dolberg, F., 1981. Effectiveness of Ammonification through Urea in Improving the Feeding Value of Rice Straw in Ruminants. *Trop. Anim. Prod.* 6(1978): 30-36.
- Sluis, J.J., 1987. Investigations Into The Outer Surface of pathogenic *trypsonema pallidum*. *Rotterdam Üniversitesi. Tez*. 1-140.
- 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.
- Tanyildizi, S., Bozkurt, T., 2003. The effects of lincomycin-spectinomycin and sulfamethoxazole-trimethoprim on hyaluronidase activities and sperm characteristics of rams. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science*, 65(7): 775-780.
- 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, H., Li, R., Fan, C., Feng, J., Jiang, S., Han, Z., 2015. Removal of fluoride from the acid digestion liquor in production process of nitrophosphate fertilizer. *Journal of Fluorine Chemistry*, 180: 122-129.