



Oğuz VAROĞLU^{1, a}
Güneş ERDOĞAN^{1, b}

¹ Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı,
Aydın, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-4269-7665

^b ORCID: 0000-0002-9807-810X

Kontrasepsiyonda Gen Teknolojisinin Kullanımı

Dünya genelinde çeşitli hayvan türlerindeki populasyon artışı fertilité kontrolünü zorunlu hale getirmiştir. Özellikle yaban hayatının olduğu habitatlarda av-avcı ilişkisi bozulmaktadır. Şehir hayatında ise evde bakılan ve sokak hayvanı sayısındaki hızlı artış insan/ hayvan sağlığı ve çevre hijyeni açısından pek çok probleme neden olmaktadır. Bu sorunun çözümü amacıyla geçici ya da kalıcı çeşitli kısırlaştırma uygulamaları geliştirilmektedir. Sunulan derlemede alternatif bir medikal yöntem olan gen teknolojilerinin kısırlaştırma amacıyla kullanımı güncel çalışma sonuçları ile okuyucuya sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kontrasepsiyon, gen teknolojileri, gen sessizleştirme, reproduksiyon, kısırlaştırma

Using Gene Technology in Contraception

The increase in the population of various animal species in the world has been made necessary to fertility control. The predator-prey relationship deteriorates, especially in the wildlife. In urban life, the rapid increase in home owned and stray animals causes many problems in the human / animal health and environmental hygiene. To solve this problem, it develops various temporary or permanent sterilization approaches. In this review, as an alternative medical method, the usage of gene technologies for sterilisation is presented to readers via recent study results.

Key Words: Contraception, gene technologies, gene silencing, reproduction, sterilization

Giriş

Kontrasepsiyon gebe kalmanın önlenmesi, istenmeyen gebeliklerin sonlandırılması, dolayısıyla üremenin engellenmesi amacıyla uygulanan her türlü yöntemi kapsayan genel bir tanımdır (1). Tüm kontraseptif çalışmalar incelendiğinde medikal ve cerrahi uygulamalar olmak üzere iki ana yaklaşım olduğu görülmektedir (2, 3). Cerrahi kontrasepsiyon uygulamaları dişi hayvanlarda açık/laparoskopik yolla gerçekleştirilen ovaryohistektomi, ovaektomi, salpingektomi ve histektomi operasyonlarını içermektedir. Erkek hayvanlarda ise kastrasyon operasyonu açık veya kapalı şekilde testislerin uzaklaştırılması esasına dayanır. Bu tür operasyonlar anestezi başta olmak üzere çeşitli perioperatif komplikasyon riski taşır. Bununla birlikte kalıcı steriliteye sebep olmaları nedeniyle hayvan sahipleri tarafından tercih edilmeme durumu sözkonusudur (2).

Medikal kontraseptif yöntemler fiziksel ve kimyasal uygulamalar olarak iki ana başlıkta değerlendirilmektedir. Fiziksel yaklaşımda bariyer metotları uygulanmaktadır. Spermatoksik intravajinal aparatlar istenilen kontrasepsiyonu sağlasa da, östrus belirtilerini baskılamayacaktır ve lokal perforasyonlara neden olabilir. Örneğin intravajinal aparat yerleştirilen köpeklerin ancak %50'sinde aparatın vajina içinde kalabildiği ve bu hayvanların da %25'inde gebelik görüldüğü bildirilmiştir (4). Kimyasal ise progesterinler, androjenler, Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) agonist ve antagonistlerini içeren hormon sağıltımını içermektedir. Ancak bu tip hormon uygulamalarında çeşitli metabolik ve genital sistem patolojilerini uyarabilir. Örneğin kedi ve köpeklerde östrus belirtilerinin baskılanması için kullanılan progesterinler pyometra ve meme neoplazilerinin görülme oranını arttırmaktadır (3).

Medikal yöntemlerin içinde değerlendirilen kontraseptif aşı uygulamaları sterilizasyon için önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkar. Kontraseptif aşılarda immunokontrasepsiyon ve gen sessizleştirme/gen terapisi gibi yöntemleri barındıran geniş bir uygulama alanına sahiptir. İdeal bir kontraseptif aşıdan istenilen özellikler sterilitenin geri dönüşümlü olması ve herhangi bir komplikasyon geliştirmeksizin uzun vadede etki göstermesidir. Evcil ve vahşi hayvan türleri için bu tür aşılarda kullanımında kızgınlığın baskılanıp baskılanmamasına göre değişen kullanım seçenekleri vardır. Örneğin seksüel kaynaklı saldırgan davranışların azaltılması hayvanat bahçesi, çiftlik ve pet hayvanları için istenilen bir durum olsa da, doğal yaşamdaki vahşi hayvanlarda sürü hiyerarşisinin korunması nedeniyle istenilen bir durum değildir (5).

Gen teknolojilerinin Hayvanlarda Kontraseptif Amaçlı Kullanımı

İnterferans RNA (iRNA) ya da mikro-RNA moleküllerinin keşfi ile gen ekspresyonlarının durdurulabileceği, bunun sayesinde pek çok sentez mekanizmasının

Geliş Tarihi : 31.01.2020

Kabul Tarihi : 19.05.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Güneş ERDOĞAN
Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Doğum ve Jinekoloji
Anabilim Dalı,
Aydın – TÜRKİYE

gunesems@yahoo.com

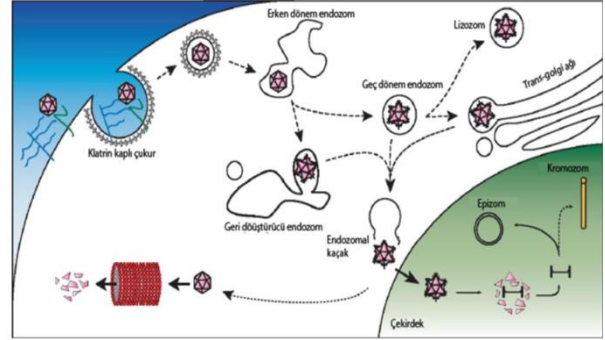
engellenebileceği fikri doğmuştur. Bir hedef genin transkriptinin, sekans spesifik (diziye özgü) bir ilişki temelinde, çift zincirli RNA (dsRNA) ile durdurulması olayı, RNA interferansı olarak tanımlanmaktadır. RNA interferansı, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) hücreye girdiği zaman komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır (6). Bu işlemin temeli, hedef mRNA zincirine komplementer bir çift zincirli iRNA'nın tek zincirini kullanmaktır. Bu işlemde dsRNA, aktarıldığı hücrelerde küçük interfere edici iRNA'lara parçalanır. Bunlara siRNA (small interfering RNA) denir. Olay hücre içi bir metot olup, hücrede oldukça komplike bir biyolojik regülatör makine olarak görev yapar. RNA interferansı, istenmeyen yabancı genlerin elimine edilmesi ve aynı zamanda gen ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonunda hücrede kullanılan bir mekanizmadır. Bu mekanizma doğal bir işlem olup, canlı organizmadaki biyolojik fonksiyonu, virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerin istilasına karşı genomu koruyarak hücre savunmada rol almaktadır. Ayrıca ökaryotik organizmaların gelişimsel programlarının fonksiyonu için önemli olan transkripsiyon sonrası gen susturma ile gen regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (7-9).

Gen ekspresyonlarını baskılamak için kullanılacak siRNA molekülü viral vektörler aracılığı ile hedef hücreye taşınmaktadır. Genetik mühendislik çalışmaları sonucu virüs üretmek ve bu virüsün hedef hücreye gen taşıyabilmesi mümkündür. Yapılan ilk çalışmalar yaklaşık 10 yıl önce başlamış olsa da siRNA moleküllerini hedef hücreye ulaşmasına engelleyecek çok fazla sorun vardır. İnsan sağlığında bu yaklaşımın kullanılması şu anda klinik test aşamasındadır. Alyniam® gibi şirketler amiloidozis ve porfiriya hastalıklarında kullanılmak üzere siRNA ilaçları üretmektedirler. Hayvan sağlığı alanında ise hemofili hastalığı bulunan köpeklerin tedavisinde kullanılmıştır ve sonuç olarak pıhtılaşma fonksiyonu normal sınırlara geldiği bildirilmiştir (10, 11).

Reproduktif sistemde önemli genlerin baskılanması amacıyla iRNA yöntemi kullanılarak fertilitenin engellenmesi sağlanabilir. Gen sessizleştirme yani iRNA müdahalesinin etkili olabilmesi için üç önemli koşul vardır: baskılanacak spesifik genin tanımlanması, siRNA molekülünü hedef hücreye taşıyabilecek viral vektörün identifiye edilmesi ve son olarak hedef hücredeki bilinen geni baskılamak amacıyla siRNA molekülünün hücre içine girebilmesi gerekmektedir (12).

Gen sessizleştirme amacı için kullanılacak viral vektörler arasında patojenik olmayan Adeno-associated virüs (AAV) tercih edilmektedir. Rekombinant Adeno-associated virüs (rAAV) vektörlerinin güvenlik profilleri, çok sayıda insan klinik deneylerinde gösterilmiştir (13). Geniş bir çeşitlilik gösteren AAV suşları spesifik dokulara tropizim gösterebilmektedirler. Ayrıca AAV kapsitleri klinik kullanım için biyolojik özelliklerini değiştirmek amacıyla genetik manipülasyonlara uygunluk sağlamaktadır (14). Rekombinant Adeno-associated virüsün (rAAV) hücre içine giriş mekanizmalarından bazıları Şekil 1'de gösterilmiştir (15). Önemli olarak, hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, yüksek doz

intravenöz rAAV enjeksiyonu uygulandığında merkezi sinir sistemi hücrelerinin (yani kan-beyin bariyerinin ötesinde) transdüksiyonuna yol açtığını göstermiştir (16-23). Yapılan bir çalışmada AAV serotip 9'un modifikasyonu olan rAAV'nin yetişkin fare beynine gen transferi sağlayabileceği ortaya konmuştur (24).



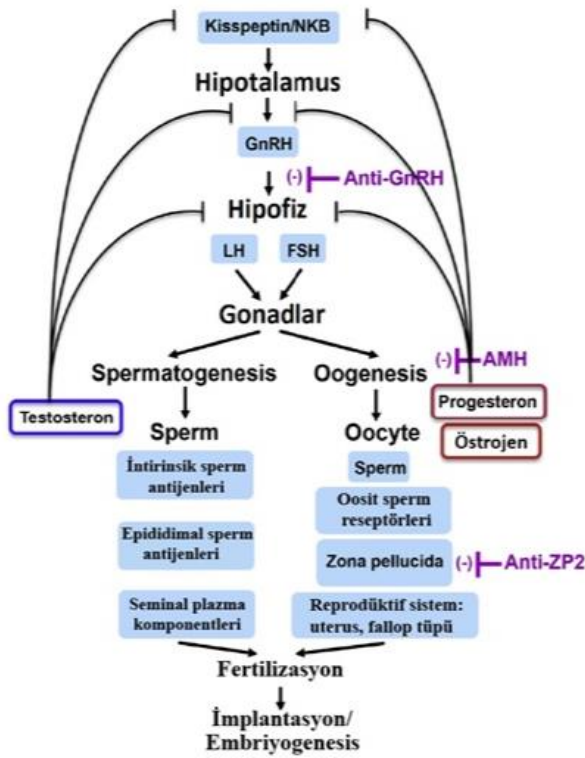
Şekil 1. Rekombinant Adeno-associated virüsün (rAAV) hücre içine girişi ve ilerleyişi (15)

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için çeşitli hormonlar, gamet üretimi, folikül maturasyonu, sperm motilitesi ve aktivasyonunun yanı sıra ovulasyon, sperm ve yumurtanın füzyonu ve embriyonun implantasyonu ve gelişimine bağlıdır. Bu fizyolojik olayların her biri için gerekli olan moleküller, fertilitenin inhibe edilebileceği olası noktalar olarak Şekil 2'de belirtilmiştir (25).

Günümüzde yapılan çalışmalar reproduktif sistemde GnRH'nın salgı mekanizmasını kontrol eden kisspeptin molekülü üzerine yoğunlaşmıştır. Kisspeptin hipotalamustaki KNDy sinir hücreleri tarafından salgılanmaktadır (26, 27). Kisspeptin, pubertal geçiş ve erişkin reproduktif fonksiyonun devamlılığı için gereklidir (28). Kisspeptin'in yanı sıra Neurokinin B'de kisspeptin ekspresyonu için gereklidir ve normal bir fertilité için her iki molekülün bulunması gerektiği bildirilmiştir (29). Kisspeptin ve Neurokinin B'nin üretimlerinden sorumlu genlere bakıldığında sırasıyla Kiss1 ve Tac3 geninin sorumlu olduğu bulunmuştur (29-31). Kisspeptin ve Neurokinin B moleküllerinden herhangi birisinin veya etkilediği reseptörlerin eksikliği sterilite ile sonuçlanmaktadır (28, 32-36).

Dissen ve ark. (37), Kiss1 ve Tac3 gibi reproduksiyonun merkezi kontrolünde yer alan genleri susturmak için Adeno-associated virüs (AAV) kullanarak bir yöntem geliştirmişlerdir. Kedilerin hipotalamusuna iletilen siRNA molekülünü ulaştırmayı amaçlamışlardır. Üretilen bu yapının erkek farelere enjeksiyonu sonrası 5 aylık (Çalışmanın sonu) bir sterilite gözlemlenmiştir. Daha uzun süreli baskılamayı değerlendirildiği çalışmalar da mevcuttur (38-39).

Araştırmacılar ayrıca, gonadotropin inhibe edici hormon (GnIH) ve Anti-Müller hormonunun (AMH) ekspresyonunu sağlayan genlerin daha fazla üretim için etkilenebilirliğini çalışmaktadırlar. GnIH'nin varlığı potansiyel olarak GnRH'nın sentezini azaltabilmektedir (40). Anti-Müller hormonu, Transforming Growth Faktor Beta ailesinin bir üyesidir, erkek ve dişi üreme sistemlerinde kritik bir rol oynamaktadır (41-44). Erkek



Şekil 2. Viral vektör kullanılarak yapılan kontraseptif yöntemlerin çeşitli hedefleri (25)

fetüs gelişimi sırasında Sertoli hücreleri tarafından üretilir ve başlangıçta bipotential üreme yolunda dişi Müllerian kanallarının oluşumunu bloke etmektedir. Erkeklerde AMH seviyeleri pubertaya kadar yüksek kalmakta ve daha sonra dramatik olarak azalmaktadır. Dişilerde ise AMH seviyeleri pubertaya kadar düşüktür, bu noktada erkeklerin puberta dönemi sonrasıyla karşılaştırılabilir düzeylere yükselmektedir (42). Dişilerde AMH, folikül gelişmesi ve büyümesini düzenlemede kritik rol oynar. Postnatal dönemde ovaryumlardaki AMH ve buna bağlı reseptörü granüloza hücrelerinde eksprese edilmektedir. Hem işlev kaybından hem de işlev kazanma deneylerinden elde edilen kanıtlar, AMH'nın follikülogenezde, primordial foliküllerin büyümekte olan folikül havuzuna girmesini engellediğini göstermektedir. AMH ayrıca, FSH'ya bağlı folikül büyümesini de inhibe

edebilmektedir (43, 44). Bu gözlemler eşliğinde, AMH'nın dişilerde kontraseptif amaçla kullanımı ilginç bir seçim olarak karşımıza çıkmaktadır (25). Memeli hayvanların yaşam süresi boyunca yeterince yüksek AMH ifade edebilecek bir genin dişilerde foliküler gelişimi baskılayabileceğini ve sterilitesine neden olabileceği varsayılmaktadır (12). Kemoterapi gören kadınlarda folikül rezervlerini korumak adına AMH aracılı kontrasepsiyon yapılabileceği fikri araştırılmaktadır, deney hayvanları üzerinde yapılan ilk çalışmalar bunu destekler niteliktedir (39). Gen terapisi ayrıca anti-GnRH monoklonal antikorların ve anti-Zona Pellucida (ZP) monoklonal antikorlarının sürekli salgılanmasına neden olabilecek bir genin üretilmesi ve uygulanması için kullanılabilir. GnRH'ya karşı pasif bağışıklık yanıtı için GnRH'yı inaktif edebilecek şekilde yeterince yüksek antikor titresi ve afiniteye sahip bir antikorun üretilmesini gerektirmektedir. Benzer durum anti-ZP antikorları için de gerekmektedir. Araştırmacılar (38) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada AAV vektörlü aşılardan hem erkek hemde dişi hayvanlarda anti-GnRH antikorlarının aşırı ekspresyonuna sebep olduğu görülmüştür. Dişi ve erkek farelerin gonadları atrofiye uğramış ve erkek farelerde testosteron ölçülemeyecek düzeye gelmiştir. Aynı çalışmada anti-ZP antikorlarının aşırı ekspresyonları sağlanmış ve dişi hayvanlarda 6 ay süren bir sterilite gözlemlenmiştir.

Güncel çalışmalar içerisinde GnRH reseptör ekspresyonunu inhibe edebilen gen sessizleştirme teknolojileri de vardır. Bu bağlamda Hipotalamustan GnRH salınımı gerçekleşse bile hipofizdeki reseptör eksikliğinde bağlı FSH ve LH salınım mekanizmasında bozulma görülebilir. Laboratuvar çalışmalarında kitosan ile konjuge edilmiş GnRH molekülünün iRNA için yeni bir taşıyıcı molekül olduğu ve hücrelerdeki GnRH reseptör ekspresyonlarını inhibe edebildiği bildirilmiştir (45).

Başka bir yaklaşım ise testislerde androjen reseptörlerinin ekspresyonunu inhibe etmek için mikro-RNA teknolojisi kullanımıdır, çünkü sperm üretimi de dahil olmak üzere normal testiküler fonksiyon için androjen uyarımı gerekmektedir. Benzer bir şekilde AAV gibi viral vektörler aracılığı ile susturucu genin taşınması sağlanabilir. Sertoli hücrelerinde bulunan androjen reseptörlerinin inhibisyonunun sağlanması ile erkek hayvanlarda sterilitenin sağlanabileceği düşünülmektedir (46).

Kaynaklar

1. Maenhoudt C, Santos N, Fontbonne A, Suppression of fertility in adult dogs. *Reprod Domest Anim* 2014; 49: 58-63.
2. Howe L. Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006; 66: 500-509.
3. Kutzler M, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006; 66: 514-525.
4. Wildt DE, Seager S. Reproduction control in dogs. *Vet Clin North Am* 1977; 7: 775-787.

5. Naz RK, Saver AE. Immunocontraception for animals: Current status and future perspective. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 426-439.
6. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
7. Zeng Y, Cullen BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 2002; 8: 855-860.
8. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, et al. RNA interference: Biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 657-685.

9. Reddy LS, Sarojamma V, Ramakrishna V. Future of RNAi in medicine: A review. *World J Med Sci* 2007; 2: 01-14.
10. Herzog RW, Mount JD, Arruda VR, et al. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 2001; 4: 192-200.
11. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood, J Am Soc Hematol* 2009; 113: 797-806.
12. Rhodes L. New approaches to non-surgical sterilization for dogs and cats: Opportunities and challenges. *Reprod Domest Anim* 2017; 52: 327-331.
13. High KA, Aubourg P. rAAV Human Trial Experience. In: Snyder R, Moullier P. (Editors). *Adeno-Associated Virus. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. 1st Edition, Philadelphia: Saunders 2012: 429-457.
14. Asokan A, Conway JC, Phillips JL, et al. Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 79-82.
15. Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther* 2008; 16: 1189-1199.
16. Duque S, Joussemet B, Riviere C, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 2009; 17: 1187-1196.
17. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 59.
18. Foust KD, Wang X, McGovern VL, et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 271-274.
19. Dominguez E, Marais T, Chatauret N, et al. Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 681-693.
20. Bevan AK, Duque S, Foust KD, et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther* 2011; 19: 1971-1980.
21. Fu H, DiRosario J, Killedar S, et al. Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIb in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol Ther* 2011; 19: 1025-1033.
22. Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, et al. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: A comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol Ther* 2011; 19: 1058-1069.
23. Dayton RD, Wang DB, Klein RL. The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 757-766.
24. Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 204.
25. Hay BA, Li J, Guo M. Vectored gene delivery for lifetime animal contraception: Overview and hurdles to implementation. *Theriogenology* 2018; 112: 63-74.
26. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010; 151: 3479-3489.
27. Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, et al. Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 2011; 152: 4265-4275.
28. de Tassigny XDA, Fagg LA, Dixon JP, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 10714-10719.
29. Navarro VM. Interactions between kisspeptins and neurokinin B. In: Kauffman AS, Smith JT. (Editors). *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*. 1st Edition, New York: Springer 2013: 325-347.
30. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636.
31. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613-617.
32. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1357-1363.
33. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, et al. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1849-1855.
34. Clarkson J, de Tassigny XDA, Moreno AS, et al. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2008; 28: 8691-8697.
35. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009; 41: 354.
36. Silveira LG, Tusset C, Latronico AC. Impact of mutations in kisspeptin and neurokinin B signaling pathways on human reproduction. *Brain Res* 2010; 1364: 72-80.
37. Dissen GA, Adachi K, Lomniczi A, et al. Engineering a gene silencing viral construct that targets the cat hypothalamus to induce permanent sterility: An update. *Reprod Domest Anim* 2017; 52: 354-358.
38. Li J, Olvera AI, Akbari OS, et al. Vectored antibody gene delivery mediates long-term contraception. *Curr Biol* 2015; 25: R820-R822.
39. Kano M, Sosulski AE, Zhang L, et al. AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci* 2017; 114: E1688-E1697.

40. Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 284-295.
41. Durlinger A, Visser J, Themmen A. Regulation of ovarian function: The role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002; 124: 601-609.
42. Kim JH, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors. *Obstet Gynecol Sci* 2014; 57: 343-357.
43. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod* 2014; 90: 85-91.
44. McLennan IS, Pankhurst MW. Anti-Mullerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J Endocrinol* 2015; 226: R45-R57.
45. Boonthum C, Namdee K, Boonrungsiman S, et al. Chitosan-based DNA delivery vector targeted to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Carbohydr Polym* 2017; 157: 311-320.
46. Roesl C, Jeffery N, Smith S. Single injection sterility via lentiviral-mediated suppression of androgen receptors in Sertoli cells. in Abstract presented at the ISCFR-EVSSAR Congress, Paris, France. 2016.