



VAKA RAPORU

Bir keçide hermafroditizm olgusu: Klinik ve genetik yaklaşım

Çağlayan Özel^{1,5}, Gonca Şen¹, Mustafa Hitit¹, Nadir Koçak², Aydın Güzeloğlu¹, Ahmet Semacan³, Ercan Kurar^{1,4*}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, ²Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, ³Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 42075, ⁴Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 42080, Konya, ⁵Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, 71450, Kırıkkale, Türkiye
Geliş: 11.06.2014, Kabul: 26.06.2014
*ekurar@konya.edu.tr

Özet

Özel Ç, Şen G, Hitit M, Koçak N, Güzeloğlu A, Semacan A, Kurar E. Bir keçide hermafroditizm olgusu: Klinik ve genetik yaklaşım.

Abstract

Ozel C, Sen G, Hitit M, Kocak N, Guzeloglu A, Semacan A, Kurar E. A case report of hermaphrodite goat: Clinical and genetic approach.

Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 4, 227-231
DOI:10.15312/EurasianJvetSci.201447381

Bu vaka takdiminde, 2010 yılında Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Kliniğine getirilen ve hermafroditizm olgusu saptanan Maltız melezi bir keçinin klinik muayenesi ile sitogenetik ve moleküler genetik analizleri gerçekleştirildi. Anamnezde keçinin tek olarak doğduğu, klinik muayenede boynuzsuz, klitoris 1.9x0.9 cm büyüklüğünde, vajinanın normalden daha kısa olduğu gözlemlendi. Palpasyon ve ultrasonografik muayenede inguinal bölgede, deri altında sağ (4.88 cm) ve sol (2.87 cm) testis tespit edildi. Meme ve meme başları normal konumunda ve büyüklükte belirlendi. Deri altı rudimenter penis varlığı tespit edildi, ancak scrotum ve açık prepisyum gözlenmedi. Karyotip analizi için periferik kandan hazırlanan kromozom preparatları GTG bantlama tekniği ile boyanmış ve image analyzer programı ile uygun metafazlar belirlenerek analiz edildi. Kan örneğinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi, sex-determining region Y (SRY) ve amelogenin gen bölgeleri pozitif ve negatif kontroller kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yükseltildi. Karyotip analizinde metafaz plağı 60,XY olarak tespit edildi. PZR analizlerinde SRY lokusu negatif, amelogenin lokusunda ise yalnızca AMX alleli tespit edildi. Keçilerde yaygın olarak gözlenen hermafroditizm vakalarının şekillenmesinde farklı mekanizmalar bildirilmektedir. Hermafroditizm vakalarının karyotip ve moleküler genetik analizler ile detaylı incelenmesi ve boynuzsuz keçilerin damızlıktan çıkarılması tavsiye edilmektedir.

This case report describes clinical examination and cytogenetic and molecular genetic analyses of a hermaphrodite mixed Maltese breed goat that was referred to the Gynecology Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University in 2010. In anamnesis, goat was a single kid at the birth and was polled. Clitoris was 1.9x0.9 cm in size and vagina was shorter than normal. By palpation and ultrasonographic examination, it was determined that the right (4.88 cm) and left (2.87 cm) testicles were located under skin in the inguinal region. Breast and nipples were in normal size. There was a rudimentary penis located under skin but no scrotum or prepitium was observed. After chromosome preparation using peripheral blood samples and GTG staining, appropriate metaphases were analyzed using an image analyzer program. Genomic DNA was isolated from the blood sample. Sex-determining region Y (SRY) and amelogenin gene regions were amplified using polymerase chain reaction (PCR) including positive and negative controls. In karyotype analysis, metaphase plaque was observed as 60,XY. In PCR analysis, no SRY amplification was determined and only AMX allele was observed for amelogenin locus. Hermaphroditism is widely observed in goats and a number different mechanisms were reported. It is suggested that polled rams should be culled and karyotype and molecular genetics analyses should be performed to evaluate hermaphrodite cases in detail.

Anahtar kelimeler: Keçi, hermafroditizm, karyotip, SRY, amelogenin

Keywords: Goat, hermaphroditism, karyotype, SRY, amelogenin



Memelilerde hermafroditizm (interseks) erkek veya dişi hayvana ait görünüm ve üreme organların bir arada olmasıdır. Gonad dokusunun varlığına göre yalancı ve gerçek olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gerçek hermafroditler, birlikte erkek ve dişi gonadlara veya ovotestis(ler)e sahiptirler. Yalancı hermafroditlerde tek bir gonad dokusu bulunur ve fenotipik olarak genellikle dişi görünümündedirler (Basrur ve Kochhar 2007).

Hermafroditizm en çok domuz ve keçilerde gözlenmektedir. Lübnan'da Shami keçilerinde hermafroditizm %6 oranıyla en sık gözlenen (%27.02) anomali olarak rapor edilmiştir (Al-Ani ve ark 1998). A.B.D.'de Saanen (%11) ve Toggenburg (%6) keçileri ile Hindistan'da Avrupa sütçü keçi ırklarının melezlerinde (%2) önemli oranda hermafroditizm olgusu tespit edilmiştir. Süt verimi yüksek olan ırklarda ve boynuzsuz keçilerde hermafroditizm daha yaygın gözlenmektedir (Basrur ve Kochhar 2007, Dennis 1993). Hermafroditizm olguları Canarian (Batista ve ark 2000), Lori melezi (Pourjafar ve ark 2012), Saanen (Basrur ve Kochhar 2007, Karan ve ark 2011, Arıcan ve ark 2012), Boer, Cashmore ve Rangeland (Kijas ve ark 2013) ırkı keçilerde rapor edilmiştir.

Keçi hermafroditizm olgularının yaygın olarak yalancı erkek hermafroditizmi olduğu belirtilmiştir. Bu hayvanlar genellikle dişi olarak doğarlar ve cinsel olgunluk döneminde erkek görünümünü almaya başlarlar. Hipertrofik klitoris, küçük meme başları ve hypospadias gözlenebilir. Testisler intra-abdominal, skrotumda veya deri altında bulunabilir (Basrur ve Kochhar 2007).

Bu çalışmanın hayvan materyalini 2010 yılında büyümüş klitoris şikayeti ile Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniğine getirilen 3.5 aylık, fenotip olarak dişi görünümlü Maltız melezi bir keçi oluşturdu (Şekil 1). Anamnezde keçinin tek olarak doğduğu, klinik muayenede boynuzsuz, klitoris 1.9x0.9 cm büyüklüğünde (Şekil 2), vajinanın normalden daha kısa olduğu gözlemlendi. Palpasyon ve ultrasonografik muayenede inguinal bölgede, deri altında sağ (4.88 cm) ve sol (2.87 cm) testis tespit edildi



Şekil 1. Çalışmaya konu olan Maltız melezi hermafrodit keçi.



Şekil 2. Hipertrofik klitoris (1.9x0.9 cm).



Şekil 3. Inguinal bölgede deri altı testisler.

(Şekil 3). Meme ve meme başları normal konumunda ve büyüklükte belirlendi. Deri altı rüdimenter penis varlığı tespit edildi, ancak scrotum ve açık prepisyum gözlenmedi.

Hermafroditizm vakalarının detaylı incelenmesinde radyolojik ve postmortem muayeneler yapılmaktadır (Arıcan ve ark 2012). Sunulan bu vakada hasta sahibinin onamı olmadığı için laparoskopik ve postmortem muayeneler gerçekleştirilmemiş, uterus ve olası gonadlar makroskopik ve histopatolojik olarak detaylı incelenememiştir. Dolayısıyla, olgunun ayırıcı tanısı (gerçek veya yalancı hermafroditizm) yapılamamıştır. Genetik analizler için periferik kan örnekleri alınmıştır.

Hermafroditizmin oluşmasında rol alan en önemli etkenin genetik faktörler olduğu (Karan ve ark 2011), dolayısıyla karyotip ve moleküler genetik analizler ile detaylı incelenmesi tavsiye edilmektedir. Kromozom preparatları literatürden modifiye edilen metot (Morhead ve ark 1960) kullanılarak phytohemagglutinin (PHA) ile stimüle edilen periferik kan lenfositlerinden hazırlanmıştır. Kromozomların boyanmasında GTG yöntemi kullanılmıştır. GTG bantlama öncesi preparatlar tripsin ile muamele edilmiş. Metafazlar CytoVision Metaphase Finder sistemi (Applied Imaging, Santa Clara, CA) kullanılarak analiz edilmiş ve fotoğraflanmıştır. Analiz sonucunda karyotip 60,XY olarak tespit edilmiştir (Şekil 4).

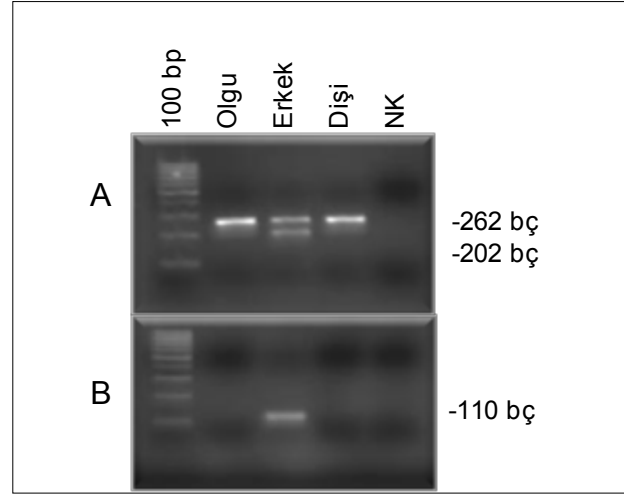
Ruminantlarda erkek ve dişi ikiz gebeliklerinde, fetal membran kan damarlarının anastomozları sonucunda fütüsler arasında hücre ve hormon geçişleri nedeniyle kimerizm ve freemartinizm şekillenebilmektedir (Basrur ve McKinnon 1986). Freemartinizm yaygın olarak sığır ve koyunlarda gözlenmektedir. Keçilerde ikizlik oranı yüksek olmasına rağmen interplazental vazküler anastomozlar yaygın değildir ve genellikle cinsiyet farklılaşmasının şekillendiği kritik dönemden sonra oluşmaktadır. Dolayısıyla, keçi hermafroditizm vakalarında freemartinizm oranı (%6) düşüktür



Şekil 4. Karyotip analizi. Metafaz plagi 60,XY olarak tespit edilmiştir.

(Basrur ve Yadav 1990, Basrur ve Kochhar 2007, Christensen ve ark 2009).

Bu çalışmada spesifik DNA belirteçleri kullanılarak X ve Y kromozomlarının varlığı araştırılmıştır. Kan örneğinden (K₃-EDTA'lı) standart fenol/kloroform yöntemi (Sambrook ve ark 1989) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Pozitif ve negatif kontroller ile birlikte DNA örneklerinden amelogenin ve sex-determining region Y (SRY) genom bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmiştir. PZR protokolü 1x Mg⁺⁺ free PCR buffer (Fermentas, Maryland, A.B.D.), 200 mM dNTP (Fermentas, Maryland, A.B.D.), 1.5 mM MgCl⁺⁺, 0.375 ünite Taq polimeraz (Fermentas, Maryland, A.B.D.), 5 pM SRY (F-5'-GCTATGTTTCAGAG-TATTGAACGACG-3', R-5'-GCGCTATGACTGTCTGTG-CAC-3') veya amelogenin (F-5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3', R-5'-CCCGCTTGGTCTGTCTGTTGC-3') primer çifti (Pourjafar ve ark 2012) ve ~50 ng template DNA olacak şekilde toplam 15 µL hacimde hazırlanmıştır. Touchdown PZR profili (Don ve ark 1991) BioRad My-Cycler (Hercules, ABD) ısısal döngü cihazı kullanılarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. 95°C'de 4 dakika ile tam bir denatürasyon sonrası ilk aşamada 16 döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0.5°C düşürülen ve 30 saniye süren annealing ve 72°C'de 30 saniye elongation sağlanmıştır. İkinci aşamada 94°C'de 30 saniye, 52°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olacak şekilde 25 döngü kullanılmıştır. Son olarak örnekler adenizasyon için 72°C'de 10 dakika tutulmuştur. Tüm PZR ürünleri %2.5 agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmış, ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak 365 nm UV'de görüntülenmiştir (Şekil 5). Amelogenin geni 5. ekzon bölgesindeki delesyondan (60 bç) dolayı Y-kromozom



Şekil 5. Hermafrodit (olgu), erkek ve dişi keçi DNA ve negatif kontrol (NK) amelogenin (A) ve SRY (B) PZR sonuçları. Amelogenin lokusunda AMX alleli 262 bç, AMY alleli 202 bç ve SRY lokusu 110 bç olarak yükseltgenmiştir. DNA bantları 100 bç DNA standardı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

kopyası (202 bç) X kromozomu kopyasından (262 bç) ayrılabilir. Çalışmaya konu olan hermafrodit keçide amelogenin lokusunda yalnızca X kromozomu kopyası olan AMX alleli tespit edilmiştir. PZR analizlerinde SRY lokusu için gen amplifikasyonu gözlenmemiştir (Şekil 5).

Keçi hermafroditizm olguları nispeten daha az oranda boynuzlu keçilerde de tespit edilmiştir. Bu hayvanlar genellikle kimerik (60,XX/XY) yapıdadırlar ve yalnızca erkek hermafrodit olarak tanımlanmaktadırlar (Bongso ve ark 1982, Batista ve ark 2000, Pourjafar ve ark 2012). Batista ve ark (2000) bir çalışmada, 20 aylık Canarian ırkı boynuzlu bir keçide hipertrofik klitoris (2x0.9 cm) tespit edilmiş ancak serviks, testis, penis ve skrotum gözlenmemiştir. Laparoskopik muayenede atrofik farklılaşmış ovaryum benzeri yapılar 15x0.8 cm büyüklüğünde tubüler bir yapı ile servikse bağlanmıştır. Plazma testosteron seviyesi sağlıklı koçlara göre bazal seviyede bulunmuştur. Periferal lökositler kullanılarak gerçekleştirilen sitogenetik analizlerde 60,XX/XY karyotip gözlenmiş olup bulguların kimerizmi desteklediği bildirilmiştir. Boynuzlu, Lori melezi hermafrodit bir keçide hipertrofik klitoris (1.8x0.8 cm) kısa ve kör vajina, inguinal bölgede skrotum ve testisler gözlenmiştir. PZR analizleri ve ölçülen hormon değerleri keçinin kimerik XX/XY olduğunu göstermiştir (Pourjafar ve ark 2012).

Hermafroditizmin oluşumunda ikinci mekanizma olarak genetik faktörler kabul edilmektedir. Hermafroditizme neden olan resesif bir genin boynuzsuzluktan sorumlu otozomal dominant bir gen ile bileşik olduğu bildirilmiştir (Pourjafar ve ark 2012, Anonim 2014). OMIA (Online Mendelian Inheritance of Animals) veri



tabanında polled/intersex sendromu (PIS, #000483-9925) olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2014). Linkage (Vaiman ve ark 1997) ve fiziksel (Vaiman ve ark 1999) gen haritaları ile PIS'unun genom bölgesi 1q43 olarak tanımlanmıştır. Mikroarray analizleri (Kijas ve ark 2013) ile PIS'unun genom bölgesinin validasyonu yapılmış, ancak hermafroditizm ve boynuzsuzluk özelliklerinin kalıtımının bilinenin aksine göre daha kompleks olduğu bildirilmiştir (Anonim 2014). İlgili genom bölgesini kapsayan BAC klonlarının DNA dizi analizleri sonucunda PIS regulated transkript 1 (PISRT1) geni tespit edilmiştir. PIS'unda, genellikle tekrar dizilerini içeren 11.7 kb büyüklüğünde genom bölgesinin delesyonunun telomer yönünde 20 kb uzaklıkta bulunan PISTR1 ve 200 kb uzaklıkta bulunan forkhead box L2 (FOXL2) genlerinin transkripsiyonunu etkilediği tespit edilmiştir (Pailhoux ve ark 2001). PIS'larında iki farklı LINE elementi ile kuşatılmış PISRT1 geninin yüksek oranda delesyonu (%80) gözlenmiştir (Pailhoux ve ark 2005). FOXL2 mutasyonu nedeniyle insanlarda PIS'na benzer blepharophimosis ptosis epicanthus inversus sendromu (BPES; MIM#110100) meydana gelmektedir (Anonim 2014). FOXL2'nin ovaryum, PISRT1'nin ise testis farklılaşmasında sorumlu oldukları ve testis gelişimi ve farklılaşması için bu iki genin SRY tarafından baskılandığı bildirilmiştir (Pailhoux ve ark 2005). Gen ekspresyon çalışmaları ile sığır boynuz gelişiminde FOXL2 etkisi tespit edilmiştir (Allais-Bonnet ve ark 2013). Boulanger ve ark (2014), FOXL2'nin keçilerde gerçek bir cinsiyet belirleyici gen olduğunu ve fonksiyon kaybının PIS'nun gelişmesi için yeterli olacağını belirtmektedir. Dolayısıyla, FOXL2'nin cinsiyet ve boynuz gelişimi üzerine potansiyel pleiotropik etkisinden bahsedilebilir.

Bu çalışmada, hermafrodit Maltız melezi bir keçi klinik ve genetik açıdan incelenmiştir. Klinik ve sitogenetik bulgular yalancı erkek hermafroditizmi desteklemektedir. Anamnezde tek doğum olarak belirtilmesine rağmen erken intrauterin ölümlerden dolayı kimerizm olasılığı göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmada alınan kan örneğinden yalnızca bir adet metafaz plağı incelenebilmiş ve elde edilen karyotip 60,XY olarak tespit edilmiştir. Ancak, esnek touchdown PZR profilinde iki farklı DNA belirteçi kullanılmasına rağmen Y kromozomu DNA'sı yükseltgenememiştir. SRY ve amelogenin bölgelerini kapsayan mikro mutasyonların kullanılan sitogenetik yöntemler ile tespit edilebilmesi mümkün değildir. Keçinin fenotipik olarak boynuzsuz olması PIS'unu düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada PIS genom bölgesini kapsayan genetik analizler gerçekleştirilmemiştir.

Yukarıda da tartışıldığı gibi hermafroditizm oluşmasında farklı mekanizmalar bulunmaktadır.

Boynuzsuzluk ve cinsiyet gelişimini kontrol eden bazı genler arasında tespit edilen genetik ilişkiden dolayı, pratik olarak boynuzsuz keçilerin damızlık olarak kullanılmaması tavsiye edilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, 5. Ulusal Veteriner Zootekni Kongresi'nde (29 Mayıs - 01 Haziran 2014, Burdur) sunulmuştur.

Kaynaklar

- Al-Ani FK, Khamas WA, Al-Qudah KM, et al., 1998. Occurrence of congenital anomalies in Shami breed goats: 211 cases investigated in 19 herds. *Small Rumin Res*, 28, 225-232.
- Allais-Bonnet A, Grohs C, Medugorac I, et al., 2013. Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in Bovidae. *PLoS One*, 8:e63512, DOI: 10.1371/journal.pone.0063512.
- Anonim 2014. Online Mendelian Inheritance of Animals (OMIA) 000483-9925: Polled/Horns in *Capra hircus*. <http://omia.angis.org.au/OMIA000483/9925>, Erişim tarihi; 02.05.2014.
- Arıcan İ, İnan S, Özyiğit G, et al., 2012. Bir keçide rastlantısal yalancı erkek hermafroditizm olgusu. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 1, 68-70.
- Basrur PK, McKinnon AO, 1986. Caprine intersexes and freemartins. In; *Current Therapy in Theriogenology*, Ed; Morrow DA, Saunders, Philadelphia, USA, pp: 596-600.
- Basrur PK, Yadav BR, 1990. Genetic diseases of sheep and goats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 6, 779-802.
- Basrur PK, Kochhar HS, 2007. Inherited Sex Abnormalities in Goats. In; *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, Eds: Youngquist RS, Threlfall WR, 2nd Ed. Saunders, USA, pp: 590-594.
- Batista M, Gonzalez F, Cabrera F, et al., 2000. True hermaphroditism in a horned goat with 60XX/60XY chimerism. *Can Vet J*, 41, 562-564.
- Bongso TA, Thavalingam M, Murkherjee TK, 1982. Intersexuality associated with XX/XY mosaicism in horned goat. *Cytogenet Cell Genet*, 34, 315-319.
- Boulanger L, Pannetier M, Gall L, et al., 2014. FOXL2 is a female sex-determining gene in the Goat. *Curr Biol*, 24, 404-408.
- Christensen BW, Drost M, Troedsson MT, 2009. Diseases of the Reproductive System. In; *Large Animal Internal Medicine*, Ed; Smith BP, 4th Ed. Elsevier, USA, pp: 1427-1470.
- Dennis SM, 1993. Congenital abnormalities. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 9, 183-202.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, et al., 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acid Res*, 19, 4008.





- Karan M, Üstündağ Y, Aydın M, 2011. Saanen ırkı bir oğlakta rastlanılan cycloopia, arhinia ve hermafroditizm olgusu. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 17, 147-150.
- Kijas JW, Ortiz JS, McCulloch R, et al., 2013. International Goat Genome Consortium, Genetic diversity and investigation of polledness in divergent goat populations using 52088 SNPs. Anim Genet, 44, 325-335.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, et al., 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp Cell Res, 20, 613-616.
- Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, et al., 2001. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. Nat Genet, 29, 453-458.
- Pailhoux E, Vigier B, Schibler L, et al., 2005. Positional cloning of the PIS mutation in goats and its impact on understanding mammalian sex-differentiation. Genet Sel Evol, 37, S55-64.
- Pourjafar M, Badiei K, Sharifiyazdi H, et al., 2012 Application of hormonal and single multiplex PCR assays for detection of freemartinism in a horned goat. İstanbul Üniv Vet Fak Derg, 38, 175-181.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition, Volume 2, Cold-Spring Harbor, New York, USA, pp: 9.16-9.19.
- Vaiman D, Pailhoux E, Schibler L, et al., 1997. Genetic mapping of the polled/intersex locus (PIS) in goats. Theriogenology, 47, 103-109.
- Vaiman D, Schibler L, Oustry-Vaiman A, et al., 1999. High-resolution human/goat comparative map of the goat polled/intersex syndrome (PIS): The human homologue is contained in a human YAC from HSA3q23. Genomics, 56, 31-39