

Metody rozpoznawania zaburzeń płci na przykładzie obojnactwa u psa

PIOTR JURKA, PAULINA ZIELIŃSKA, PAWEŁ SYSA*, MAREK GALANTY, ANNA GRUK-JURKA, MAŁGORZATA SOBCZAK-FILIPIAK

Katedra Nauk Klinicznych, *Katedra Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-766 Warszawa

Jurka P., Zielińska P., Sysa P., Galanty M., Gruk-Jurka A., Sobczak-Filipiak M.
Methods of recognition sex abnormalities such as hermaphroditism in a dog

Summary

The aim of this study was to show different methods for the recognition of abnormalities in the determination of fenotypical, gonadal and chromosomal sex such as hermaphroditism in dogs. The subject of examination was a 9-month-old Yorkshire terrier with clinical signs of hermaphroditism. Clinical examination led to a definition of fenotypical sex and coexisting dysgenesis (perineal hypospadias). Clinical examination appeared insufficient for recognition of the type of hermaphroditism, additional tests needed to be conducted to reach the full diagnosis. Ultrasonographic examination, hormonal profile, diagnostic laparotomy, as well as a histopathological examination, were performed in order to define the gonadal sex. Chromosomal sex was defined on the basis of karyotyping.

Keywords: dog, dysgenesis, hermaphroditism, sex abnormalities

Obojnak (*intersexus*, *hermaphroditus*) jest osobnikiem wykazującym cechy obu płci, u którego czasem trudno już na podstawie wyglądu zewnętrznego jednoznacznie określić przynależność do jednej z nich (2, 7). Obojnactwo (*hermaphroditismus*) jest zaburzeniem dotyczącym osobników, u których w gonadach występują zarówno struktury jajnikowe, jak i jądrowe. Taki typ obojnactwa nazywany jest prawdziwym (*hermaphroditismus verus*) (1, 2). W przypadku, gdy gonada będąca jądrem znajduje się na obszarze jamy brzusznej, proces spermatogenezy nie jest możliwy. Zaburzenie rozwoju płciowego jest następstwem nieprawidłowości zaistniałych na poziomie płci chromosomalnej, gonadalnej bądź fenotypowej (2). Pojawienie się klinicznej postaci zaburzenia płci nasuwa pytania o właściwe metody jej diagnozy, tak jak w opisywanym przez nas przypadku.

Celem pracy było przedstawienie różnych metod rozpoznawania zaburzeń płci fenotypowej, gonadalnej oraz chromosomalnej na przykładzie obojnactwa u psa.

Materiał i metody

Badaniom poddano psa rasy yorkshire terier w wieku 9 miesięcy, o masie ciała 3,4 kg.

Badanie kliniczne. Wstępne rozpoznanie obojnactwa postawiono w wieku 9 miesięcy na podstawie wywiadu, badania ogólnego i szczegółowego badania układu rozrod-

czego. Na tym etapie zwierzę posiadało cechy fenotypowe samicy (wargi sromowe, ślepo zakończony przedsionek pochwy. W łechtaczce znajdowała się kość prącia. W celu określenia położenia ujścia zewnętrznego cewki moczowej przeprowadzono jej zgłębnikowanie.

USG. W wieku 9 miesięcy wykonano badanie USG narządów układu rozrodczego aparatem Honda 4000 z użyciem głowicy 7,5 MHz. Przed badaniem skórę ogolono, odkażono oraz pokryto żelem do USG.

Korekcyjny zabieg chirurgiczny. W wieku 9 miesięcy zdecydowano o przeprowadzeniu operacji usunięcia kości prącia oraz plastyki przedsionka pochwy. Wprowadzono cewnik do ujścia cewki moczowej, która znajdowała się nad podstawą kości prącia. Wystająca z warg sromowych kość prącia utrudniała oddawanie moczu. Po nacięciu grzbietowej części błony śluzowej aż do jej podstawy, odsłonięto kość prącia o długości około 4,5 cm. Następnie ją usunięto poprzez odcięcie u podstawy. Skorygowano długość błony śluzowej łechtaczki oraz zszyto jej brzegi przy użyciu nici wchłanianej (Dexon, Tyco) o grubości 3-0.

Profil hormonalny. Pomiary stężeń progesteronu i estradiolu wykonano w wieku 2 lat i 11 miesięcy metodą immunofluorescencyjną z wykorzystaniem komercyjnych testów immunoenzymatycznych do ilościowego oznaczenia progesteronu (P4) i estradiolu (E2) (Pointe Scientific Polska), po uprzedniej ekstrakcji octanem etylu. Pomiar fluorescencji wykonano w aparacie Pointe 2000. Wszystkie analizy wykonano dwukrotnie w każdej serii. Wydajność ekstrakcji dla obu hormonów wahała się od 92% do

99%, a czułość oznaczeń i błąd wewnętrzny wynosiły, odpowiednio, dla estradiolu 10 pg/ml (37 pmol/l) i 9,6%, a dla progesteronu 0,05 ng/ml (0,8 nmol/l) i 8,0%. Testosteron oznaczono metodą immunofluorescencyjną z wykorzystaniem komercyjnych testów immunoenzymatycznych do ilościowego oznaczania testosteronu (DPC, USA). Pomiar fluorescencji wykonano w aparacie Immulite 2000. Czuość oznaczeń i błąd wewnętrzny wynosiły, odpowiednio, 0,15 ng/ml (0,5 nmol/l) i 8,2%.

Laparotomia diagnostyczna. Zabieg przeprowadzono u pacjenta w wieku 2 lat i 11 miesięcy (stwierdzono w tym wieku obecność jądra po stronie lewej). Cięcie powłok brzusznych wykonano w linii pośrodkowej, rozpoczynając od pępka i kończąc przy spojeniu łonowym. Po otwarciu jamy brzusznej przeprowadzono oględziny narządów jamy brzucha. Stwierdzono obecność niedorozwiniętej macicy. Jej prawy róg prawidłowo wykształcony przedłużał się w jajowód w stronę jajnika, podczas gdy lewy róg macicy skierowany był w stronę lewego kanału pachwinowego. Ponadto w lewym rogu stwierdzono zawartość płynną. W celu uwidocznienia gonady w lewej pachwinie nacięto i oddzielono skórę od tkanki podskórnej i mięśni brzucha. Stwierdzono tam obecność jądra pokrytego osłonką pochwową wspólną, z powrózkiem uchodzącym do kanału pachwinowego. Powrózek nasienny przez kanał pachwinowy był połączony z rogiem macicy.

Zabieg kastracji. Po postawieniu diagnozy obojactwa, w trakcie laparotomii przeprowadzono zabieg kastracji. W tym celu najpierw nacięto osłonkę pochwową wspólną, wyeksponowano jądro, nasieniowód oraz tętnicę i żyłę jądrową. Założono osobne przewiązki na naczynia, nasieniowód i odcięto jądro. Przecięte w okolicy pachwinowej naczynia jądrowe i nasieniowód zostały przeciągnięte do jamy brzusznej, aby usunąć je wraz z rogiem macicy. Nadmiar osłonki pochwowej wystającej w kanale pachwinowym usunięto i założono szew węzłkowy na zewnętrzny pierścień pachwinowy. Następnie przeprowadzono zabieg usunięcia macicy wraz z jajnikiem po prawej stronie. Trzon macicy przecięto w okolicy szyjki, po wcześniejszym założeniu przewiązek z nici wchłanianej Dexon o grubości 2-0. Zabieg zakończyło typowe zamknięcie mięśni brzucha szwem ciągłym na okrętkę, z wykorzystaniem nici Dexonu o grubości 2-0. Następnie w lewej pachwinie założono 3 szwy węzłkowe łączące rozpreparowaną na tępo luźną tkankę łączną (po usunięciu jądra), wykorzystując do tego nić Dexon o grubości 3-0. Zabieg kończyło szycie na okrętkę tkanki podskórnej nicią Dexon o grubości 3-0 i skóry nicią poliamidową Amifil o grubości 3-0.

Kariotyp. W celu określenia rodzaju obojactwa, konieczne było przeprowadzenie analizy chromosomów (7). Krew do badań cytogenetycznych pobrano z żyły odpromieniowej do próbki podciśnieniowej, zawierającej heparynę litową jako antykoagulant (LH Lithium Heparin – Vacuette; Greiner). Hodowlę limfocytów poprowadzono z wykorzystaniem pełnej krwi. Do próbki zawierającej 9 ml medium hodowlanego DMEM wzbogaconego o penicylinę (100 IU/ml), streptomycynę (0,1 mg/ml) oraz gentamycynę (5,5 mg/ml) wprowadzono 0,9 ml pełnej krwi. Jako stymulatora podziału limfocytów użyto 0,3 ml/hodowli LF-7 (Biomed). Dwie godziny przed końcem 72-godzinnej

hodowli komórkowej podano po 0,4 µg/ml kolchicyny na hodowlę. Po odwirowaniu krwinek i usunięciu supernatantu, zawiesinę komórkową poddano działaniu płynu hipotonicznego, tj. 0,05M KCl o temperaturze 38°C, przez 20 min. Zawiesinę komórkową utrwalano następnie mrożoną mieszaniną, składającą się z metanolu i kwasu octowego lodowatego w proporcji 3 : 1, trzykrotnie przepłukując utwalcaczem. Następnie komórki nakrapiano na zamrażane szkiełka podstawowe. Po wysuszeniu preparaty barwiono barwnikiem Giemsy oraz oceniono 100 kompletnych metafaz, o dobrym rozproszeniu chromosomów.

Badanie histopatologiczne. Wycinki rogów macicy oraz obu gonad, pobranych w trakcie zabiegu laparotomii, utwralono w 10% zbuforowanej formalinie. Po utrwaleniu były odwadniane w szeregu alkoholi i zatapiane w parafinie. Skrawki parafinowe barwiono metodą hematoksyliny-eozy-na (HE) oraz metodą van Giessona na obecność włókien kolagenowych tkanki łącznej (9).

Wyniki i omówienie

W badaniu szczegółowym (w wieku 9 miesięcy) potwierdzono obecność warg sromowych, ślepo zakończonych przedsionka pochwy z kością prącia w łechtaczce. W badaniu palpacyjnym stwierdzono obecność rogów macicy. Ujście cewki moczowej znajdowało się na grzbietowej części przedsionka pochwy nad kością prąciową, co zostało zaklasyfikowane jako spodziectwo kroczone. Nie stwierdzono obecności jąder w okolicy mosznowej psa. Badaniem USG potwierdzono obecność rogów macicy w jamie brzusznej. Rozpoznano obecność tylko prawego jajnika umiejscowionego przy końcu rogu macicy. Lewej gonady nie udało się uwidocznić. Natomiast w lewej okolicy pachwinowej stwierdzono obecność tworów wielkości 1,2 × 1,0 × 0,8 cm o echogenności tkanki gruczołowej.

Po osiągnięciu przez psa wieku 2 lat i 11 miesięcy, przy kolejnym badaniu klinicznym stwierdzono obecność jądra lewego w lewej okolicy pachwinowej. W wyniku laparotomii diagnostycznej wykonanej w wieku 2 lat i 11 miesięcy potwierdzono obecność jajnika prawego oraz jądra po stronie lewej. Ze względu na charakter gonad obojactwo zakwalifikowano jako prawdziwe.

W badaniu stężenia hormonów we krwi obwodowej badanego pacjenta (wartości referencyjne dla suki – w.r.s.) stwierdzono: podwyższony poziom testosteronu 1,06 ng/ml (w.r.s – 0-0,5 ng/ml), niski poziom estradiolu 6,37 pg/ml (w.r.s – 15-60 pg/ml) oraz poziom progesteronu ≤ 0,1 ng/ml (w.r.s – 0-1 ng/ml, faza *anestrus*). Uzyskane wyniki badań hormonalnych wskazują na znaczny udział testosteronu w regulacji hormonalnej opisywanego osobnika. Podniesiony poziom testosteronu u obojaka obserwowali inni autorzy (1, 6).

We wczesnym rozwoju embrionalnym gonady są niezróżnicowane. Jajniki kształtują się później przy obecności chromosomów płci żeńskiej, natomiast jąd-

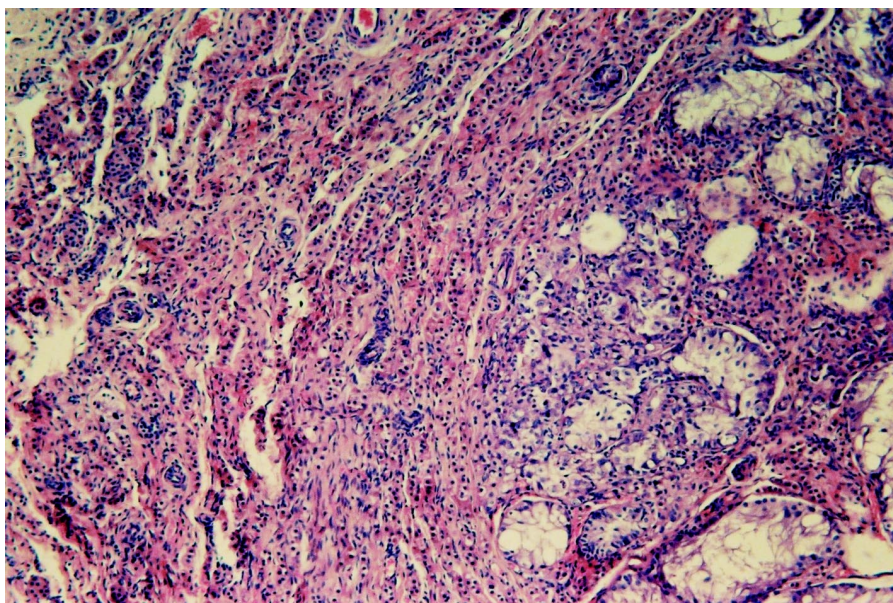
ra przy obecności chromosomu Y. Do czynników niezbędnych do prawidłowego kształtowania się męskiego osobnika należą produkowane w jądrach testosteron oraz czynnik hamowania rozwoju przypranercza (Anty Müllerian Hormone), glikoproteina produkowana przez komórki podporowe jądra. Przy braku jąder niezróżnicowany zarodek przekształca się w fenotypową samicę. W przypadku, gdy zawiązki narządów żeńskich reagują niewystarczająco na działanie testosteronu, u samców o kariotypie XY, mających prawidłowe jądra, mogą wystąpić zaburzenia rozwojowe struktur układu moczopłciowego (7).

W badaniach cytogenetycznych naszego pacjenta we wszystkich płytkach metafazowych stwierdzono obecność

78 chromosomów, wśród których rozpoznawalne były dwa typowe chromosomy płci X i Y. Tak więc wszystkie analizowane komórki miały zestaw chromosomów 78,XY, właściwy dla osobnika męskiego. Przeprowadzone do tej pory badania dają obraz fenotypowo płci żeńskiej natomiast w badaniach hormonalnych i cytogenetycznych przewagę płci męskiej. Sugeruje to konieczność przeprowadzenia dalszych badań w celu określenia płci. Do podobnych wniosków doszli w swoich badaniach nad obojnakami inni autorzy (1, 5, 8).

W badaniu histopatologicznym gonada zlokalizowana w kanale pachwinowym po stronie lewej miała budowę charakterystyczną dla jądra przy wnętrostwie. Kanaliki plemnikotwórcze wyścielone były wysokimi lub niskimi komórkami nabłonka podporowego. Nie stwierdzono obecności komórek płciowych ani dojrzewania plemników (brak spermatogenezy). Pomiedzy kanalikami obecne były liczne komórki Leydiga i pasma tkanki łącznej. Ogniskowo pod osłonką jądra stwierdzono grupy komórek o morfologii trudnej do jednoznacznego określenia, przypominały one pierwotne sznury płciowe bez światła. Najądrze wykształcone było prawidłowo.

Obraz histopatologiczny gonady, która znajdowała się w jamie brzusznej, w lokalizacji typowej dla jajnika po stronie prawej, okazał się trudny do jednoznacznej klasyfikacji. W preparacie stwierdzono liczne przekroje struktur, które przypominały różnej wielkości pęcherzyki jajnikowe (także pęcherzyki z cechami torbieli), a miejscami rozszerzone kanaliki, jednak bez komórek płciowych. W pojedynczych małych pęcherzykach komórki piętrzyły się do ich światła w sposób przypominający tworzenie przez warstwę ziarnistą wzgórków jajonośnych, brak było jednak oocytów. Na obwodzie gonady stwierdzono obecność licznych pęcherzyków pierwotnych z dużymi oocytami I rzędu. Opisane elementy strukturalne osadzone były w łącznotkankowym, bogato unaczynionym zrębie. Taki ob-



Ryc. 1. Obraz histopatologiczny jajniko-jądra (*ovotestis*), (HE 10 ×)

raz histopatologiczny pozwala klasyfikować badaną gonadę jako jajniko-jądro (*ovotestis*) (ryc. 1).

W obrazie histopatologicznym macicy i jej rogów stwierdzono zanik błony śluzowej macicy. Nabłonek jednowarstwowy walcowaty, miejscami wielorzędowy, ogniskowo przechodził w nabłonek jednowarstwowy sześcienny. Część komórek nabłonkowych zawierała w cytoplazmie duże wakuole. Gruczoły maciczne były bardzo słabo rozwinięte; ich pozostałości widoczne były w łącznotkankowym zrębie, a miejscami tworzyły torbiele. Nabłonek tworzący struktury gruczołowe był sześcienny, a w niektórych miejscach walcowaty. Ponadto widoczny był rozrost tkanki łącznej zrębu (barwienie metodą van Giessona), a sieć naczyń krwionośnych była bardzo silnie rozwinięta. Towarzystwo temu wylewy krwi w błonie śluzowej, wyraźne w głębszych warstwach zrębu lub tuż pod nabłonkiem, oraz bezpośrednio do światła narządu. Było to szczególnie zaznaczone w rozszerzonym odcinku lewego rogu.

Uzyskane wyniki badań potwierdzają pogląd, iż badanie histopatologiczne w takim przypadku bywa trudne w interpretacji (5, 8). Budowa histopatologiczna badanego narządu może daleko odbiegać od prawidłowej, a brak jest specjalistycznych, szczegółowych opracowań, dotyczących tego tematu, z uwagi na unikatowość takich przypadków.

Osobniki interseksualne są zazwyczaj nieplodne (wyjątkiem są samce obarczone odwróceniem płci XX). U ludzi leczenie obojactwa zmierza do uzyskania u pacjenta zgodności fenotypowych cech płciowych z poczuciem przynależności do płci odczuwanej przez pacjenta. W przypadku zwierząt przeprowadza się korektę struktur anatomicznych i usunięcie gonad, które mogą stać się źródłem procesu nowotworowego. Biorąc pod uwagę dziedziczność niektórych typów interseksualizmu, należy poprzez kastrację i sterylizację zapobiegać możliwości przekazywania tej cechy

potomstwu (2, 3). W celu niedopuszczenia do chorób macicy, a zwłaszcza w przypadku już istniejącego ropomacicza, konieczne jest wykonanie zabiegu ovariostrektomii. Usunięcie gonad likwiduje także problemy z występowaniem rui. U psów z wnetrostwem należy dokonać kastracji, z uwagi na ryzyko nowotworzenia jąder. Po usunięciu struktur będących źródłem testosteronu, łechtaczka ulega często zmniejszeniu, niekiedy jednak (przy silnym powiększeniu) wymagana jest amputacja kości z łechtaczki. Przy spodziewaniu należy wykonać odpowiedni zabieg operacyjny, w zależności od jego rodzaju i stopnia zaawansowania (4). Nie zaleca się leczenia niepłodności osobników interseksualnych, ze względu na możliwość dziedziczenia tej wady (3, 6, 7).

U szczeniąt rozpoznanie obojnactwa zdarza się rzadko. Objawy, jakie może zaobserwować sam właściciel zwierzęcia, to anomalie dotyczące zewnętrznych narządów płciowych, stwierdzane najczęściej u psów dopiero w wieku około 6 miesięcy. Powodem wizyty w gabinecie lekarskim może być także krwisty wpływ (okresowe objawy rui) u psa uważanego za samca oraz zainteresowanie innymi osobnikami męskimi. Nierzadko występuje krwimocz, nietrzymanie moczu i ropomacicza.

Pełną diagnozę zaburzenia rozwojowego można postawić dopiero po kompleksowym ustaleniu płci fenotypowej, gonadalnej oraz chromosomalnej (2). W przypadku płci fenotypowej postawienie rozpoznania możliwe było po badaniu klinicznym narządów płciowych. W przypadku płci gonadalnej konieczne było wykonanie badań hormonalnych, USG, laparotomii i oceny histopatologicznej, natomiast ustalenie płci chromosomalnej wymagało analizy kariotypu. Dla określenia płci fenotypowej niezbędne jest zbadanie miejsca ujścia cewki moczowej, stwierdzenie obecności moszny, napletka, tylnej części pochwy, sromu i łechtaczki oraz położenia sromu w zależności od tego, które z tych struktur występują. Zabieg laparotomii umożliwia ustalenie typu gonad, morfologię narządów płciowych wewnętrznych oraz ewentualnie przetrwałych przewodów Müllera. Należy określić występowanie ewentualnych jajowodów, macicy, najądrzy i nasieniowodów oraz ich umiejscowienie. W celu postawienia ostatecznej diagnozy i ustalenia kariotypu musi być wykonana analiza chromosomów. U osobników żeńskich jeden z dwu chromosomów X jest nieaktywny i widoczny w komórkach somatycznych jako ciało Barra. Dzięki badaniu wymazu z błony śluzowej pochwy na obecność ciała Barra można wstępnie określić układ chromosomów płci. Stwierdzenie więcej niż jednego ciała Barra w komórkach somatycznych świadczy o obecności więcej niż dwu chromosomów X, a jego brak wskazuje na występowanie jednego chromosomu X. Pełne określenie kariotypu wymaga szczegółowej analizy chromosomów (2). Kluczową rolę odgrywa także zebranie informacji na temat pochodzenia psa. Ustalenie zaburzeń rozwojowych na-

rządów rozrodczych u przodków zwierzęcia pozwala stwierdzić, czy dany defekt jest dziedziczny. Uzyskanie takich informacji pomaga w zrozumieniu sposobów odziedziczenia większości wad dotyczących rozwoju płciowego (7, 8).

W opisywanym przypadku okazało się przydatne przeprowadzenie wszystkich opisanych badań w celu postawienia pełnego rozpoznania. Wykonanie pojedynczego badania może okazać się niewystarczające do postawienia diagnozy.

Piśmiennictwo

1. Allen W. E., Daker M. G., Hancock J. L.: Three intersexual dogs. *Vet. Rec.* 1981, 109, 468-471.
2. Dubiel A.: Rozród psów. Wyd. Akademii Rolniczej, Wrocław 2000, 67-77.
3. Hardy R. M., Root Kustritz M. V.: Theriogenology Question of the Month. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 227, 887-888.
4. Hayes H. M., Wilson G. P.: Hospital incidence of hypospadias in dogs in North America. *Vet. Rec.* 1986, 118, 605-606.
5. Kuiper H., Wagner F., Drögemüller C., Distl O.: Persistent Mullerian duct syndrome causing male pseudohermaphroditism in a mixed-breed dog. *Vet. Rec.* 2004, 155, 400-401.
6. Meyers-Wallen V. N.: Inherited abnormalities of sexual development in dogs and cats, [w:] Concannon P. W., England G., Verstegen III J., Linde-Forsberg C.: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. IVIS, Ithaca, NY 2001.
7. Niemand H. G., Suter P. F.: *Praktyka kliniczna: Psy*. Wyd. Pro-Trade, Bratislava 2003, 923-926.
8. Volpe P., Izzo B., Pia Di Meo G., Perucatti A., Iannuzzi L.: Male pseudohermaphroditism in a dog: a clinical case. *Vet. Rec.* 2000, 146, 532-533.
9. Zawistowski S.: *Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii*. PZWL, Warszawa 1970, 67-167.

Adres autora: dr Piotr Jurka, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-766 Warszawa; e-mail: piotr_jurka@sggw.pl