

β -Sinir Büyüme Faktörü'nün Reprodüktif Etkileri

Beste Çil, Ergun Akçay

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

Geliş Tarihi / Received: 05.01.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 28.09.2018

Özet: Sinir büyüme faktörü (NGF), yaklaşık 13 kDa moleküler ağırlığa sahip bir protein olup nörotrofin ailesinin ilk tanımlanan üyesidir. NGF temel olarak kök hücre, nötrofil, lenfosit ve monositlerin hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını etkilemektedir. Ayrıca dişi ve erkek reprodüktif dokularında ve çeşitli nöral olmayan hücrelerde de bulunmaktadır. β -NGF provoke ovulatór türlerde ovulasyonu indüklemekte, aynı zamanda koyun, tavşan, sığır, at, domuz, keçi ve deve gibi türlerde GnRH agonisti olarak görev almaktadır. Reprodüktif etkileri provoke ovulatór türlerin ötesine uzanmakta, sadece dişi reprodüksiyonu ile sınırlandırılmamakta, erkek üreme sistemi açısından da önemli görevlerde yer almaktadır.

Anahtar Kelimeler: β -sinir büyüme faktörü, nörotrofin, seminal plazma, ovulasyon, korpus luteum

Reproductive Effects of β -Nerve Growth Factor

Abstract: Nerve growth factor (NGF), is the first described member of the neurotrophin family and this protein has an approximately 13 kDa molecular weight. Primarily, NGF affects the survival, differentiation and growth of several cells such as stem cell, neutrophil, lymphocyte and monocyte. In addition to that, it can be located in female and male reproductive tissues and various non-neural cells. β -NGF induces the ovulation in induced ovulatory species, besides it functions as a GnRH agonist in sheep, rabbit, cattle, horse, pig, goat, camelids. Its reproductive effects reach beyond the induced ovulation species and cannot be limited solely to female reproduction, it also plays major roles in the male reproductive system.

Keywords: β -nerve growth factor, neurotrophin, seminal plasma, ovulation, corpus luteum

Giriş

Günümüzden yaklaşık 30 yıl öncesine kadar, provoke ovulasyon gerçekleştiren türlerin çiftleşme sırasında oluşan mekanik uyarımdansa spermadaki bazı faktörlerin ovulasyonu gerçekleştirdiği görüşü öne sürülmüş ve devamındaki çalışmalarda dişi develere seminal plazmanın intravaginal [11,63], intramusküler ve intrauterin [42] uygulamaları yapılarak ovulasyonlar takip edilmiştir. Bu çalışmalardan yaklaşık 20 yıl sonra, lama ve alpakalarda "ovulasyonu indükleyen faktör (OIF)" varlığı bir seri araştırma ile ortaya konulmuştur [2]. Sadece provoke ovulatór türlerle sınırlı kalmayarak, spontan ovulasyon gerçekleştiren türlerin seminal plazmasında da OIF'ün bol miktarda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır [23,43]. Yapılan çalışmalarda, prepubertal farelerde ovulasyonu indüklediği, ineklerde ovaryan folikül dalgasını değiştirdiği, rat, fare, kobay, tavşan, lama ve ineklerin primer hipofiz bezi hücre kültürlerinde in vitro LH salınımını sağladığı ortaya konulmuştur [1].

Isıya dirençli, proteinaz K ile enzimatik olarak sindirilebilen OIF, yaklaşık 13 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir ve β -NGF (β - Sinir Büyüme Faktörü) proteini ile homolog olduğu ispatlanmıştır. Sinir büyüme faktörü (NGF), bir dimer olup nörotrofin ailesinin ilk tanımlanan üyesidir. NGF, periferel ve merkezi sinir sistemi hücrelerinin hayatta kalmasını ve işlevini düzenleyen nörotrofik bir sitokindir [6]. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4 (NT-4)'ü de içeren, nörotrofin ailesine aittir. Bütün bu nörotrofinler homodimerler olarak bulunmaktadır ve moleküler ağırlıkları 26-27 kDa arasında değişmektedir [29]. Beyin dokusunda eksprese edilen NGF'ün periferel dokularda da yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir [28].

NGF'ün sinir sistemi dışında da pek çok biyolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Spesifik reseptörü, tipik bir tirozin kinaz reseptörü olan, tropomiyozin kinaz reseptör A (TrkA)'dır. TrkA reseptörü aracılığı ile bağışıklık yanıtlarına aracılık ederek yangısal reaksiyonlarda yer aldığı bil-

dirilmiştir. NGF'ün, hematopoetik kök hücrelerin, nötrofillerin, lenfositlerin ve monositlerin hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını etkilediği rapor edilmiştir [28]. Aslen fare sarkomunda, kobrazehrinde ve erişkin farelerin submandibular tükürük bezlerinde keşfedilen NGF, duyuşal ve sempatik nöronların ve adrenal medulla hücrelerinin canlılık ve gelişimini desteklemektedir. Ancak devamında yapılan çalışmalarda, dişi ve erkek reprodüktif organlarının dokuları gibi çeşitli nöral olmayan hücrelerde de bulunmuştur [44].

Araştırmacılar başlangıçta kemirgenlerin ovaryumunda nörotrofinlerin görevinin ovaryum uyarılması ile sınırlı olduğunu düşünse de, son yıllarda nörotrofin ve reseptörlerinin ovaryum fonksiyonları ve ovulasyon [37], steroid sekresyonu [62] ve foliküler gelişim [30] üzerinde de etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. NGF'ün ovaryum fonksiyonlarının kontrolünde görev aldığı kanısı, ratlarda NGF ve reseptörü Trk A'nın folikül içerisinde saptanması ile desteklenmektedir [17]. NGF proteinine karşı immunize edilen ratlarda foliküler gelişim engellenmekte, sempatik inervasyon ortadan kalkmakta, androjen ve östradiol üretimi düşmekte, pubertaya ulaşım gecikmekte ve östrus siklusu düzeni bozulmaktadır [30]. NGF ile inkübe edilen insan ovaryum hücrelerinin de FSH reseptörü mRNA seviyelerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerde progesteron sekresyonunda düşüş gözlenmekte bu etki ile de prematür luteinizasyonun engellendiği düşünülmektedir [49].

Elde edilen sonuçlar dikkate alındığında NGF'ün steroidogenezis üzerindeki etkisinde çeşitli çelişkiler bulunmaktadır. Bazı gruplar LH'nın TrkA reseptörünü indüklediğini ve NGF ile Progesteron ve PGE sentezinin desteklendiğini savunurken bazıları ise TrkA ve NGF'ün östradiol üretimini stimüle ettiğini, prematür luteinizasyonu engellediğini ve Progesteron üretimini düşürdüğünü savunmaktadır. Bu çelişkinin önemli bir nedeni olarak, yapılan son çalışmanın preovulatör LH piki ile ilişkilendirilmemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [59]. LH'nın NGF/TrkA stimülasyonu sağladığı açık olsa da bu etkisinin gerçekleşmesini sağlayan değişik yol, mekanizmalar ve zamanlamaların daha detaylı olarak çalışılması gerekmektedir.

NGF sentezi sıçan ve koyunlarda antral foliküllerin teka hücrelerinde tespit edilmiştir [17,36].

Ancak insan, domuz, keçi ve sığırlarda hem granuloza hem de teka hücrelerinde üretilmektedir [18,24,45,52].

Bu proteinin alpaka ve lama seminal plazmasındaki dominant protein olduğu gerçekleştirilen Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi analizi ile ortaya konulmuştur. Boğa, koç ve aygır spermasında ise daha düşük miktarlarda varlığı saptanmıştır [21].

Dişi Memelilerde Reprodüktif Etkileri

β -NGF'ün provoke ovulatör türlerde ovulasyonu indüklediği, aynı zamanda koyun, tavşan, sığır, at, domuz, keçi ve deve gibi birçok türde GNRH agonisti kadar başarılı olduğu bildirilmektedir [20]. Lamalara GnRH antagonisti uygulaması sonucu OIF'ün etkisini göstermediği (LH salınımı ve ovulasyonun engellenmesi), bu proteinin hipotalamustaki GnRH nöronları üzerine direkt veya indirekt bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır [55]. İn vitro yapılan çalışmaların sonucunda ise OIF'ün hipofiz bezi gonadotropinleri üzerinde de direkt etkisi olduğu saptanmıştır. Lama ve ineklerin ön hipofiz lobu primer hücre kültürleri 2 saat boyunca OIF içeren medyumlarla inkübasyona bırakılmış ve devamında LH seviyesi ölçülmüştür. Lamalarda doza bağımlı artan LH konsantrasyonu ölçülürken ineklerde bu etki doz ile değişim göstermemiştir [8].

Lamalarda ortalama ejakülat miktarı 2 ml kabul edildiğinde, içerdiği OIF miktarı yaklaşık olarak 3-6 mg olarak bildirilmiştir [43]. Bundan yola çıkılarak, yapılan çalışmada, ejakülatla doğal olarak bulunan miktarın 1/25'i ile 1/250'si arasında değişen dozlar değerlendirilmiştir. Dozla ilişki olarak β -NGF'ün alpakalarda ovulasyon üzerine etkisi Stuart ve ark. [57] tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda OIF/ β -NGF'ün ejakülatdaki fizyolojik dozunun en az 1/100 oranındaki miktarı intramusküler yolla uygulandığında lama ve alpakalarda ovulasyonu sağlamaktadır. İntrauterin doz (5 ml seminal plazma veya 20 mg OIF) arttırıldığında ise, düşük doz i.m. veya i.v. uygulaması ile benzer şekilde dolaşımdaki LH konsantrasyonu artmış ve %100 ovulasyon oranı yakalanabilmiştir [54].

Seminal plazma enjeksiyonu yapılan dişi lamalarda oluşan korpus luteum (KL), GnRH ile indüklenen ovulasyon sonrası oluşan KL'a göre daha

büyük olmakla beraber, daha geç regrese olmakta ve iki kat fazla progesteron üretmektedir. Ayrıca seminal plazma gruplarında, uygulama sonrası LH konsantrasyonlarının 8 saat boyunca uygulama öncesi seviyesinin üstünde kaldığı, GnRH grubunda ise LH konsantrasyonlarının 5.5 saat sonra bazal seviyeye indiği bildirilmektedir [2]. Görülen bu luteotrofik etkinin kaynağının seminal plazmanın neden olduğu daha uzun süreli LH salınımı olduğu düşünülmektedir. Ancak alpakalarda rekombinant insan NGF ile gerçekleştirilen çalışmalarda bu luteotrofik etki görülememektedir [57]. Primatlarda ve laboratuvar hayvanlarında da LH sekresyonu ve luteogenezis arasında benzer bir ilişki gözlemlenmiştir [10].

Tavşanlarda ve sıçanlarda ise ovulasyon öncesi periyotta gonadotropinlerin konsantrasyon ve süre değişimlerinin oosit maturasyonu, granüloza hücre luteinizasyonu ve KL formasyonunda değişime neden olabileceği belirtilmektedir. Hem devegillerin hem de boğaların seminal plazması, plazma LH konsantrasyonlarında ölçülebilen bir artış belirlememesine rağmen, spontan ovulatör bir tür olan sığırlarda luteotrofik etki göstermiştir [3].

Sığırlarda OIF'ün luteotrofik etkisinin hipotalamus veya hipofizdeki TrkA reseptörleri ile etkileşimi sonucu gonadotropin salınımı yerine, direkt olarak ovaryum seviyesinde, dominant folikül üzerindeki granüloza ve teka hücrelerinin sahip olduğu TrkA reseptörlerinin artan ekspresyonu ve bu reseptörler ile OIF'ün etkileşimi aracılığı ile sağlandığı Carrasco ve ark. [9] tarafından belirtilmiştir. Buna ek olarak OIF'ün orta-luteal dönemdeki sığır KL in vitro hücre kültüründen progesteron salınımını stimüle ettiği bildirilmektedir.

Sonuç olarak OIF'ün neden olduğu bu luteotrofik etkinin hem LH salınımı genliği (merkezi mekanizma) hem de ovaryum foliküllerindeki spesifik reseptörlerin ekspresyonundaki geçici değişimler (lokal mekanizma) ile ilişkilendirilmesi, birden fazla etki mekanizmasının olduğunu göstermektedir.

İnek ve domuzlarda çiftleşme aktivitesinin artan LH salınımı ve daha yüksek ovulasyon oranları ile ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur [3]. Domuzlarda seminal plazma uygulaması ile in vivo KL çapı ve progesteron sekresyonu artmış, in vitro ise preovulatör foliküllerin granüloza ve teka hü-

relerinin LH duyarlılığı ve progesteron sekresyonu artmıştır [41].

Sinir büyüme faktörünün boğa seminal plazmasındaki miktarı yaklaşık 0.7 mg/ml olarak belirtilmiş ve bu türde, insan, koç, teke ve domuz seminal plazmasından çok daha yüksek miktarda bulunduğu bildirilmektedir [22]. Boğa seminal plazmasının içerdiği OIF miktarı (0.10 ± 0.03 mg/mL) lama seminal plazmasındaki oranın (1.2 ± 0.21 mg/mL) %10-20'sinde kalmaktadır [7]. Dişi lamalara, lama seminal plazmasındaki OIF miktarına (250µg) yakın bir miktarda boğa seminal plazması uygulaması sonucunda lama seminal plazmasıyla elde edilen ovulasyon oranlarına benzer oranlar yakalanabilmiştir [60].

Prepubertal düveler kullanılarak lama seminal plazmasından saflaştırılan OIF kullanılmış ve farelerde görülenin aksine ovulasyon tetiklenmemiştir. Ancak mevcut uygulama sonrası dolaşımdaki FSH konsantrasyonunu arttırarak yeni bir foliküler dalga oluşumunu hızlandırmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, OIF'ün dominant folikül üzerine baskılayıcı bir etki ile foliküler dalga dinamiklerinin kontrolünde rol aldığı düşünülmektedir [58].

Saflaştırılan NGF ile cinsel olgunluğa ulaşmış düvelerde de ovulasyon indüklenememiş ancak LH uygulamasından 12 saat sonra i.m enjeksiyonu yapılan boğa seminal plazması ile kayda değer oranda daha senkronize ovulasyonlar (LH uygulamasını takiben 30-34 saat arası) ve buna ek olarak ovulasyondan 4 saat sonra yapılan boğa seminal plazma enjeksiyonları ile luteotrofik (artan plazma progesteron) bir etki gözlemlenmiştir. Ayrıca lama seminal plazmasından saflaştırılan OIF, düvelerde faza bağlı bir şekilde dominant folikül gelişimini etkilemekte ve luteotrofik etki göstermektedir [58,60].

Koyunlarda ise, alpaka seminal plazması enjeksiyonunu takiben 4 saat içerisinde hipofizden salgılanan LH konsantrasyonları artışı ile spontan ovulatör türlerde de bu proteinin reprodüktif hormonal regülasyon üzerinde etki gösterdiği ortaya konulmuştur [20].

Embriyo gelişimi üzerindeki etkisi ise, koyunlarda Crispo ve ark. [13] tarafından gerçekleştirilen çalışma ile rapor edilmiştir. Bu amaçla, in vitro oosit maturasyonu ve in vitro fertilizasyon aşamasında medyuma eklenen NGF ile bölünme oranı kayda

değer olarak artmış, fertilizasyon aşamasında eklendiğinde ayrıca embriyo gelişimini desteklemiştir.

Erkek Memelilerde Reprodüktif Etkileri

Erkek açısından bakılacak olduğunda, çeşitli dokularda farklı hücre tipleri tarafından salgılanan NGF'ün parakrin ve/veya otokrin bir yol ile spermatogenezis ve diğer testiküler fonksiyonların regülasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Erkek reprodüktif sistem organları ve sperm hücrelerinde yüksek affiniteli (TrkA) ve düşük affiniteli (p75) NGF reseptörleri varlığı ise, bu proteinin sperm fonksiyonu üzerinde etkisi olduğunu bildirmektedir [25,32,33,45].

Japon maymunlarında seminal vezikül, epididimis ve testiste, Leydig ve Sertoli hücreleri ile çeşitli aşamalarda sperm hücrelerinde NGF, TrkA ve p75 reseptörleri pozitif boyanmıştır [25]. Fare ve sıçan testisinde ise, primer spermatositlerden olgun spermatidlere kadar tüm aşamalarda pozitif NGF immunoreaksiyonlarına rastlanmıştır [5].

İmmunofloresans tekniği ile boğa spermasında NGF immunoreaktivitesi spermatozoanın baş ve kuyruk kısmında, reseptörü TrkA ise akrozomal kap, nükleüs ve kuyruk bölgesinde saptanmıştır [32]. Gebelik oranı yüksek olan (SCR) erkeklerin spermatozoonlarında NGF mRNA daha yüksek miktarda bulunmuştur. İmmunositokimyasal yöntem ile NGF'in baş orta ve kuyruk kısmında saptanması, özellikle de akrozom ve kuyruk bölgesinde yüksek miktarda ekspresyonu SCR skoru yüksek olan boğaların motilitesini ve viabilitesini koruyabilme, zamanında kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gösterebilme ve bu şekilde fertilizasyon oranlarını arttırabilme yeteneğine sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgulardan ola çıkılarak fertilite ile NGF arasında bir ilişki olduğu öne sürülmektedir [26].

Sıçan ve farelerde gerçekleştirilen çalışmalarla çeşitli nörotrofinlerin, embriyonik testis gelişiminin farklılaşma sürecinde [12,14,15,16,31,46] ve spermatogenezis regülasyonunda lokal aktivite gösterdiği [35,50,51,56,61] ortaya konulmuştur. Aynı zamanda Leydig hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve testosteron üretiminde önemli rol oynamaktadır [64]. Buna ek olarak Sertoli hücrelerinden gelişim aşamasına bağlı olarak androjen bağlayıcı protein sekresyonunu düzenlemektedir [19]. Müller

ve ark. [38] tarafından ise, NGF proteinin Leydig hücreleri tarafından steroid üretimini arttırdığı ortaya konulmuştur.

Golden hamsterlarda spermanın NGF ile inkübasyonu sonucunda motilite (VCL, VSL, ALH) ve akrozom reaksiyonunu stimüle ettiği ve bu etkinin süre ve doz bağımlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir [26].

Boğa sperması eksojen NGF ile inkübe edildiğinde hem leptin sekresyonunun hem de sperm canlılığı artmış, buna ek olarak geç apoptotik ve ölü spermatozoa sayısı da artış göstermiştir [32]. NGF ve nörotrofinler her ne kadar esas olarak proliferasyonu desteklemesi, hedef hücrelerin maturasyonu ve hayatta kalmasını sağlasa da, çeşitli çalışmalarda NGF'ün kültür koşulları veya hücre tipinin yapısına göre trofik etkisinden değil, sitotoksik bir etki ile apoptozisi indüklediği bildirilmektedir [4,39,40].

İnsan spermasının çeşitli dozlarda ve sürelerde NGF ile inkübasyonu sonucu doza bağımlı bir şekilde motilite ve kinetik hız parametreleri incelendiğinde, ortalama VAP (Ortalama yol hızı, $\mu\text{m/s}$), VSL (Doğrusal hız $\mu\text{m/s}$), VCL (Eğrisel hız $\mu\text{m/s}$), BCF (Çapraz geçiş frekans ritmi, Hz) ve LIN (Eğrisel yolakların doğrusallığı) değerleri önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir [34,53]. Buna paralel olarak, kriyoprezervasyon medyumuna eklenen 0.5ng/ml NGF ile, astenozoospermik örneklerin çözüm viabilite ve motilite değerleri önemli ölçüde artmış, DNA fragmentasyonunu düşmüş, ancak hücre içi nitrik oksit konsantrasyonunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, normozospermik spermada daha etkili bir biçimde gözlemlenmiş ve ek olarak nitrik oksit konsantrasyonunu azaltmıştır [47,48].

Sonuç

Tüm bu gözlemler sonucunda NGF'ün hayvanlarda üreme ile ilgili önemli rol oynadığına dair artan kanıtlar sağlanmıştır. Reprodüktif etkileri provoke ovulator türlerin ötesine uzanmakta, sadece dişi reproduksiyonu ile sınırlandırılmamakta, erkek üreme sistemi açısından da önemli görevlerde yer almaktadır. Seminal plazma kaynaklı bu proteinin daha detaylı araştırılması ve yardımcı üreme teknolojilerine entegrasyonu ile reprodüktif verimin artırılacağı açıkça ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

- Adams GP, Ratto MH (2013): Ovulation-inducing factor in seminal plasma: a review. *Animal Reproduction Science*, 136(3): 148-156.
- Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J (2005): Ovulation inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, 73: 452-457.
- Adams GP, Ratto MH, Silva ME, Carrasco RA (2016): Ovulation-inducing factor (OIF/NGF) in seminal plasma: a review and update. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2): 4-17.
- Ahn JY, Kang L, Kim H, Kang H, Kim S, Kim J, Kim SK, Wang K, Cho BK, Woo K, Lee Roh J, Kim M (2005): Induction method of tyrosine kinase A-mediated cell death in rat pheochromocytoma. *Biotechnol. Lett.*, 27: 583-587.
- Ayer-Lelievre C, Olson L, Ebendal T, Hallböök F, Persson H (1988): Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8): 2628-2632.
- Bischoff SC, Dahinden CA (1992): Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*, 79: 2662-2669.
- Bogle OA (2015): Nerve Growth Factor: Its Role in Male Fertility as an Ovulation Inducer. *Doktora Tezi*, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Kanada.
- Bogle OA, Ratto MH, Adams GP (2012): Ovulation-inducing factor (OIF) induces LH secretion from pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, 133: 117-122.
- Carrasco R, Singh J, Adams GP (2016): The dynamics of trkA expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1): 47.
- Chandrasekher YA, Hutchison JS, Zelinski-Wooten MB, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL (1994): Initiation of periovulatory events in primate follicles using recombinant and native human luteinizing hormone to mimic the midcycle gonadotropin surge. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79: 298-306.
- Chen BX, Yuen ZX, Pan GW (1985): Semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 335-339.
- Compagnolo L, Russo MA, Puglianiello A, Favale A, Siracusa G (2001): Mesenchymal cell precursors of peritubular smooth muscle cells of the mouse testis can be identified by the presence of the p75 neurotrophin receptor. *Biol. Reprod.*, 64: 464-472
- Crispo M, Dos Santos-Neto PC, Vilarino M, Mulet AP, De León A, Barbeito L, Menchaca A (2016): Nerve growth factor influences cleavage rate and embryo development in sheep. *Journal of Animal Science*, 94(10): 4447-4451.
- Cupp AS, Kim GH, Skinner MK (2000): Expression and action of neurotrophin-3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development. *Biol. Reprod.*, 63: 1617-1628.
- Cupp AS, Tessarollo L, Skinner MK (2002): Testis developmental phenotypes in neurotrophin receptor trkA and trkC null mutations: role in formation of seminiferous cords and germ cell survival. *Biol. Reprod.*, 66: 1838-1845.
- Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK (2003): Chemotactic role of neurotrophin 3 in the embryonic testis that facilitates male sex determination. *Biol. Reprod.*, 68: 2033-2037.
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Les Dees CW, Lara HE, Ojeda SR (1996): A role for trka nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*, 137(1): 198-209.
- Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR (2000): Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*, 141(12): 4736-4750.
- Djakiew D, Pflug B, Dionne C, Onoda M (1994): Postnatal Expression of Nerve Growth Factor Receptors in the Rat Testis. *Biol. Reprod.*, 51: 214-21.
- Druart X, Maxwell C, Kershaw-Young C (2015): Use of Beta-Nerve Growth Factor for Inducing Ovulation in Mammals. United States Patent Application Publication. Pub. No: US 2015/0005236 A1
- Druart X, Rickard JP, Mactier S, Kohnke PL, Kershaw-Young CM, Bathgate R, Gibb Z, Crossett B, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Grupen CG, De Graaf SP (2013): Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 91: 13-22.
- Harper GP, Glanville RW, Thoenen H (1982): The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 14: 8541-8548.
- Harper GP, Thoenen H (1980): The distribution of nerve growth factor in the male sex organs of mammals. *Journal of Neurochemistry*, 34: 893-903.
- Jana B, Koszykowska M, Czarzasta J (2011): Expression of nerve growth factor and its receptors, TrkA and p75, in porcine ovaries. *Journal of Reproduction and Development*, 57(4): 468-474.
- Jin W, Arai KY, Shimizu K, Kojima C, Itoh M, Watanabe G, Taya K (2006): Cellular localization of NGF and its receptors trkA and p75LNGFR in male reproductive organs of the Japanese monkey (*Macaca fuscata fuscata*). *Endocrine*, 29: 155-160.
- Jin W, Tanaka A, Watanabe G, Matsuda H, Taya K (2010). Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 56(4): 437-443.
- Kasimanickam V, Kasimanickam R, Arangasamy A, Saberivand A, Stevenson JS, Kastelic JP (2012): Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology*, 78(9): 2007-2019.
- Kazak F, Yarım GF (2014): Nörotrofinler. *Kocatepe Vet. J.*, 7(1): 47-57.
- Kolbeck R, Jungbluth S, Barde YA (1994): Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur. J. Biochem.*, 225: 995-1003.
- Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR (1990): Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*, 126: 364-375.
- Levine E, Cupp AS, Skinner MK (2000): Role of neurotrophins in rat embryonic testis morphogenesis (cord formation). *Biol. Reprod.*, 62: 132-142.
- Li C, Sun Y, Yi K, Ma Y, Zhang W, Zhou X (2010): Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. *Theriogenology*, 74: 1615-1622.
- Li C, Watanabe G, Weng Q, Jin W, Furuta C, Suzuki AK, Kawaguchi M, Taya K (2005): Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of the adult male rats. *Zoological Science*, 22: 933-937.
- Lin K, Ding XF, Shi CG, Zeng D, Quzong S, Liu SH, Wan Y, Luobu G, Fan M, Zhao YQ (2015): Nerve growth factor promotes human sperm motility in vitro by increasing the movement distance and the number of A grade spermatozoa. *Andrologia*, 47: 1041-1046.
- Lönnerberg P, Soder O, Parvinen M, Ritzen EM, Persson H (1992): Beta-nerve growth factor influences the expression of

- androgen binding protein messenger ribonucleic acid in the rat testis. *Biol. Reprod.*, 47: 381–388.
36. Mattioli M, Barboni B, Gioia L, Lucidi P (1999): Nerve growth factor production in sheep antral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, 17(4): 361-371.
 37. Mayerhoffer A, Dissen GA, Parrot JA, Hill DF, Mayerhoffer D, Garfield RE, Costa ME, Skinner MK, Ojeda SR (1996): Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: Trk A receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology*, 137: 5662-5670.
 38. Müller D, Davidoff MS, Bargheer O, Paust HJ, Pusch W, Koeva Y, Jezek D, Holstein AF, Middendorff R (2006): The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis, evidence for functions in Leydig cells. *Histochem. Cell Biol.*, 126: 199–211.
 39. Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM (1997): Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J. Neurosci.*, 17: 530-42.
 40. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM (1993): Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*, 328, 12: 847-854.
 41. O'Leary S, Jasper MJ, Robertson SA, Armstrong DT (2006): Seminal plasma regulates ovarian progesterone production, leukocyte recruitment and follicular cell responses in the pig. *Reproduction*, 132: 147–58.
 42. Pan G, Zhao X, Chen S, Jiang S, Huang Y, ZU, Wang H (1992): The ovulation inducing effect of seminal plasma in the Bactrian camel. In *Proceedings of the first International Camel Conference*. R&W Publications, Newmarket pag.pp. 159-161.
 43. Ratto MH, Delbaere LTJ, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP (2011): Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 24.
 44. Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, Van Straaten KE, Delbaere LTJ, Pierson RA, Adams GP (2012): The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 15042–15047.
 45. Ren L, Medan MS, Weng Q, Jin W, Li C, Watanabe G, Taya K (2005): Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. *The Journal of Reproduction and Development*, 51: 399-404.
 46. Russo MA, Giustizieri ML, Favale A, Fantini MC, Campagnolo M, Konda D, Germano F, Farini D, Manna C, Siracusa G (1999): Spatiotemporal patterns of expression of neurotrophins and neurotrophin receptors in mice suggest functional roles in testicular and epididymal morphogenesis. *Biol. Reprod.*, 61: 1123–1132.
 47. Saeednia S, Bahadoran H, Amidi F, Asadi MH, Najji M, Fallahi P, Nejad NA (2015): Nerve growth factor in human semen: Effect of nerve growth factor on the normozoospermic men during cryopreservation process. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(3): 292.
 48. Saeednia S, Nashtaei MS, Bahadoran H, Aleyasin A, Amidi F (2016): Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1): 29.
 49. Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C (2006): Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of FSH receptors and estrogen secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91: 2396–2403.
 50. Schultz R, Metsis M, Hokfelt T, Parvinen M, Pelto-Huikko M (2001): Expression of neurotrophin receptors in rat testis. Upregulation of TrkA mRNA with hCG treatment. *Mol. Cell Endocrinol.*, 182: 121–127.
 51. Seidl K, Buchberger A, Erck C (1996): Expression of nerve growth factor and neurotrophin receptors in testicular cells suggest novel roles for neurotrophins outside the nervous system. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8: 1075–1087.
 52. Seifer DB, Feng B, Shelden RM (2006): Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin–Trk receptor family in adult human preovulatory ovarian follicles. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(4): 1129-1134.
 53. Shi CG, Ln K, Xu XB, Zhang SC, Wang N, Fan M (2012): Evidence for the involvement of NGF in human sperm motility. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5: 534-541.
 54. Silva ME, Fernández A, Ulloa-Leal C, Adams GP, Ratto MH (2015): LH release and ovulatory response after intramuscular, intravenous, and intrauterine administration of beta-nerve growth factor of seminal plasma origin in female llamas. *Theriogenology*, 84: 1096–1102.
 55. Silva ME, Smulders JP, Guerra M, Valderrama XP, Letelier C, Adams GP, Ratto MH (2011): Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 74.
 56. Stephan JP, Syed V, Jegou B (1997): Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.*, 134: 109–118.
 57. Stuart CC, Vaughan JL, Kershaw-Young CM, Wilkinson J, Bathgate R, De Graaf SP (2015): Effects of varying doses of β -nerve growth factor on the timing of ovulation, plasma progesterone concentration and corpus luteum size in female alpacas (*Vicugna pacos*). *Reproduction, Fertility and Development*, 27: 1181–1186.
 58. Tanco VM, Van Steelandt MD, Ratto MH, Adams GP (2012): Effect of purified llama ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, 78: 1030–1039.
 59. Tribulo P (2012): The Effect of Ovulation-Inducing Factor (OIF) on Bovine Seminal Plasma on Ovarian Function in Cattle. *Doktora Tezi*, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Kanada.
 60. Tribulo P, Bogle O, Mapletoft RJ, Adams GP (2015): Bioactivity of ovulation inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. *Theriogenology*, 83: 1394–1401.
 61. Vidal F, Lopez P, Lopez-Fernandez LA, Ranc F, Scimeca J, Cuzin F, Rassoulzagedan M (2001): Gene trap analysis of germ cell signalling to Sertoli cells: NGF-TrkA mediated induction of Fra1 and Fos by postmeiotic germ cells. *J. Cell Sci.*, 114: 435–443.
 62. Waraksa JA, Lindsay RM, Ip NY, Hurtz RJ (1995): Neurotrophin-3 augments steroid secretion by hamster ovarian follicles in vitro. *Zoolog. Sci.*, 12: 499–502.
 63. Xu YS, Wang HY, Zeng GQ, Jiang GT, Gao HY (1985): Hormone concentrations before and after semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 74: 341–346.
 64. Zhang L, Wang H, Yang Y, Liu H, Zhang Q, Xiang Q, Ge R, Su Z, Huang Y (2013): NGF induces adult stem Leydig cells to proliferate and differentiate during Leydig cell regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(2): 300-305.