

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2023; 42 (2) 65-69

DOI:10.30782/jrv.m.1342716

Kedi (*Felis Catus*) Ovaryumlarında TGF- α 'nın İmmunohistokimyasal Yerleşimi

 Cansel Güzin Özgüden Akkoç

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.

Received 14-08-2022 Accepted 21-12-2023

Özet

Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α), ovaryumlarda ovositlerin olgunlaşmasında, granüloza hücrelerinin proliferasyonunda ve diferansiyasyonunda önemli roller oynayan bir büyüme faktörüdür. Bu çalışma, erişkin kedi ovaryumlarında ilk defa TGF- α 'nın immunohistokimyasal yerleşiminin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmada 10 adet, evcil, erişkin kedi ovaryumu kullanıldı. Dokular %10'luk tamponlanmış nötr formol solüsyonunda tespit edildi ve rutin histolojik prosedür uygulandı. Kesitlere Crossman'ın üçlü boyaması uygulanarak ovaryumların genel histolojik yapısı ve indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks yöntemi uygulanarak TGF- α 'nın immunohistokimyasal yerleşimi incelendi. Ovaryumlarda TGF- α 'ya ait pozitif boyamaların sadece granüloza hücrelerinde, teka interna hücrelerinde, folliküllerin ovositlerinde ve teka lutein hücrelerinde olduğu görüldü. Primordiyal folliküllerin ovositlerinde, büyük antral ve atretik folliküllerin granüloza hücrelerinde şiddetli immun reaksiyon gözlemlendi. Folliküllerin çevresini saran teka interna katmanında ve teka lutein hücrelerinde ise orta şiddetli immun reaksiyon gözlemlendi. Sonuç olarak, TGF- α 'nın erişkin kedi ovaryumlarında parakrin ya da otokrin bir düzenleyici olarak hem follikülogeneziste hem de granüloza hücrelerinin proliferasyonunda ve differansiyasyonunda rol oynayacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İmmunohistokimya, Kedi, Ovaryum, TGF- α .

Abstract

Immunohistochemical Localization of TGF- α in Cat's (*Felis Catus*) Ovary

Transforming growth factor alpha (TGF- α) is a growth factor that plays important roles in the maturation of oocytes, proliferation, and differentiation of granulosa cells in ovaries. This study was performed to determine the immunohistochemical localization of TGF- α in adult cats' ovaries for the first time. Ten domestic breed, adult cats' ovaries were used in this study. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin solution and routine histological procedure was performed. Crossman's triple staining was applied to the sections to examine the histologic structure of the ovaries and immunohistochemical localization of TGF- α was examined using the indirect streptavidin-biotin-peroxidase complex method. Positive staining for TGF- α in ovaries was observed only in granulosa cells, theca interna cells, oocytes, and theca lutein cells. Intense immunoreaction was observed in oocytes of primordial follicles and granulosa cells of large antral and atretic follicles. A moderate immunoreaction was observed in the layer of theca interna surrounding the follicles and in theca lutein cells. In conclusion, it was concluded that TGF- α may play a role in both folliculogenesis and proliferation and, also differentiation of granulosa cells as a paracrine or autocrine regulator in adult cat ovaries.

Key words: Cat, Immunohistochemistry, Ovary, TGF- α .

* Corresponding author: Cansel G. Özgüden Akkoç, Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. Görükle, Bursa, e-mail:cozguuden@uludag.edu.tr, Tel: (0)224-294 12 79

Giriş

Evcil kediler (*Felis Catus*) *Felidae* familyasının 37 türünden biridir. Evcil kedi dışındaki hemen hemen tüm kedi türlerinin nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Günümüzde pet hayvanı olarak yetiştirilen evcil kediler, özellikle nesli tükenmekte olan vahşi kedilerin genetik soy ve biyoçeşitliliğinin sürdürülmesi için yardımcı üreme tekniklerinin geliştirilmesi amacı ile de kullanılmaktadırlar¹. Evcil kediler, ırka, ışık periyoduna ve kilo artışına bağlı olarak genellikle 8-12 aylık olduklarında cinsel olgunluğa (puberte) erişirler. Mevsime bağlı poliöstrus (çoklu östrus) gösteren evcil kedilerin ovaryumu, foliküler gelişimin incelenmesi için de önemli bir modeldir. Çünkü erişkin kedi ovaryumunda bütün folikül evreleri (primordiyal, primer, sekonder, pre-antral ve antral foliküller) sürekli olarak görülebilmektedir². Bununla birlikte insan ve kedi ovositlerinin çapı, çekirdekçik boyutu ve hücre kültüründe ovositin, mayozun metafaz II aşamasına ulaşma süresi gibi benzer özellikler taşınması nedeniyle, infertilite sendromlu kadınlar için de iyi bir model teşkil etmektedir³.

Ovaryumlarda folliküler gelişim ve ovositlerin olgunlaşmasında hormonal mekanizmanın yanı sıra büyüme faktörleri gibi intraovarian faktörlerde etkilidir⁴. Büyüme faktörleri kendileri için spesifik olan hücre membranı reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu ve differensiyasyonunu düzenleyen polipeptitlerdir. Transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α), epidermal büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir ve 50 amino asitten oluşan 5.6-20 kDa moleküler ağırlıklı bir polipeptittir. %30-40 epidermal büyüme faktörüne yapısal benzerlik gösterir^{4,5}. TGF- α , epidermal büyüme faktörü reseptörlerine tirozin kinaz yolu ile bağlanarak aktive olur ve epidermal büyüme faktörüne benzer biyolojik etkiler gösterir⁵. Öyle ki, TGF- α 'nın epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlanmada epidermal büyüme faktörüne oranla 100 kat daha fazla afinite gösterdiği bilinmektedir⁶. TGF- α , çoğu mezodermal ve ektodermal dokularda mitojenik etki gösterir, bunun yanı sıra anjiogenik bir ajandır⁷. TGF- α , epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü beta ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin ovaryumda meydana gelen follikülogenezis, ovositlerin olgunlaşması, granüloza hücrelerinin proliferasyonu, steroidogenezisin düzenlenmesi ve kontrolünde önemli roller oynadığı bilinmektedir^{8,9}. İnsan, rat, domuz, inek ve tavuk ovaryumlarında yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda TGF- α 'nın varlığının gösterilmesine karşın kedi ovaryumlarında TGF- α 'nın varlığına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır^{4,6,10-18}.

Bu çalışmanın amacı, erişkin kedilerin ovaryumlarında

TGF- α 'nın ilk defa immunohistokimyasal yerleşiminin gösterilmesidir.

Materyal ve Metot

Sunulan çalışmanın materyalini, yerel veteriner kliniklerine hayvan sahipleri tarafından kısırlaştırılmak üzere getirilmiş ve rutin ovaryohistektomi operasyonu uygulanmış, yerli ırk, yaşları 8 ay ile 2 yaşa kadar değişen 10 adet puberteye erişmiş, sağlıklı dişi kedinin ovaryumları oluşturdu. Ovaryohistektomi operasyonu sonrasında rutin olarak tıbbi atığa ayrılan ovaryum dokuları hasta sahiplerinin bilgisi dahilinde toplandı. Tarım Bakanlığı'nın denetimi altında faaliyet gösteren bu yerel klinikler operasyon öncesi ve sonrasında hayvan refahını üst düzeyde tutmaktadırlar. Bu nedenle çalışmada etik kurul belgesine ihtiyaç duyulmamıştır. Operasyon sonrası alınan ovaryumlar serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra %10'luk tamponlanmış nötr formol solüsyonunda 24 saat tespit edildi ve rutin histolojik prosedür uygulanarak parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 μ m'lik kesitler alınarak lizin ile kaplı lamlara çekildi. Ovaryumlardaki histolojik yapılarının incelenmesi ve foliküllerin sınıflandırılması için kesitlere Mallory'nin Crossmon tarafından modifiye edilen üçlü boyama yöntemi uygulandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu ile (Nikon eclipse 80i, Tokyo, Japonya) incelendi.

Foliküllerin Sınıflandırılması

Bu çalışmada foliküllerin sınıflandırılması, Bristol ve Woodruff'ın (2003) folikül sınıflandırma kriterlerine göre ovosit çevresindeki granüloza hücrelerinin şekli ve katlılığı göz önüne alınarak yapılmıştır² (Tablo-1).

Tablo-1: Kedi ovaryumlarında foliküllerin sınıflandırılması².

Adlandırma	Tanım
Primordiyal Foliküller	Ovosit çevresinde tek katlı yassı granüloza hücre katmanı bulunan küçük çaplı folikül.
Primer Foliküller	Ovositin çevresinde tek katlı kübik granüloza hücre katmanına sahip küçük çaplı folikül.
Sekonder Foliküller	Ovositin çevresinde 2-3 katlı granüloza hücreleri bulunan ve folikülün dış kısmında teka katmanının görülmeye başladığı folikül.
Küçük Antral Foliküller	Folikül içerisinde granüloza hücreleri arasında küçük bir boşluk içeren folikül. Granüloza hücreleri ile teka katmanları birbirine bitişik.
Büyük Antral Foliküller	Folikül içerisinde granüloza hücreleri arasında büyük bir boşluk bulunan büyük çaplı folikül. Kumulus ovoforus granüloza hücreleri ile temas halinde ve iki katlı teka katmanı belirgin.

İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin kesitlerde TGF- α 'nın immunohistokimyasal yerleşimi indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz kompleks yöntemi uygulanarak gösterildi¹⁹. Lizinli lama çekilen kesitler, deparafinize edildikten sonra antijenin açığa çı-

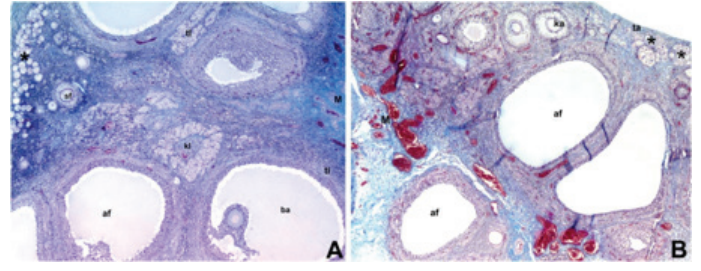
kartılması için distile su içerisinde hazırlanan %0,05'lik Saponin'de (Serva, Heidelberg, Germany) 20 dakika oda ısısında bekletildi. Kesitler fosfat buffer solüsyonunda (PBS) yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesi, % 0.3'lük hidrojen peroksitte oda ısısında 10 dakika bekletilerek engellendi. PBS ile yıkamadan sonra kesitler spesifik olmayan boyanmayı engellemek amacıyla sekonder kit içerisindeki kullanıma hazır bloklayıcı solüsyonunda (Histostain® Plus Kit, 85-6743, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) oda ısısında 1 saat inkübe edildi, bunu takiben kesitler 1 gece +4 °C'de kullanıma hazır primer monoklonal antikor anti-TGF- α (Neomarker, RM9101) ile inkübasyona bırakıldı. PBS ile yıkanan kesitler kullanıma hazır biotinlenmiş sekonder antikor (Histostain® Plus Kit, 85-6743, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) ile oda ısısında 15 dakika bekletildi, yıkamayı takiben kullanıma hazır streptavidin-HRP komplekste (Histostain® Plus Kit, 85-6743, Zymed Laboratories, San Francisco, CA) oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kesitler PBS ile yıkandı ve substrat kromojen-3,3'-diaminobenzidine (DAB- Zymed Laboratories, San Francisco, CA)'de 5 dakika tutularak renk gelişimi sağlandı. Kesitlerin Harris hematoksileni (HHS16, Sigma Aldrich, Germany) kullanılarak karşıt boyanması yapıldı. Negatif kontrollerde de aynı protokol uygulandı fakat primer antikorlar yerine PBS kullanıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme ışık mikroskopunda (Nikon eclipse 80i, Tokyo, Japonya) semikantitatif olarak yapıldı. Buna göre hedef hücrelerin boyanıp boyanmamasına, boyanan hedef hücrelerdeki boyanma yoğunluğuna bakılarak boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) , şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı²⁰.

Bulgular

Histolojik Bulgular

Erişkin kedilerin ovaryumları incelendiğinde organların sağlıklı bir yapı gösterdiği belirlendi. Buna göre ovaryumların korteks ve medulla olmak üzere iki bölüme ayrıldığı görüldü ve bu iki bölge arasında kesin bir sınır gözlenmedi. Ovaryum yüzeyinin tek katlı kübik epitel hücrelerinden meydana gelen germinatif epitel ile örtülü olduğu ve germinatif epitelin altında sıkı bağdokudan oluşan tunika albuginea tabakasının varlığı gözlemlendi. Ovaryumların korteks bölgesinde primordiyal foliküller ve çeşitli gelişme dönemlerinde olan foliküller (primer, sekonder ve antral foliküller) ile gerileme aşamasında olan atretik foliküller gözlemlendi. Foliküller arasında intersitisyel hücrelerin ve korpus luteumların varlığı belirlendi. Medulla bölgesi incelendiğinde ise gevşek bağdokusu içerisinde kan damarları, lenf damarları ve sinir tellerinden zengin olduğu gözlemlendi (Şekil-1).

İmmunohistokimyasal Bulgular



Şekil-1: Erişkin kedi ovaryumunun genel görünümü. Masson'un üçlü boyaması, x40. *:primordiyal folikül, sf:sekonder folikül, ka:küçük antral, ba:büyük antral folikül, af:atretik folikül, kl:korpus luteum, ti:teka interna katmanı, tl:teka lutein katmanı, M:medulla.

Tablo-2: Kedi ovaryumlarında TGF- α 'nın immunohistokimyasal değerlendirme sonuçları. (-) boyanmama, (+) zayıf boyanma, (++) orta şiddette boyanma, (+++) şiddetli boyanma.

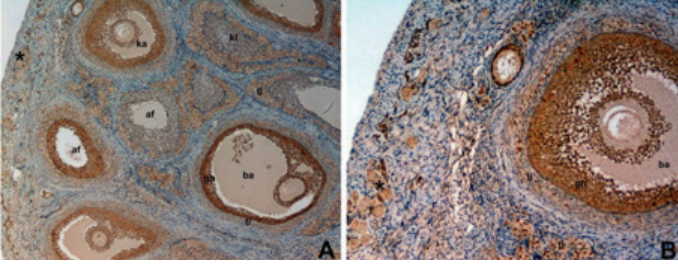
Folikül Sınıfı	Ovosit	Granüloza hücresi	Teka interna katmanı	Teka lutein hücresi
Primordiyal Folikül	+++	+	-	-
Primer Folikül	+	+	-	-
Sekonder Folikül	+	++	++	-
Küçük Antral Folikül	+	++	++	-
Büyük Antral Folikül	+	+++	++	-
Atretik Folikül		+++	++	++

İmmunohistokimyasal bulgular değerlendirildiğinde, TGF- α 'ya ait pozitif boyanmaların primordiyal ve gelişme döneminde olan foliküllerin ovositlerinde, gelişme ve gerileme aşamasındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde gözlemlendi. Ayrıca sekonder, küçük ve büyük antral foliküllerinin teka interna hücrelerinde ve teka lutein hücrelerinde farklı şiddetlerde hücre içerisinde intrasitoplazmik TGF- α ekspresyonu belirlendi (Tablo-2).

Primordiyal foliküllerin ovositlerinde şiddetli (+++) reaksiyon gözlenirken diğer foliküllerin ovositlerinde zayıf (+) reaksiyon gözlemlendi. Granüloza hücrelerindeki immun boyanma yoğunluğu değerlendirildiğinde, büyük antral ve atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde şiddetli (+++) reaksiyon saptanırken küçük antral ve sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde orta şiddetli (++) , primer ve primordiyal foliküllerin granüloza hücrelerinde ise zayıf (+) immun reaksiyon saptandı. Sekonder, küçük ve büyük antral foliküllerinin teka interna katmanında ve teka lutein hücrelerinde orta şiddetli (++) immunreaksiyon belirlendi (Şekil-2). Negatif kontrol kesitlerinde ise herhangi bir reaksiyona rastlanmadı.

Tartışma ve Sonuç

Ovaryumlarda şekillenen folikülogenezis oldukça karmaşık fizyolojik bir olaydır. Folikülogenezis; hipofizin ön lo-



Şekil-2: Kedi ovaryumunda TGF- α 'nın immunohistokimyasal yerleşimi. A:x40, B:x100. *:primordiyal folikül, sf:sekonder folikül, ka:küçük antral, ba:büyük antral folikül, af:atretik folikül, gh:granüloza hücresi,kl:korpus luteum, ti:teka interna katmanı, tl:teka lutein katmanı, M:medulla.

bundan salgılanan hormonların yanı sıra ovosit, granüloza hücreleri, teka interna hücreleri ve intersitisyel hücrelerden salgılanan, içerisinde TGF- α 'nın da bulunduğu çeşitli büyüme faktörlerinin de etkisi altındadır²¹. İnsanlarda, kanatlı hayvanlarda ve memeli hayvanlardan rat, domuz ve ineklerin ovaryumlarında yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, TGF- α 'nın varlığının gösterilmesine karşın erişkin kedi ovaryumlarında TGF- α 'nın varlığı ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir^{4,6,10-18}.

Ovaryumlarda teka hücreleri tarafından üretilen TGF- α , folikül gelişimini düzenleyen en önemli lokal büyüme faktörlerinden biridir²². Yapılan çalışmalar, TGF- α 'nın granüloza hücrelerinin farklılaşmasında güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir²³⁻²⁵. Bazı araştırmacıların insan, domuz, inek, fare ve sıçanlarda yapmış oldukları çalışmalarda, TGF- α 'nın, sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka interna katmanındaki hücrelerde eksprese edildiğini bildirmişlerdir^{4,10-18}. Sunulan çalışmada da foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka interna katmanındaki hücrelerde immun boyanma yoğunlukları değerlendirildiğinde yukarıda bahsi geçen araştırmacılar ile benzer bulgular saptanmıştır. Bunun yanı sıra sunulan çalışmada büyük antrumlu foliküllerin ve atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde de kuvvetli immun boyanma gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda gelişmekte olan ovaryum foliküllerinde teka interna katmanında lokalize olan TGF- α 'nın komşu granüloza hücrelerini parakrin olarak etkileyip, bu hücrelerdeki epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlanarak, androjen biosentezini inhibe edip, granüloza hücrelerinin farklılaşmasını baskılayacağı aynı zamanda TGF- α 'nın otokrin etkilerinde olabileceği gösterilmiştir^{14,16,27,28}. Sunulan bu çalışmada da özellikle ileri gelişme aşamalarındaki foliküllerin ve atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde immun boyanma yoğunluğunun daha fazla görülmesi kedilerde de teka interna katmanında lokalize olan TGF- α 'nın komşu granüloza hücrelerine etki edip, bu foliküllerdeki granüloza hücrelerinin farklılaşmasını baskıladığını düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, TGF- α sadece granüloza hücrelerinin

farklılaşmasında değil aynı zamanda luteinizasyon aşamasında da önemli roller üstlenmektedir^{14,17}. Kawano ve ark. (2012) yapmış oldukları *in vitro* bir çalışmada TGF- α 'nın varlığını insan teka lutein hücrelerinde göstermişlerdir. Lobb ve ark. (1989) ise ilk defa inek teka lutein hücrelerinde TGF- α 'nın varlığını immunohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Sunulan çalışmada da TGF- α teka lutein hücrelerinde pozitif immun boyanma göstermiş ve yapılan diğer çalışmaların ışığında kedi ovaryumlarında TGF- α 'nın luteinizasyonda görev alabileceği düşünülmüştür.

Lundberg ve ark.'nın (2022) ineklerde yaptıkları bir çalışmada TGF- α 'nın ovositlerde eksprese edildiğini bildirirken, Li ve ark. (1994) insanlarda özellikle primordiyal foliküllerdeki ovositlerde daha yoğun eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Mito ve ark. (2013) domuz ovositlerinde yaptıkları *in vitro* bir çalışmada ise çalışma medyumundan gonadotropinler çıkarılıp yerine TGF- α eklendiğinde ovositlerin olgunlaşmasını sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca ratlarda ve farelerde yapılan çalışmalarda da TGF- α 'nın ovosit olgunlaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir^{11,13}. Sunulan çalışmada da özellikle primordiyal foliküllerin ovositlerinde diğer foliküllerin ovositlerine oranla daha kuvvetli bir immun pozitif boyanma görülmüştür. Elde edilen bu bulgular diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile erişkin kedi ovaryumlarında ilk kez TGF- α 'nın immunohistokimyasal yerleşimi gösterilmiş ve kedi ovaryumlarında TGF- α 'nın primordiyalden antral foliküllere kadar tüm follikülogenetik aşamalarda gözlenmesi bununla birlikte granüloza hücrelerinde, teka interna hücrelerinde, teka lutein hücrelerinde ve ovositlerde TGF- α 'nın varlığının saptanması, kedilerde de TGF- α 'nın hem folikülogeneziste hem de granüloza hücrelerinin proliferasyonunda ve differensiyasyonunda rol oynayacağını düşündürmüştür.

Teşekkür

Kedi ovaryum dokularının teminini sağlayan Prof. Dr. Abdülkadir Keskin'e ve immunohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet Akkoç'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Wildt DE, Schiwe MC, Schmidt PM, et al. Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife. *Theriogenology*, 1986;25(1):33-51.
2. Bristol-Gould S, Woodruff T. Folliculogenesis in the

- domestic cat. *Theriogenology*, 2006;66:5-13.
3. Rojo JL, Linari M, Musse MP et al. *Felis Catus* ovary as a model to study follicle biology *in vitro*. *J Assist Reprod Genet*, 2015;32:1105-1111.
 4. Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE et al. Transforming growth factors produced by retro virus-transformed rodent fibroblast and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983;80(1):4684-4688.
 5. Pike LJ, Marquardt H, Todaro GJ et al. Transforming growth factor and epidermal growth factor stimulate the phosphorylation of a synthetic, tyrosine-containing peptide in a similar manner. *J Biol Chem*, 1982;257 (1):14628-14631.
 6. Onagbesan OM, Peddie MJ. The expression of transforming growth factor alpha receptor protein and its activation in chicken ovarian granulosa cells of maturing follicles *Histochem J*, 1998;30(9):647-56.
 7. Luetkeke NC, Lee DC. Transforming growth factor alpha: expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin. Cancer Biol.*, 1991;1(4):265-75.
 8. Singh B, Coffey RJ. From wavy hair to naked proteins: The role of transforming growth factor alpha in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;28:12-21.
 9. Feldman EC, Nelson KW. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. WB Saunders Co., Philadelphia, PA 1996; 741-68
 10. Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Hoshi H. Recombinant FSH and TGF-alpha enhance *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod. Dev*, 2013;80(7):549-60.
 11. Akkoyunlu G, Demir R, Ustünel I. Distribution patterns of TGF-alpha, laminin and fibronectin and their relationship with folliculogenesis in rat ovary. *Acta Histochem*. 2003;105(4):295-301.
 12. Qu J, Nisolle M. Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil Steril*. 2000;74(1):113-121.
 13. Skinner MK, Coffey RJ. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocr*. 1988;123:2632-2638.
 14. Lobb DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Dorrington JH. Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol Reprod*. 1989; 40:1087-109.
 15. Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA et al. Expression of transforming growth factor-alpha in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr J*. 1994;41: 693-701.
 16. Reeka N, Berg FD, Brucker C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod*. 1998; 13: 2199-2205.
 17. Kawano Y, Zeineh K, Furukawa Y et al. The effects of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha on secretion of Interleukin-8 and growth-regulated oncogene in human granulosa-lutein cells. *Gynecol Obstet Inves.t* 2012;73:189-194.
 18. Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA et al. Expression of transforming growth factor-alpha in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocrine Journal*.1994; 41 (6): 693-701.
 19. Özgüden-Akkoç CG, Ozer A. Immunohistochemical localization of transforming growth factor β 1 and β 2 in mouse testes during postnatal development. *Biotech Histochem*. 2012;87(2):154-9.
 20. Adams EJ, Green JA, Clark AH et al. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *J Clin Pathol*, 1999;52(1):75-77.
 21. Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, et al. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray. *Biochemical and Physiological Approaches*. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(7): 413-419.
 22. Derynck R. Transforming growth factor- α . *Mol Reprod Dev*. 1990;27:3-9.
 23. Skinner MK, Coffey RJ. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-a by theca cells. *Endocrinology*. 1988;123:2632-2638.
 24. Lobb DK, Kobrin MS, Kudlow JE, et al. Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol Reprod*. 1989;40:1087-1093.
 25. Pehlivan T, Mansour A, Spaczynski RZ et al. Effects of transforming growth factors-alpha and -beta on proliferation and apoptosis of rat theca-interstitial cells. *Endocrinol*. 2001;170:639-645.
 26. Qu J, Nisolle M, Donnez J Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil Steril*. 2000; 74:113-121.
 27. Tajima K, Orisaka M, Mori T, et al. Ovarian theca cells in follicular function., *Reprod BioMed Online*. 2007; 15(5):591-609.
 28. Lundgerg AL, Jaskiewicz NM, Maucieri AM, et al. Stimulatory effects of TGF α in granulosa cells of bovine small antral follicles. *J Anim Sci*. 2022;100(7):skac105.