

46,XY mišrios gonadų dizgenezės ir lytinės diferenciacijos sutrikimo diagnozavimas ir gydymas

Gilvydas Verkauskas, Diana Mačianskytė, Dainius Jančiauskas¹, Romualdas Tomas Preikša², Rasa Verkauskienė², Francis Jaubert³

Kauno medicinos universiteto Vaikų chirurgijos klinika, ¹Patologinės anatomijos klinika,

²Endokrinologijos klinika, Vaikų endokrinologijos skyrius, Lietuva,

³Paryžiaus Descartes universiteto Necker vaikų ligoninės Patologijos klinika, Prancūzija

Raktažodžiai: lytinės diferenciacijos sutrikimas, gonadų diagenėzė, ruoželinė gonada.

Santrauka. Tikslas. Apžvelgti vienos rečiausių lytinės diferenciacijos sutrikimo, 46,XY mišrios gonadų diagenėzės, diagnostiką ir gydymą.

Medžiaga ir metodai. Retrospektyvioji penkių ligonių, gydytų Kauno medicinos universiteto klinikose 2003–2006 m., apžvalga. Įvertinome klinikinį vaizdą, bazinę ir stimuliuotą testosterono koncentraciją, histologinę ir imunohistocheminę sėklidžių bei ruoželinės gonados vaizdą. Imunohistochemiškai ištirta FOXL2, SOX9, AMH, AMHr, C-kit ir PLAP genų ekspresija.

Rezultatai. Visi pacientai buvo neaiškios lyties: turėjo ilgesnį nei 25 mm lytinį gumburėlį, urogenitalinį sinusą, makštį, gimdą su atviru kakleliu, ruoželinę gonadą vienoje pusėje ir sėklidę kitoje. Keturiems pacientams po diagnozės nustatymo buvo pasirinkta vyriškoji lytis ir tik vienai – moteriškoji. Atliekant žmogaus chorioninio gonadotropino mėginį, visiems pacientams nustatytos geros stimuliuoto testosterono koncentracijos ir lytinio gumburėlio padidėjimas. Histologiškai tiriant ruoželines gonadas, rastos nediferencijuotos germinacinės ląstelės, apsuptos lytinių drūžių ląstelėmis, retais atvejais – formuojančiomis struktūras, panašias į primordiales folikulus. C-kit ekspresija nustatyta visų pacientų germinacinėse ląstelėse, o PLAP – keturiems. FOXL2 ekspresija nustatyta keturiose ruoželinėse gonadose iš penkių ir nė vienoje iš dviejų tirtų sėklidžių. AMH geno ekspresija nustatyta tik sėklidėse. SOX9 ekspresija nustatyta abiejose tirtose sėklidėse ir trijose iš keturių tirtų ruoželinėse gonadose. Virilizuojanti genitoplastika atlikta antraisiais gyvenimo metais, feminizuojanti – trejų metų amžiaus tiriamiesiems.

Išvados. Vertinant gonadų histologijos ir vidinių genitalijų struktūros tyrimus, 46,XY mišrią gonadų diagenėzę reikia skirti nuo ovotestikulinio ir kitų 46,XY lytinės diferenciacijos sutrikimų. Didelė testosterono koncentracija po stimuliacijos ir geras atsakas į gydymą testosteronu turi padėti parenkant vyriškąją lytį. Testikulinės ir ruoželinės gonadų dalių genų ekspresija skiriasi – ruoželinėje gonadoje vyrauja FOXL2 geno ekspresija. Patartina ankstyva gonadų ir genitalijų chirurgija.

Įvadas

Pastarųjų metų citogenetikos ir molekulinės biologijos pažanga gerokai praplėtė žinias, jog žmogaus lytį lemia homologinių chromosomų pora (XX-normali moteriškoji lytis, XY-normali vyriškoji lytis). Aprašyta nemažai XX vyriškojo ir XY moteriškojo lytinės diferenciacijos sutrikimo atvejų. Be to, atrasti lytinėse ir somatinėse chromosomose esantys genai, kurie turi įtakos gonados vystymuisi iš užuomazginių ląstelių.

Sutrikus gonadų vystymuisi intrauteriniui laikotarpiu, žmogus gimsta su gonadų diagenėze, kuri gali būti tikroji arba mišri. Tikroji gonadų diagenėzė (46,XY, 46,XX) nustatoma individams, kurių gonados yra ruoželio tipo, o išoriniai bei vidiniai moteriški lytiniai latakai atrodo normaliai. Mišri gonadų diagenėzė

(MGD) dažniausiai nustatoma individams, kurių kariotipas yra mozaikos tipo – 45,XO/46,XY. Jie vienoje pusėje turi daugiau ar mažiau disgenetišką sėklidę, o kitoje – vadinamąją ruoželinę gonadą, sudarytą iš mišrių nesubrendusių stromos elementų ir kartais pavienių nesubrendusių germinacinių ląstelių.

Rečiau MGD sindromas nustatomas esant leukocitų kariotipui 46,XY. Patogenėzė nėra visiškai aiški, tačiau įtakos tam gali turėti ir kelių genų pokyčiai bei chromosomų mozaikinės anomalijos periferiniuose audiniuose. Netgi esant periferiniam kariotipui 46,XY, citogenetiškai ištyrus gonadų ląsteles, galima aptikti mozaiką (1). Kartais ląstelių iš lyties liaukų kariotipo mozaika būna tiek reikšminga, kad vystosi moteriškosios lyties individas be išorinių genitalijų tarplytiškumo su aprašytais vaisingumo atvejais (2). Konkretūs

genai, atsakingi už MGD sindromo atsiradimą, dar neišvardyti. Šiuo metu žinoma daugiau kaip 50 vien tik *SRY* geno mutacijų.

Dėl sėklidės determinuojamojo faktoriaus, esančio Y chromosomoje (*SRY* – *sex-determining region Y*) ir su juo susijusių genų (*SOX9*, *WT1*, *SF1*, *M33* ir kt.) poveikio lytinių drūžių ląstelės diferencijuojasi į Sertolio ląsteles. Vienas svarbiausių šioje kaskadoje yra autosominis *SOX9* genas (angl. *SRY-box-containing gene 9*). Jo mutacijos susijusios su lyties pasikeitimu iš vyriškosios į moteriškąją net 75 proc. 46,XY atvejų (3). Šio geno ekspresija gonadose galima ir nepriklausomai nuo *SRY* geno (4). Tyrimai atlikti su pelėmis parodė, jog *SOX9* atlieka lemiamą vaidmenį sėklidės formavimosi procese, kontroliuodamas anti-Müllerio hormono (*AMH*) geno ekspresiją. *AMH*, kuris lyties diferenciacijos metu yra atsakingas už Müllerinių latakų (kiaušintakių ir gimdos užuomazgos) regresiją, pradedamas sintezuoti Sertolio ląstelėse nuo septintos nėštumo savaitės. Nuo devintos nėštumo savaitės gaminamas testosteronas (T), kuris yra atsakingas už vyriškųjų vidinių ir išorinių lytinių organų virilizaciją bei Volfo latakų ir išorinių vyriškųjų genitalijų tolesnį vystymąsi (5). Trūkstant sėklidės formavimąsi lemiančių genų ir normaliai funkcionuojant „ovarogenezės“ veiksniams, lytinių drūžių ląstelės tampa primordialių folikulų sudarančiomis epitelinėmis grūdėtosiomis (*granulosa*) ląstelėmis. Anksčiau manyta, jog, nesant virilizaciją skatinančių genų, vaisiaus vystymasis moteriškąja linkme vyksta „automatiškai“. Naujausių tyrimų duomenys rodo, kad šis procesas taip pat aktyvus. Jį lemia *WNT4*, *FOXL2*, *DAX1* ir kiti genai (6, 7). *FOXL2* (angl. *forkhead transcription factor gene*) geno koduojamas baltymas kaip ir *SOX9*, yra transkripcijos faktorius, reikalingas primordialių folikulo grūdėtųjų ląstelių – moteriškojo Sertolio ląstelių atitikmens formavimuisi (6). Nesant Sertolio ląstelių ir *AMH*, neslopinami Müllerio latakai, iš kurių toliau vystosi kiaušintakiai, gimda bei makštys skliautas. Nesant testosterono, Volfo latakai išnyksta (8). Priešingos lyties latakų liekanos randamos abiejų lyčių individuose. Manoma, kad dominuoja vietinis *AMH* veikimas, dėl to šalia disgenetiškos sėklidės randami mišrūs priedai, o šalia ruoželinės gonados – kiaušintakis ir hipoplastiška dažniau vienpusė gimda.

Gonadų imunohistocheminis tyrimas suteikia daug naudingos informacijos. Žmogaus placentos-tipo šarminės fosfatazės (*PLAP*) (angl. *human placental-like alkaline phosphatase*) ir citokinų tirozino kinazės receptorių (*C-kit*) (angl. *cytokine tyrosine kinase receptor*) ekspresija nustatoma vaisiaus germinacinėse ląstelėse ir gali būti randama maždaug iki dvejų metų amžiaus. Vėliau šios ekspresijos nustatymas yra ma-

lignizacijos požymis (9, 10). Naujausi gonadų imunohistochemijos tyrimai parodė, kad, tiriant *SOX9* ir *FOXL2* ekspresiją disgenetiškose gonadose, galima įvertinti gonados lytinės diferenciacijos kryptį ir laipsnį (6). *FOXL2* ekspresija randama kiaušidėse, taip pat ir gonadoblastomą supančiose grūdėtosiomis ląstelėse, o *SOX9* – sėklidėse, taip pat ir *Ca in situ* aplinkoje (Sertolio ląstelėse). Gonadoblastoma yra mažo piktybiškumo, retai metastazuojantis navikas, kartais vertinamas kaip piktybinio kiaušidžių germinacinių ląstelių naviko – disgerminomos pirmtakas, *Ca in situ* – II tipo sėklidės germinacinių ląstelių navikų (seminomos ir neseminomos) pirmtakas.

Metodai

2003–2006 m. Kauno medicinos universiteto klinikų Vaikų endokrinologijos ir chirurgijos skyriuose ištyrėme penkis pacientus, kuriems buvo diagnozuota 46,XY mišri gonadų dizgenezė.

Citogenetinis tyrimas. Tiriamųjų kariotipas buvo nustatytas kraujo limfocitų kultūroje standartiniu G-juostų metodu, dažant chromosomas Giemsa metodu KMUK Genetikos laboratorijoje (11).

Hormonų tyrimai ligoniams prieš operaciją atlikti KMUK Biochemijos laboratorijoje komerciniais radioimuniniais rinkiniais (Spectria Orion Diagnostica, Espoo, Suomija). Liuteinizuojančio hormono (LH) ir folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) kiekis kraujyje nustatytas imunoradiometrinio tyrimo metodu (IRMA). Siekiant nustatyti Leidigo ląstelių aktyvumą, atliktas žmogaus chorioninio gonadotropino (žCG) mėginys – trys injekcijos po 100 TV/kg svorio, bet ne daugiau 1500 TV, švirkščiant į sėdmenų raumenis 3 dienas iš eilės (12). Testosterono koncentracija radioimunitiniu būdu (RIA) nustatyta prieš stimuliaciją ir praėjus 24 val. nuo paskutinės žCG injekcijos. Testosterono normalūs laboratoriniai rodmenys: vyrams – nuo 3,5 iki 8,5 ng/ml; moterims – nuo 0,18 iki 0,5 ng/ml. Jaunesnio amžiaus mergaitėms skirtingai nei berniukams normali T koncentracija nuo amžiaus nepriklauso ir minimali yra 0,1–0,5 nmol/l. žCG mėginys teigiamas, kai T koncentracijos padidėjimas daugiau kaip du kartus arba ne mažiau kaip 2 nmol/l (13).

Siekiant įvertinti androgenų periferinį veikimą (lytinio gumburėlio padidėjimą), atliktas biologinis mėginys paskiriant ligoniams į raumenis kas mėnesį tris testosterono esterų preparato (Sustanon 250) injekcijas 75 mg/m² kūno paviršiaus ploto dozėmis.

Histologinis ir imunohistocheminis tyrimas. Gonadų audiniai buvo fiksuoti Bouin's tirpalu. KMUK Patologinės anatomijos klinikoje audiniai buvo įlieti į parafiną ir supjaustyti 3–4 μm storio pjūviais pagal standartinę metodiką. Pjūviai buvo deparafinuoti ksi-

lolu, nudažyti hematoksilinu bei eozinu, pagaminti histologiniai preparatai ištirti šviesiniu mikroskopu. Kituose pjūviuose buvo atliktos imunohistocheminės reakcijos su polikloniniais antikūnais prieš *PLAP*. Papildomi imunohistocheminiai tyrimai atlikti Paryžiaus Necker vaikų ligoninės Anatomijos ir ląstelių patologijos skyriuje. Nustatyta *C-kit*, *AMH*, *AMH-R*, *SOX9* ir *FOXL2* genų ekspresija visų penkių ruoželių gonadų ir dviejų sėklidžių biopstatuose. Buvo naudoti polikloniniai anti-*C-kit* antikūnai, skiesti 1:150; anti-Miulerinio hormono (anti-*AMH*) ir jo receptoriaus (anti-*AMHR*) antikūnai, skiesti 1:500; anti-*SOX9* antikūnai, skiesti 1:500; ir anti-*FOXL2* antikūnai, skiesti 1:100.

Rezultatai

Klinikiniai požymiai

Pacientai į KMUK dėl lyties diferenciacijos sutrikimo paguldyti nuo 1–12 mėn. amžiaus. Išorinės genitalijos buvo tarplytiškos visiems pacientams. Visų pacientų lytinis gumburėlis (ši terminą patartina vartoti vietoj klitorio ar varpos, kol lytis neaiški) buvo didesnis nei 25 mm, matuojant ištempus nuo gaktikaulių sąvaržos iki galvutės viršūnės. Visiems kūdikiams rastas skeltas kapšelis su labiau išsivysčiusia viena puse, skrotalinė hipospadija ir urogenitalinis sinusas – bendras šlaplės ir makšties kanalas (1 pav.). Visų pacientų sėklidės buvo nenusileidusios: vienam pacientui neužčiuopta nė viena sėklidė, trims – dariniai panašūs į sėklides užčiuopti kirkšnies srityje dešinėje pusėje, vienam – kairėje.

Dviem tik gimusiems naujagimiams prieš specialų ištyrimą (R, G) nustatyta moteriškoji lytis, 1 pacientui (J) – vyriškoji, dar dviem (C, N) lytis nenustatyta.

KMUK visiems pacientams buvo nustatytas 46,XY kariotipas. Po to visi buvo ištirti vaikų endokrinologijos skyriuje: nustatyta FSH, LH ir, atlikus žCG mėginį, testosterono koncentracija (1 lentelė).

Hormonų tyrimas

Padidėjusi LH koncentracija nustatyta visiems pa-



1 pav. Tarplytiškos išorinės genitalijos

cientams. Didesnė FSH koncentracija nustatyta tik vyriausiam – 12 mėn. amžiaus pacientui (1 lentelė).

Testosterono koncentracija iki žCG stimuliacijos buvo sumažėjusi tik 10 mėnesių pacientui, o padidėjusi – 12 mėn. pacientui. Stimuliuoto T koncentracija visiems pacientams buvo didesnė nei pradinė. Mažiausiai padidėjo 4 mėn. amžiaus paciento (N) testosteronas – 1,4 karto, bet skirtumas tarp koncentracijų buvo pakankamas – 2,8 nmol/l. Didžiausias stimuliuoto T padidėjimas (>100 kartų) nustatytas 10 mėn. kūdikiui, nors ir T koncentracija prieš stimuliaciją ir po jos nebuvo didžiausia – 0,15 ir 15,7 nmol/l. Didžiausia stimuliuoto T koncentracija nustatyta 1 mėn. pacientui – 29,56 nmol/l, t. y. 7 kartus didesnė už pradinę koncentraciją.

Kadangi tirtiems vaikams ryškesnio testosterono sekrecijos sutrikimo nenustatyta, kad atmesti galimą audinių androgenų receptorių jautrumo sumažėjimą, kaip lyties diferenciacijos sutrikimo priežastį, skyrėme po tris injekcijas Sustanon 250 po 75 mg/m² kūno pa-

1 lentelė. Hormonų tyrimų duomenys

Pacientas	Amžius (mėn.)	Bazinė testosterono koncentracija* (nmol/l)	Testosterono koncentracija po stimuliacijos (nmol/l)	LH* IU/L	FSH* IU/L
R	10	0,15 (0,2–0,5)	15,7	3,1 (0–1)	3,7 (0–7)
C	1	4 (4–14)	6	1,45 (0–1)	8,3 (0–28)
N	4	6,8 (4–14)	9,64	6,01 (0–1)	14,15 (0–28)
G	1	4,27 (4–14)	29,56	7,6 (0–1)	3,02 (0–28)
J	12	4,7 (0,2–0,5)	14,1	2,2 (0–1)	8,9 (0–7)

* Hormonų tyrimų duomenys ir jų normos berniukams, atsižvelgiant į tiriamojo amžių.

viršiaus ploto dozėmis į raumenis, kas mėnesį. Po šio gydymo visų kūdikių, ypač jauniausių, lytiniai gumburėliai pakankamai padidėjo.

Laparoskopija

Procedūros metu ruoželinė gonada buvo rasta visiems pacientams. Keturiems iš penkių tirtų pacientų ruoželinė gonada buvo laparoskopiskai rasta kairėje pusėje, o sėklidė – dešinėje. Tik vienam pacientui (C) ruoželinė gonada buvo rasta dešinėje pusėje. Laparoskopijos metu ruoželinės gonados buvo pašalintos, o iš sėklidžių paimtas biopsinis tyrimas. Dviem vaikams sėklidės nuleidimas buvo atliktas tos pačios operacijos metu, rezekuojuant trikampio formos ruoželinės gonados struktūros priedą. Pasirinkus moterišką lytį, sėklidė buvo laparoskopiskai pašalinta (2 pav.).

Histologija

Sėklidžių histologinis vaizdas turėjo aiškius disgenезės požymius: daugiau jungiamojo audinio, retesni kanalėliai ir germinacinės ląstelės juose. Ruoželinėse gonadose buvo rasta daugiau ar mažiau subrendusių germinacinių ląstelių su pavienėmis primordialiniais folikulus bei netaisyklingas struktūras formuojančiomis lytinių ląstelių (3 pav.). Mūsų pacientų histologiniuose gonadų preparatuose nebuvo nei gonadoblastomai, nei kitokiam sėklidės vėžiui būdingų požymių.

Imunohistocheminių tyrimų metu nustatyta, kad *SOX9* ekspresija būdinga Sertolio ląstelėms, buvo teigiama abiejose tirtose sėklidėse ir trijose iš keturių tirtų ruoželinėse gonadose. Kita vertus, teigiama *FOXL2* ekspresija, būdinga grūdėtosioms kiaušidžių ląstelėms, rasta trijose ruoželinėse gonadose (2, 3 lentelės).

Germinacinės ląstelės buvo *C-kit* teigiamos vi-

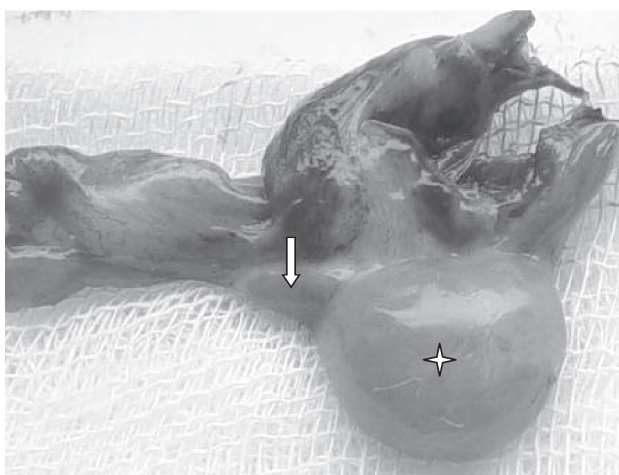
siems pacientams ir *PLAP* teigiamos keturiems. *AMH* ekspresija, kaip ir tikėtasi, rasta visose sėklidėse, bet nė vienoje iš ruoželinėse gonadose.

Chirurginis gydymas

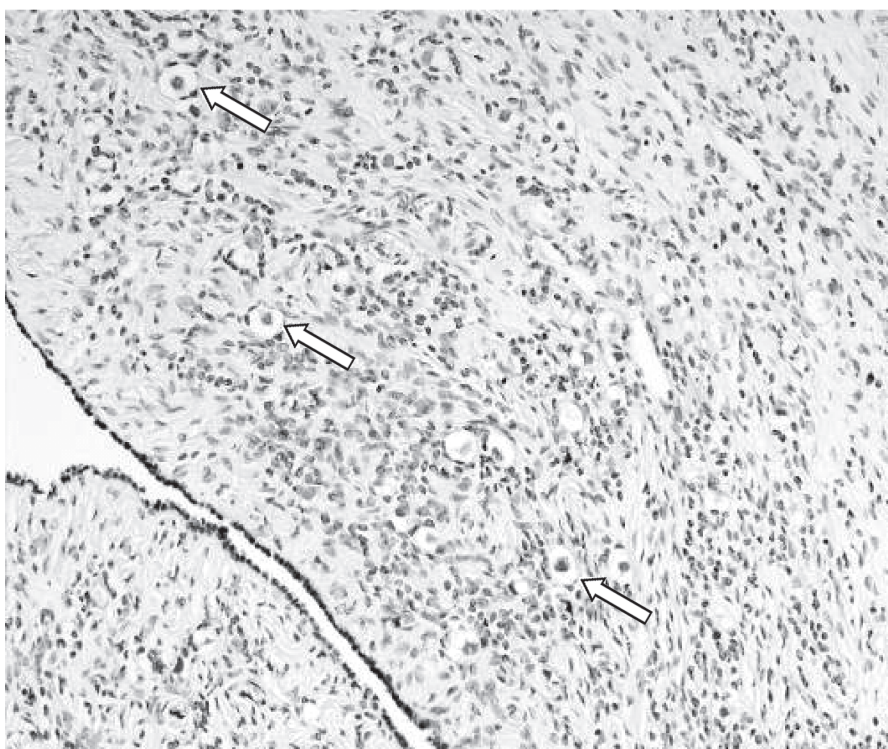
Dviem pacientams (C, N), kuriems tik gimusiems preliminarios diagnozės metu lytis nustatyta nebuvo, vėliau buvo suteikta vyriškoji lytis ir atlikta uretroplastika. Vienam tik gimusiam pacientui (J) diferencijuojant tarp tikrojo hermafroditizmo ir dalinio nejautrumo androgenams, nustatyta vyriškoji lytis. Nuo daugiau įvertinus gonadų histologiją bei patvirtinus MGD diagnozę, vyriškoji lytis buvo palikta, padaryta uretroplastika ir laparoskopiskai pašalinta ruoželinė gonada. Kitiems dviem tik gimusiems pacientams (R, G) buvo nustatyta moteriškoji lytis. Po išsamaus ištyrimo vienam iš šių pacientų (G), atsižvelgiant į gerą testosterono atsaką į stimuliaciją ir akivaizdų varputės padidėjimą iki 3,7 cm po trijų sustanono injekcijų buvo suteikta vyriškoji lytis. Renkantis virilizuojančios genitoplastikos metodą reikia atsižvelgti į kelis veiksnius. Šių pacientų kavernozinių kūnų linkio nepavyksta ištiesinti neperkirpus šlaplės plokštelės. Ją nukirpus ir ištiesinus kavernozinius kūnus, lieka gana ilgas tarpas, kai būtina vamzdelio formos neouretra. Trims pacientams pasirinkome Duckett pasiūlytą metodą, kai distalinė šlaplės dalis formuojama iš tubularizuoto skersinio apyvarpės vidinio lapelio lopo su kraujagysline kolyte (14). Vienam pacientui buvo atlikta Koyanagi-Hayashi uretroplastika, panaudojant kombinuotą šoninį ir apyvarpės vidinio lapelio lopą (15). Po šios operacijos susiformavo uretrokutaninė fistulė, kuriai panaikinti bus reikalinga papildoma operacija.

Kita problema – šiems pacientams išlieka makšties užuomazga, atsiverianti į šlaplę (urogenitalinį sinusą). Į makštį ar šalia jos angos atsiveria ir sėkliniai lataakai, dažniausiai einantys makšties (ir gimdos) sienele. Dėl šių anatominių ypatybių, infekcijai patekus į šlapimo takus, yra didesnė vidinių genitalijų uždegimo ar net orchoepididimito rizika. Ši komplikacija atsirado vienam iš mūsų pacientų, dėl sutrikusio šlapinimosi per neouretrą po uretroplastikos. Skyrus gydymą antibiotikais bei šlaplės išplėtimu pagerinus šlapimo nuosrūvį, uždegimas praėjo ir papildomos operacijos neprisireikė. Ruoželinės gonados kartu su kiaušintakiu ir gimda buvo šalinamos laparoskopiskai, atliekama orchipeksija, pašalinant ir disgenetišką sėklidės priedą, kai jis buvo randamas (2 pav.).

Viena pacientė (R) nuo gimimo auginta mergaite, 10 mėnesių amžiaus atvežta ištyrimui dėl klitorio hipertrofijos. Nesant akivaizdžių moksliskai įrodytų vyriškosios orientacijos pranašumų, bei su tėvais įvertinus socialinę aplinką, psichologines savybes, nutar-



2 pav. Gonadų operacijos metu pašalinta sėklidė (žvaigždutė) ir disgenetiškasis jos priedas (rodyklė)



3 pav. Ruoželinės gonados histologija

Rodyklėmis pažymėti pavieniai besiformuojantys primordialiniai folikulai, apsupti lytinių drūžių ląstelių.

2 lentelė. Genų ekspresija sėklidėje

Pacientas	Amžius, mėn.	SOX9	FOXL2	AMH	AMHr	C-kit	PLAP
R	18	+	–	+	+	+	+
C	1	+	–	+	+	+	+

3 lentelė. Genų ekspresija ruoželinėje gonadoje

Pacientas	Amžius, mėn.	SOX9	FOXL2	AMH	AMHr	C-kit	PLAP
R	18	–	+	–	+	+	+
C	1	+	+	–	+	+	+
N	4	+	+	–	+	+	–
G	3	+	–	–	–	+	+
J	12	Netirta	+	–	+	+	+

ta palikti moteriškąją lytį. Klitorovaginoplastiką planavome atidėti vyresniam amžiui, tikintis po gonadektomijos galimo klitorio sumažėjimo. Tačiau trejų metų mergaitės tėvai pastebėjo psichologines problemas dėl atsirandančių varputės erekcijų. Papildomai ištyrus psichologiškai bei patvirtinus moteriškąją orientaciją, atlikta klitorovaginoplastika. Atliekant šią operaciją, rezekuojami kavernoziniai kūnai, o galvutės kraujotaka ir inervacija išsaugomi. Makštis įeiga ir prieangis suformuojami iš apyvarpės odos ir tarpvietės odos užpakalinio lopo. Kai urogenitalinis sinusas il-

gesnis, atliekama urogenitalinio sinuso mobilizacija (16).

Aptarimas

Lytinės diferenciacijos sutrikimas vis dažniau diagnozuojamas tik gimusiam kūdikiui arba net prenataliai. Lyties nustatymas patikimas specialistų: vaikų urologo, endokrinologo ir ginekologo konsiliumui pagal aiškiai apibrėžtus diagnostikos kriterijus. Daugėjant šios srities žinių, keičiamos klasifikacijos ir siekiama sukurti mažiausiai žalos pacientui galintį sukelti

gydymo algoritmą (16–18). Pasikeitus klasifikacijai, nevartojami senesni hermafroditizmo ir pseudohermafroditizmo terminai, tarplytiškumą (angl. *intersex*) nartata vadinti lytinės diferenciacijos sutrikimu. Tačiau gonadų disgenezės pavadinimas išlieka toks pats. 46,XY formai atskirti nuo 45,XO/46,XY literatūroje kartais vartojamas terminas „dalinė gonadų disgenezė“. Siekiant supaprastinti lytinės diferenciacijos klasifikaciją, manome, kad būtų tikslinga šiuos du terminus sujungti. Žinant, kad ir 46,XY/45,XO mišrios gonadų disgenezės ir 46,XY dalinės gonadų disgenezės atveju randama ir vyriškųjų, ir moteriškųjų gonadų elementų, terminas „mišri“ tiktų labiau.

Kalbama ir apie galimybę chirurgiškai nekoreguoti genitalijų tarplytiškumo vaikams, jei tai nesukelia didelių psichosocialinių problemų. Vertinant operacijų rezultatus, įvairių autorių duomenys yra prieštaringi (16, 19–21). Skirtingose šalyse gimę vaikai susiduria su skirtingais aplinkinių požiūriais bei tradicijomis, todėl absoliučiai vienodų algoritmų taikymas būtų nelogiškas. Netgi nesant lyties diferenciacijos sutrikimo, kartais suaugę žmonės dėl psichologinių priežasčių keičia lytį. Įgimtų lytinės diferenciacijos sutrikimų turintys žmonės, net taikant modernų gydymą, turi didesnę riziką keisti lytį suaugus.

Neaiškios lyties kūdikio gimimas yra būklė, kai būtinas greitas sprendimas, nes ne tik tėvai, bet ir visi artimieji patiria didelį psichologinį stresą. Nustatant tarplytiškumo priežastį, o daugeliu atvejų tai lemia ir lyties pasirinkimą, labai svarbi genetinė lytis, tačiau kariotipas sužinomas ne anksčiau kaip po savaitės. Todėl ginčytinos lyties atvejais nereikėtų pamiršti lytinio chromatino tyrimo ir kuo anksčiau – iki trečiosios gyvenimo dienos iširti testosterono koncentraciją kraujo serume. Esant sėklidėms, šio „mažojo brendimo“ metu testosterono koncentracija serume būna didelė – iki 12 nmol/l. Tarp 4–7 gyvenimo dienos testosterono koncentracijos nustatymas neinformatyvus, nes nesiskiria nuo moteriškųjų normų, kurios nuo amžiaus nepriklauso. Tarp antros gyvenimo savaitės ir keturių mėnesių amžiaus, esant normaliai Leidigo ląstelių funkcijai, testosterono koncentracija vėl padidėja iki 4–14 nmol/l. Vėliau iki pat brendimo pradžios ir berniukams, ir mergaitėms testosterono koncentracija būna minimali – tarp 0,1–0,5 nmol/l (12). Nors literatūroje aprašomais sėklidžių disgenezės ar testosterono sintezės sutrikimo atvejais testosterono koncentracija būna mažesnė, mūsų tirtiems pacientams pradinė testosterono koncentracija, atsižvelgiant į amžių, buvo nesumažėjusi. Normali ar padidėjusi testosterono koncentracija būdinga periferiniam androgenų veikimo (ląstelių androgenų receptorių) sutrikimui (22). Tačiau nė vienam mūsų pacientui

periferinio androgenų veikimo sutrikimo nenustatyta. Be to, šiam sindromui dėl normalaus AMH veikimo nebūdingas kiaušintakių ir gimdos vystymasis. Nenustatėme ir ryškesnio stimuliuoto testosterono koncentracijos sumažėjimo, nors dviejų pacientų koncentracija padidėjo tik apie 1,5 karto, tačiau koncentracijų skirtumas prieš ir po stimuliacijos ≥ 2 nmol/l. Tokie tyrimai būdingi ir T sintezės arba metabolizmo sutrikimui, bet tuomet kiaušintakių ir gimdos neturėtų būti. Esant sėklidžių disgenезei, dažniausiai padidėja abiejų gonadotropinų koncentracija, bet mes nustatėme tik LH padidėjimą. Pacientų FSH atitiko amžiaus normas. Tai galėtų būti dėl jauno pacientų amžiaus, kol yra mažiau pakitęs germinacinis epitelis ir Sertolio ląstelės, sekretuojančios inhibiną B, kuris atgalinio neigiamo ryšio principu slopina FSH sekreciją.

Pakankama testosterono koncentracija bei atsakas į ŽCG stimuliaciją tradiciškai laikomas vienu pagrindinių veiksnių, lemiančių vyriškąją lytinę orientaciją (12, 13). Skiriant gydymą sustanonu, visų mūsų pacientų lytiniai gumburėliai padidėjo, o tai rodo gerą periferinį androgenų veikimą. Todėl galima prognozuoti, jog šių pacientų lytinio brendimo laikotarpiu testosterono preparatai bus veiksmingi skatinant antirinių lyties požymių vystymąsi ir palaikymą, jei to prireiks mažėjant endogeninei testosterono sekrecijai. O prasidėjus savaiminiam lytiniam brendimui, būtinas sistemingas testosterono ir gonadotropinų koncentracijų tyrimas, net jei paliekama sėklidė, nes ji visais atvejais būna daugiau ar mažiau disgenetiška.

Ankstyvas MGD identifikavimas yra labai svarbus dėl keleto priežasčių. Nustatyta, kad 17–50 proc. MGD pacientų išsivysto germinacinių ląstelių navikai, dažniausiai gonadoblastoma (23, 24). Kai kurių autorių duomenimis, *Ca in situ*, arba kitaip dar vadinamos intratubulinės neoplazijos ląstelės, randamos visiems vaikams, kuriems nustatyta 46,XY gonadų disgenezė, be to, pastebėtas tiesioginis ryšys su gonadotropinų koncentracija (25). Tolesnis šių ląstelių likimas nėra visai aiškus, kaip neaiškūs gonadas koreguojančių ir nuleidžiančių operacijų pirmaisiais gyvenimo metais vėlyvieji rezultatai. *Ca in situ* ląstelėms išlikus po brendimo, neabejotinas germinacinių ląstelių naviko vystymasis. Todėl, jei paliekama moteriškoji lytis, abipusę gonadektomiją reikėtų atlikti kuo anksčiau ne tik siekiant išvengti virilizacijos, bet ir dėl supiktybėjimo pavojaus. Kai pasirenkama vyriškoji lytis, reikėtų pašalinti ruoželinę gonadą ir sėklidės ruoželinį priedą. Sėklidės palikimas turi svarų pagrindą, nes tuomet įmanomas savaiminis lytinis brendimas. Žinant, jog piktybinių pokyčių dažniausiai atsiranda prasidėjus brendimui, vyresniame amžiuje sėklidė turi būti gerai čiupiama kapšelyje, ir pats

pacientas turi būti apmokytas ją čiupti. Tikslinga atlikti sėklidės biopsiją paauglystėje. Radus Ca *in situ* ląstelių, prasidėjus brendimui, būtų indikacija orchektomijai ir pakaitinei terapijai androgenais.

MGD nereikėtų painioti su tikroju hermafroditizmu, naujoje klasifikacijoje vadinamu ovotestikuliniu lytinės diferenciacijos sutrikimu, kai randamas normalios kiaušidės audinys vienoje arba abiejose pusėse. Tuomet kiaušidės audinys būna visavertis, jei gimda gerai išsivysčiusi, suteikusi moterišką lytį, įmanomas vaisingumas ir nėštumas. Įvairaus laipsnio sėklidžių dizgenezė būdinga abiem šiems sutrikimams (26). Esant MGD, histologinis ruoželinis gonadų vaizdas aiškiai skiriasi nuo normalios kiaušidės ir nuo ovotestikulinio kiaušidės audinio struktūros su gausiais primordialiniais folikulai. Ruoželinėje gonadoje vietoje dauginių primordialinių folikulų, randamos nesubrendusios germinacinės ląstelės, apsuptos embrioninės gonados lytinių drūžių ląstelių, sudarančių netaisyklingas struktūras, kartais primenančias primordialinius folikulus. Tačiau teigiama *FOXL2* ekspresija bei *AMH* ekspresijos nebuvimas būdingi normaliai kiaušidei ir visiškai skirtingi nuo sėklidės, kurioje nerandama *FOXL2*.

Įdomu tai, kad *SOX9* ekspresija ruoželinėje gonadoje buvo teigiama tirtiems 1–4 gyvenimo mėnesiais ir neigiama 18 mėnesių amžiaus tirtai pacientei (R). Kita vertus, teigiama *FOXL2* ekspresija, būdinga granuliozinėms kiaušidžių ląstelėms, rasta šiai vyresnei pacientei ir dar dviejose ruoželinėse gonadose (N, C). Taigi, sėklidžių imunohistochemija būdinga šiam amžiui, o ruoželinėse gonadose nustatyta mišri ekspresija, kurią nustatė ir kiti autoriai (6). To paties paciento

sėklidės ir ruoželinės gonados genų ekspresija buvo skirtinga. Radus tokį radinį, galima galvoti apie skirtingą gonadų tumorigenezės potencialą. Dažniausias gonadų navikas MGD atveju, vaikams subrendus, yra gonadoblastoma, kurios aplinkoje randama *FOXL2* ekspresija. Pašalinus visas ruoželinei gonadai būdingas struktūras (su *FOXL2* ekspresija), galima tikėtis mažesnės gonadoblastomos rizikos. Šias prielaidas reikėtų patikrinti didesnėje pacientų grupėje.

Mišri gonadų dizgenezė, ypač esant 46,XY kariotipui, yra labai reta anomalija. Iki šiol visi vaikai, kuriems buvo diagnozuotos ar įtartos sudėtingos endokrinopatijos, buvo tiriami ir gydomi Kauno medicinos universiteto klinikų Vaikų endokrinologijos skyriuje. Todėl, įvertinus gimstamumą 2002–2006 m., galima apytiksliai apskaičiuoti, kad 46,XY MGD naujų atvejų dažnis Lietuvoje yra 1/30000 naujagimių.

Išvados

Įvertinus gonadų histologijos ir vidinės genitalijų struktūros tyrimus, 46,XY MGD reikia skirti nuo ovotestikulinio ir kitų 46,XY lytinės diferenciacijos sutrikimų. Didelė testosterono koncentracija po žCG stimuliacijos ir geras atsakas į gydymą testosteronu turi padėti parenkant vyrišką lytį. Testikulinės ir ruoželinės gonadų dalių genų ekspresija skiriasi: ruoželinėje gonadoje vyrauja *FOXL2* geno ekspresija. Rekomenduojamas ankstyvas ruoželinis gonadų pašalinimas ir nuleistų sėklidžių biopsija iki paciento lytinės brandos. Genitalijų chirurgija pirmaisiais gyvenimo metais techniškai ir psichologiškai parankesnė, siekiant gero kosmetinio rezultato ir geresnės paciento psichosocialinės adaptacijos.

Diagnosis and management of 46,XY mixed gonadal dysgenesis and disorder of sexual differentiation

Gilvydas Verkauskas, Diana Mačianskytė, Dainius Jančiauskas¹, Romualdas Tomas Preikša², Rasa Verkauskienė², Francis Jaubert³

Department of Pediatric Surgery, ¹Department of Pathological Anatomy,

²Unit of Pediatric Endocrinology, Department of Endocrinology, Kaunas University of Medicine, Lithuania,

³Department of Pathology, Necker Children Hospital, Paris Descartes University, France

Key words: disorder of sexual differentiation; gonadal dysgenesis; streak gonad.

Summary. Objective. We present our experience in diagnosing, gender assignment, and surgical management of sexual ambiguity in 46,XY mixed gonadal dysgenesis.

Material and methods. A retrospective study of five cases treated from 2003 to 2006 was performed. Clinical picture, operative findings, testosterone levels, and immunohistochemistry of gonads for the expression of *FOXL2*, *SOX9*, *AMH*, *AMHr*, *C-kit*, and *PLAP* were analyzed.

Results. All patients had ambiguous genitalia, urogenital sinus, uterus, testicle on one side, and a streak gonad on the other. Four patients were reared as male and one as female. Stimulation by human chorionic gonadotropin showed good penile size and testosterone response. All patients underwent laparoscopic gonadal biopsy and/or gonadectomy. Histological studies showed the presence of sparse primordial follicles surrounded

by embryonic sex cords in the streak portion of gonads. Germ cells were *C-kit* positive in all and *PLAP* positive in four patients. *FOXL2* expression was detected in four streak gonads and in none of testes. *AMH* expression was found only in testes. *SOX9* expression was found in both investigated testes and in three out of four streak gonads investigated.

Conclusions. 46,XY mixed gonadal dysgenesis should be differentiated from ovotesticular and other types of 46,XY disorders of sexual differentiation by the typical gonadal histology and internal genital structure. High testosterone level after stimulation and good response to testosterone treatment in 46,XY mixed gonadal dysgenesis could orient toward male sex assignment. There are different patterns of gene expression in testicular and streak gonads with a switch to *FOXL2* positivity in streak gonads. Early gonadal and genital surgery is recommended.

Correspondence to G. Verkauskas, Department of Pediatric Surgery, Kaunas University of Medicine, Eivenių 2, 50009 Kaunas, Lithuania. E-mail: gilvydas.verkauskas@kmuk.lt

Literatūra

1. Fechner PY, Marcantonio SM, Ogata T, Rosales TO, Smith KD, Goodfellow PN, et al. Report of a kindred with X-linked (or autosomal dominant sex-limited) 46,XY partial gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(5):1248-53.
2. Dumic M, Lin-Su K, Leibel NI, Ciglar S, Vinci G, Lasan R, et al. Report of fertility in a woman with a predominantly 46,XY karyotype in a family with multiple disorders of sexual development. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(1):182-9.
3. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994;372(6506):525-30.
4. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001;28(3):216-17.
5. Josso N, Belville C, di Clemente N, Picard JY. AMH and AMH receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome. *Hum Reprod Update* 2005;11(4):351-56.
6. Hersmus R, Kalfa N, B de Leeuw, Stoop H, Oosterhuis J, R de Krijger, et al. FOXL2 and SOX9 as parameters of female and male gonadal differentiation in patients with various forms of disorders of sex development (DSD). *J Pathol* 2008;215(1):31-8.
7. Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T, et al. Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet* 2007;16(23):2795-04.
8. Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 2007;67(3):142-51.
9. Hoei-Hansen CE, Kraggerud SM, Abeler VM, Kaern J, Rajpert-De Meyts E, Lothe RA. Ovarian dysgerminomas are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer* 2007;6:12.
10. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3836-44.
11. Rooney DE, Czepulkowski BH. Human cytogenetics: essential data. London: John Wiley & Sons; 1995.
12. Grant DB, Laurance BM, Atherden SM, Ryness J. HCG stimulation test in children with abnormal sexual development. *Arch Dis Child* 1976;51(8):596-601.
13. Honour JW, Savage MO. Endocrine function of the testis. In: Ranke MB, editor. *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents*. Basel: Karger; 2003. p. 339-55.
14. Duckett JW Jr. Transverse preputial island flap technique for repair of severe hypospadias. *Urol Clin North Am* 1980;7(2):423-30.
15. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kohri K. The modified Koyanagi repair for severe proximal hypospadias. *BJU Int* 2001;87(3):235-38.
16. Rink RC, Metcalfe PD, Cain MP, Meldrum KK, Kaefer MA, Casale AJ. Use of the mobilized sinus with total urogenital mobilization. *J Urol* 2006;176(5):2205-11.
17. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex*. *Pediatrics* 2006;118(2):488-500.
18. Zaparackaitė I, Barauskas V. I gimtos lytinių organų anomalijos. Diagnostikos ir gydymo aspektai. (Congenital genital anomalies. Aspects of diagnostics and treatment.) *Medicina (Kaunas)* 2003;39(2):105-13.
19. Houk CP, Dayner J, Lee PA. Genital ambiguity with a Y chromosome: does gender assignment matter? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17(6):825-39.
20. Lean WL, Deshpande A, Hutson J, Grover SR. Cosmetic and anatomic outcomes after feminizing surgery for ambiguous genitalia. *J Pediatr Surg* 2005;40(12):1856-60.
21. Nihoul-Fekete C. Does surgical genitoplasty affect gender identity in the intersex infant? *Horm Res* 2005;64(Suppl 2):23-6.
22. Ng KL, Ahmed SF, Hughes IA. Pituitary-gonadal axis in male undermasculinisation. *Arch Dis Child* 2000;82(1):54-8.
23. Nonomura N, Nakamura M, Namiki M, Kiyohara H, Mizutani S, Okuyama A, et al. Mixed gonadal dysgenesis: case reports and a review of 65 Japanese cases. *Arch Androl* 1991;26(1):15-9.
24. Wallace TM, Levin HS. Mixed gonadal dysgenesis. A review of 15 patients reporting single cases of malignant intratubular germ cell neoplasia of the testis, endometrial adenocarcinoma, and a complex vascular anomaly. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114(7):679-88.
25. Slowikowska-Hilczner J, Szarras-Czapnik M, Kula K. Testicular pathology in 46,XY dysgenetic male pseudohermaphroditism: an approach to pathogenesis of testis cancer. *J Androl* 2001;22(5):781-92.
26. Verkauskas G, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Malan V, Thibaud E, Nihoul-Fekete C. The long-term followup of 33 cases of true hermaphroditism: a 40-year experience with conservative gonadal surgery. *J Urol* 2007;177(2):726-31.

Straipsnis gautas 2008 05 15, priimtas 2009 05 05
Received 15 May 2008, accepted 5 May 2009