

# Frymartynizm u bydła – opis przypadku

Kacper Libera, Izabela Szczerbal

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Pierwsze przypadki nieplodnych jałówek pochodzących z różnopłciowych ciąży bliźniaczych opisywane były już w czasach Imperium Rzymskiego przez historyka Marka Terencjusza Warrona, który żył na przełomie II i I w. p. n. e. (1). Dopiero na początku XX wieku, w 1911 r. Tandler i Keller jako pierwsi wyjaśnili podłoże tego zjawiska, kilka lat później niezależnie do tych samych wniosków doszedł amerykański biolog Lillie (2). Etymologia słowa „frymartynizm” nie jest do końca wyjaśniona. Jedna z hipotez zakłada, że przedrostek „free” oznacza „gotowy do działania, do pracy”, ponieważ frymartyny były, podobnie jak woły, bardzo użyteczne do ciężkiej pracy, natomiast słowo „martin” wywodzi się prawdopodobnie od irlandzkiego lub celtyckiego słowa „mart” oznaczającego krowę lub jałówkę (3).

Frymartynizm jest najczęstszą formą zaburzeń rozwoju płci u bydła (disorders of sex development, DSD; 4). Definiowany jest jako urodzenie bezpłodnej jałówki z niedorozwiniętymi narządami płciowymi pochodzącej z różnopłciowej ciąży bliźniaczej. Etiologia tej choroby związana jest obecnością połączeń tętniczo-żylnych (anastomoz) pomiędzy krwioobiegami bliźniąt i w konsekwencji możliwością wymiany substancji i komórek pomiędzy organizmami płodów (4). Wykazano, że podczas rozwoju prenatalnego do różnicowania płodu w kierunku płci męskiej dochodzi około 8–42 dnia ciąży (5), natomiast różnicowanie płodu w kierunku płci żeńskiej rozpoczyna się około 70 dnia ciąży (6). Wcześniejszy rozwój płci męskiej niż żeńskiej sprawia, że w sytuacji kiedy dojdzie do powstawania połączeń między krwioobiegami różnopłciowych bliźniąt, czynniki hormonalne obecnych we krwiobiegu płodu płci męskiej przenikają do krwiobiegu bliźniaka płci żeńskiej i powodują jego nieodwracalną maskulinizację, a w konsekwencji bezpłodność. Cytogenetycznym dowodem zajścia połączeń naczyń krwionośnych między różnopłciowymi bliźniakami jest chimeryzm leukocytarny (XX/XY). Co ciekawe, literatura podaje, że nie ma korelacji między procentowym udziałem męskiej linii komórkowej, a stopniem maskulinizacji frymartyny (7). Stwierdzenie choć jednej metafazy z męskim kariotypem pozwala na stwierdzenie chimeryzmu leukocytarnego i tym samym potwierdzenie frymartynizmu.

## Konsekwencje ciąży bliźniaczych

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się wzrost odsetka ciąży bliźniaczych u bydła. Według Silvia del Rio (8) wynosi on około 3% dla rasy holsztyńsko-fryzyskiej. Niektórzy autorzy wiążą ten fakt ze wzrastającą wydajnością mleczną oraz związaną z tym intensyfikacją procesów metabolicznych (9). Tę tezę potwierdzają wyniki obserwacji przeprowadzonych w krajowym ośrodku hodowlanym, gdzie na przestrzeni lat

## Freemartinism in cattle – a case report

Libera K., Szczerbal I., Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences

Freemartinism, a disorder of sex development (DSD), is an important problem in cattle breeding. The aim of this paper was to describe a new case of freemartinism in cattle, diagnosed by cytogenetic and molecular techniques. 13-months old Holstein-Friesian heifer was subjected to clinical and genetic examination due to abnormal external genitalia. Physical examination revealed short distance between anus and *comissura labiorum dorsalis*, presence of prominent tuft of hair in *comissura labiorum ventralis*, shortened vagina and hypoplastic uterus. Blood, skin and hair samples were collected for further genetic analyses. Levels of estradiol and progesterone were determined by a commercial radioimmunoassay. Analysis of cytogenetic preparations from lymphocytes culture has revealed two cell lines – 60,XX and 60,XY, whereas in preparations from fibroblasts culture only one cell line – 60,XX was found. Molecular analysis of the Y-specific gene (SRY), has confirmed presence of Y chromosome in blood samples and no SRY sequence was found in skin samples. Based on these results the case was classified as a freemartin. Concentrations of estradiol and progesterone were lower than in healthy heifers, which is common finding in freemartins, and were as high as 7.08pg/ml and < 0.2ng/ml, respectively. It is assumed that application of different approaches (cytogenetic, molecular and endocrinological), allows a detailed description of freemartin cases in cattle.

**Keywords:** freemartinism, DSD, cattle, infertility, leukocyte chimerism.

2005–2013 wzrostowi wydajności mlecznej z 9708 kg do 11 459 kg towarzyszył wzrost odsetka ciąży bliźniaczych z 2,91 do 5% (10). Cięższe bliźniacze u bydła są zjawiskiem niepożądanym, ponieważ zaobserwowano zwiększone ryzyko wczesnego zamierania zarodków, poronień, zatrzymania łożyska, *metritis*, przemieszczenia trawieńca oraz ketozy w porównaniu do krów rodzących jedno cielę (11). Badania potwierdzają również opóźniony powrót do fizjologicznego cyklu jajnikowego po porodzie (12). Wiadomo, że w ponad 90% ciąży bliźniaczych dochodzi do wytworzenia anastomoz (13), zatem problem związany z frymartynizmem będzie wzrastał i konieczna wydaje się wczesna diagnostyka tego zaburzenia, ponieważ zwierzęta te są bezpłodne i nie nadają się do remontu stada. Co więcej, w literaturze opisano również przypadki, gdy rodziła się pojedyncza jałówka, u której po osiągnięciu dojrzałości hodowlanej występowały problemy z zajściem w ciążę. Późniejsze badania ujawniły zmiany narządów płciowych charakterystyczne dla frymartynizmu, a badania genetyczne potwierdzały chimeryzm leukocytarny oraz obecność genu SRY w komórkach krwi. Tłumaczono ten fakt tym, że prawdopodobnie na początku ciąży występował bliźniak płci męskiej, który obumarł i uległ resorpcji, lecz zdążyła się u niego rozwinąć płeć męska i tym samym dzięki obecności

anastomoz przekazał czynniki hormonalne swojej siostrze powodując jej maskulinizację (10).

Biorąc pod uwagę wzrastający odsetek cięż bliźniaczych, problem frymartynizmu będzie zyskiwał na znaczeniu w chowie i hodowli bydła, a więc konieczne wydaje się nieustanne poszukiwanie nowych, czulszych metod diagnostyki genetycznej tego schorzenia (14).

### Opis przypadku

Badana 13-miesięczna jałówka pochodziła z gospodarstwa zlokalizowanego we wschodniej części województwa wielkopolskiego utrzymującego około 100 sztuk bydła, z czego 50 krów dojnych. Średnia wydajność mleczna dla stada wynosiła około 8700 litrów na rok. Z danych zebranych podczas wywiadu wynikało, że jałówka pochodziła z różnopłciowej ciąży bliźniaczej. Poród odbył się z niewielką pomocą człowieka. W przeszłości podczas odchowu zwierzę nie przeszło żadnego zakażenia ani urazu, który mógłby mieć wpływ na wynik badania klinicznego. Według relacji hodowcy

zwierzę wykazywało ruje oraz w porównaniu do rówieśnic wykazywało wyższą aktywnością ruchową oraz zainteresowaniem człowiekiem, lecz były to jedynie subiektywne obserwacje.

Podczas oględzin zewnętrznych narządów płciowych stwierdzono obecność charakterystycznej kępki włosów w dolnym spoidle warg sromowych oraz zmniejszoną odległość między odbytem a dogrzbiętowym spoidłem warg sromowych w porównaniu do rówieśnic pochodzących z ciąży pojedynczych (ryc. 1). Zaobserwowano również zmienione ukątowanie warg sromowych względem płaszczyzny krocza. U jałówki podejrzanej o frymartynizm płaszczyzna warg sromowych oraz płaszczyzna krocza tworzyły kąt ostry, natomiast u zdrowej jałówki – rówieśnicy wargi sromowe oraz płaszczyzna krocza były równoległe. Wszystkie stwierdzone zmiany fenotypowe odpowiadają obrazowi klinicznemu frymartynizmu (7). Ponadto dane literaturowe podają, że u frymartyn można zaobserwować znacznie powiększoną łechtaczkę i zmianę sposobu oddawania moczu (7).

Podczas badania *per rectum* stwierdzono niedorozwiniętą macicę oraz dokonano pomiaru długości pochwy. W handlu dostępne są przeznaczone do tego sondy dopochwowe w celu szybkiej diagnostyki frymartynizmu poprzez obecność silnie skróconej pochwy u cieląt (Freemartin probe; 15), lecz wielu autorów sugerowało, że w tym celu można również wykorzystać kateter domaciczny. W opisywanym przypadku długość pochwy wynosiła ok. 8 cm, w porównaniu z 20 cm u zdrowej rówieśniczki, co jest zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Wilkesa i wsp. (16), którzy stwierdzili, że u dorosłych frymartyn długość pochwy wynosi od 8 do 10 cm, natomiast u zdrowych jałówek do 30 cm.

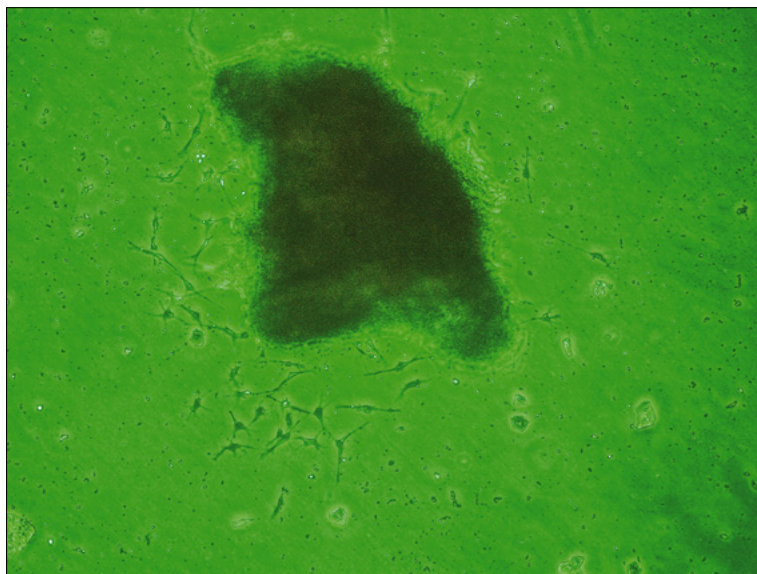
Podczas badania klinicznego pobrano próbki krwi, fragment skóry z małżowiny usznej oraz kępkę włosów z cebulkami włosowymi do dalszych analiz genetycznych i endokrynologicznych.

### Analiza cytogenetyczna

Kilka godzin po pobraniu próbek równoległe założone zostały hodowle komórkowe z limfocytów z krwi obwodowej oraz fibroblastów skóry. Hodowle limfocytów prowadzono w przeznaczonych do tego butelkach hodowlanych z filtrem antybakteryjnym. Użyte zostało podłoże RPMI z dodatkiem surowicy płodowej bydlęcej, antybiotyku (penicylina/streptomycyna) i fazeoliny, jako stymulatora podziałów komórkowych. Hodowle komórkowe inkubowane były przez 48 h w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Hodowla fibroblastów założona została na szalkach Petriego na pożywce DMEM z dodatkiem surowicy płodowej bydlęcej i antybiotyku (penicylina/streptomycyna). Już po 4 dniach od założenia hodowli fibroblasty zaczęły migrować z fragmentu skóry i się namnażać (ryc. 2). Inkubacja przebiegała w tej samej temperaturze oraz atmosferze i trwała 14 dni, aby uzyskać odpowiednią liczbę komórek do wykonania preparatów chromosomowych. Po okresie inkubacji do hodowli komórkowych dodana została kolchicyna, aby zatrzymać podziały komórkowe w stadium metafazy, gdy chromosomy są najbardziej skondensowane i możliwe do oceny.

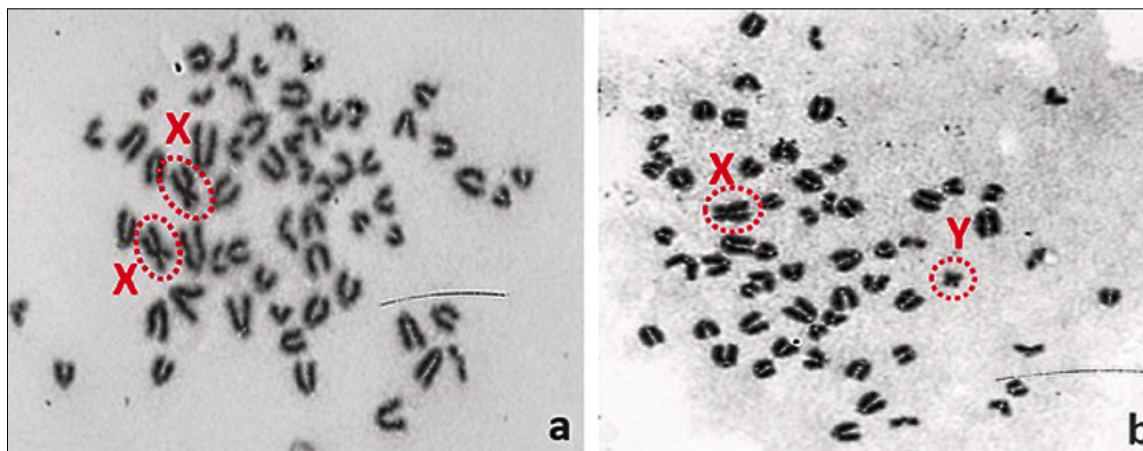


Ryc. 1. Zewnętrzne narządy płciowe jałówki podejrzanej o frymartynizm (a) oraz zdrowej jałówki w podobnym wieku (b). U frymartynki widoczne są charakterystyczne kępki włosów w dołku między wargami sromowymi oraz zmniejszona odległość między odbytem a sromem



Ryc. 2. Przykładowe zdjęcie obrazujące wyprowadzenie hodowli fibroblastów uzyskanej z fragmentu skóry pobranego od badanej frymartynki. Widoczne są komórki o wrzecionowatym kształcie – fibroblasty w 4 dniu hodowli komórkowej





**Ryc. 3.**  
Przykładowe płytki metafazowe pozyskane z hodowli limfocytów – 60,XX (a) i 60,XY (b)

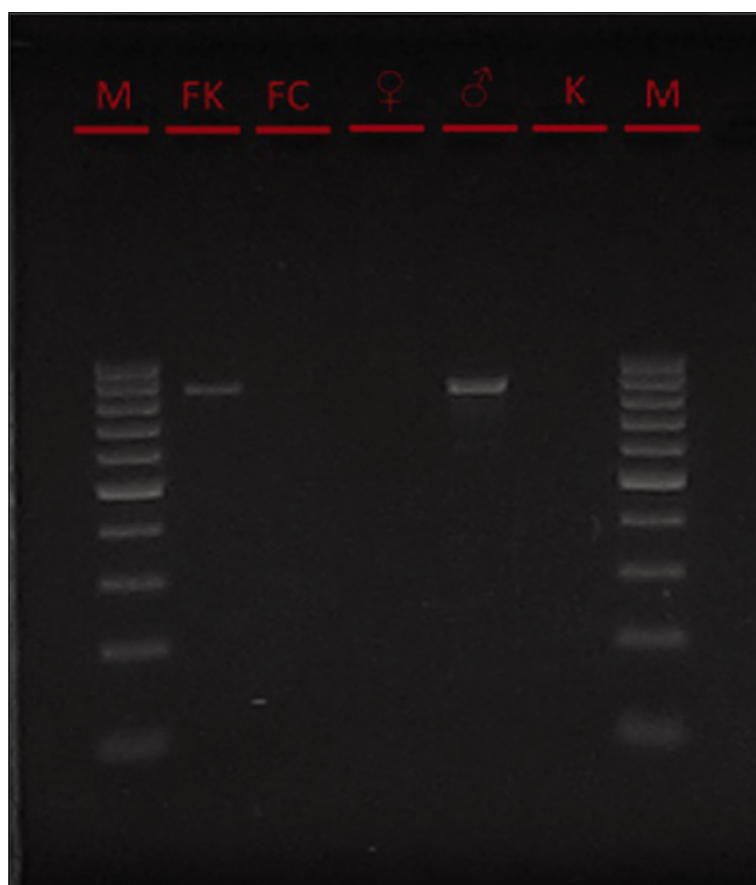
Z każdej hodowli komórkowej przeanalizowano po 100 płytek metafazowych przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon E600 Eclipse z kamerą (powiększenie obiektywu 40× i 100× z imersją). W przypadku preparatów cytogenetycznych pochodzących z hodowli limfocytów wykazano obecność 12 płytek metafazowych 60,XY i 88 płytek 60,XX (ryc. 3). Natomiast w przypadku preparatów pochodzących z fibroblastów występowała tylko jedna linia komórkowa 60,XX. Przeprowadzone obserwacje pozwoliły na stwierdzenie, że u badanej jałówki występuje chimeryzm leukocytarny, czyli obecności dwóch linii komórkowych (XX i XY) w komórkach krwi obwodowej. Co więcej, mając do dyspozycji wspomniane dwa rodzaje tkanek do badań, można odróżnić chimeryzm leukocytarny od chimeryzmu ogólnoustrojowego. W pierwszym przypadku męska linia komórkowa będzie występować wyłącznie w komórkach krwi, natomiast gdy mamy do czynienia z chimeryzmem ogólnoustrojowym, dwie linie komórkowe (męska oraz żeńska) obecne będą w obydwu tkankach. Dzięki tej informacji można ustalić płeć chromosomalną badanego osobnika.

### Analiza molekularna

W celu dokładnego sprawdzenia, czy mamy do czynienia z przypadkiem frymartynizmu, wskazane jest wykonanie analiz molekularnych. W tym celu stosuje się identyfikację w komórkach krwi genów występujących wyłącznie na chromosomie Y (17). W omawianym przypadku został wykorzystany gen *SRY*, który jest obecny tylko w chromosomie Y i koduje czynnik determinacji płci męskiej. Wykorzystując technikę PCR oraz elektroforezę na żelu agarozowym, w omawianym przypadku potwierdzono obecność linii XY w komórkach krwi. Jednocześnie nie wykazano obecności tego genu w innych strukturach ciała, tj. cebulkach włosowych, co potwierdza fakt, że męska linia komórkowa występuje wyłącznie w leukocytach (ryc. 4).

### Badania endokrynologiczne

W przypadku frymartynizmu można zaobserwować zmniejszone stężenie estrogenów i progesteronu w porównaniu do zdrowych jałówek, lecz nie są to zmiany specyficzne wyłącznie dla tej nieprawidłowości, ponieważ obniżone stężenia wymienionych hormonów



**Ryc. 4.** Wynik rozdzielania elektroforetycznego po wykonaniu PCR w celu identyfikacji genu *SRY*. M – marker długości, FK – frymartynka krew, FC – frymartynka cebulki włosowe, ♀ – referencyjna samica, ♂ – referencyjny samiec, K – kontrola negatywna (bez DNA). W ścieżce dla FK obecny jest prążek, który jest zdecydowanie słabszy niż w ścieżce dla ♂, co może potwierdzać 12% udział linii męskiej w komórkach krwi. Brak prążka dla ścieżki FC wyklucza obecność chimeryzmu ogólnoustrojowego

występują również w przebiegu innych form DSD (18). Poziom testosteronu nie różni się u frymartyn i u zdrowych jałówek (19). W omawianym przypadku wykonane zostały oznaczenia estradiolu oraz progesteronu. Badania wykonane były w komercyjnym laboratorium weterynaryjnym. Stężenie estradiolu wynosiło 7,08 pg/ml, natomiast progesteronu poniżej 0,2 ng/ml. Stężenie progesteronu jest zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Sabę i wsp. (20), ponieważ stwierdził on, że stężenie progesteronu u frymartyn nie przekracza 0,4 ng/ml (20).

## Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wzrastający odsetek cięż bliźniaczych u bydła, wydaje się, że frymartynizm może być istotnym problemem w chowie i hodowli tego gatunku zwierząt. Dlatego każda jałówka pochodząca z różnopłciowej ciąży bliźniaczej powinna zostać przebadana przez lekarza weterynarii, a w razie wątpliwości należy wykonać badania cytogenetyczne lub molekularne. Opisywana nieprawidłowość występuje w przebiegu ponad 90% ciąży bliźniaczych, a więc istnieje możliwość, że urodzona jałówka nie jest frymartyną, co może mieć szczególne znaczenie w przypadku potomstwa od zwierząt wybitnych pod względem hodowlanym. Frymartynizm można również podejrzewać u jałówek, które mają problem z zacieleniem i pochodzą z ciąży pojedynczych, ponieważ w literaturze opisano przypadki, gdy w przebiegu ciąży doszło do maskulinizacji jałówki, w wyniku obecności męskiego współbliźniaka, który później obumarł i został zresorbowany, co skutkowało porodem pojedynczym. Wszystkie zdiagnozowane frymartyny powinny być brakowane, ponieważ są bezpłodne i nie nadają się do remontu stada.

## Piśmiennictwo

- Kuszevska K.: Hodowla bydła w starożytnym Rzymie. *Collectanea Philologica*. 2013, **16**, 115–123.
- Freeman G.: Explaining the freemartin: tandler and keller vs. lillie and the question of priority. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 2007, **308B**, 105–112.
- American Heritage® Dictionary of the English Language, Fifth Edition. Copyright© 2016 by Houghton Mifflin Harcourt Publishing Company.
- Parma P., Veyrunes F., Pailhoux E.: Sex Reversal in Non-Human Placental Mammals. *Sex Dev.* 2016, **10**, 326–344.
- Ruvinsky A., Spicer L.: Developmental genetics: Sex determination and differentiation. W: *The Genetics of Cattle*. Wallingford: CABI Publishing and CAB International. 1999, 456–461.
- Jost A., Vigier B., Prepin J.: Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 1972, **29**, 349–379
- Esteves A., Băge R., Payan-Carreira R.: Freemartinism in Cattle. W: *Ruminants: Anatomy, Behavior and Diseases Freemartinism in Cattle*. Nova Science Publishers Inc, Editors: Ricardo Evandro Marques. 2012, 99–120
- Silva del Río N., Kirkpatrick B., Fricke P.: Observed frequency of monozygotic twinning in Holstein dairy cattle. *Theriogenology*. 2006, **66**, 1292–1299.
- Fricke P., Wiltbank M.: Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*. 1999, **52**, 1133–1143.
- Szczerbal I., Kociucka B., Nowacka-Woszuk J., Lach Z., Jaskowski J., Switonski M.: A high incidence of leukocyte chimerism (60,XX/60,XY) in single born heifers culled due to underdevelopment of internal reproductive. *Czech J. Anim. Sci.* 2014, **59**, 445–449.
- Cobanoğlu O.: Twinning in Cattle: Desirable or Undesirable? *J. Biol. Environ. Sci.* 2010, **4**, 1–8.
- Andreu-Vázquez C., Garcia-Ispuerto I., Ganau S., Fricke P., López-Gatius F.: Effects of twinning on the subsequent reproductive performance and productive lifespan of high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 2012, **78**, 2061–2070.
- Zhang T., Buoen L., Seguin B., Ruth G., Weber A.: Diagnosis of freemartinism in cattle: the need for clinical and cytogenetic evaluation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, **204**, 1672–1675.
- Qiu Q., Shao T., He Y., Muhammad A., Cao B., Su H.: Applying real-time quantitative PCR to diagnosis of freemartin in Holstein cattle by quantifying SRY gene: a comparison experiment. *PeerJ*. 2018, **6**, 4616.
- Khan M., Foley G.: Retrospective studies on the measurements, karyotyping and pathology of reproductive organs of bovine freemartins. *J. Comp. Pathol.* 1994, **110**, 25–36.
- Wilkes P., Wijeratne W., Munro I.: Reproductive anatomy and cytogenetics of freemartin heifers. *Vet. Rec.* 1981, **108**, 349–353.
- Cheng H., Shi H., Zhou R., Guo Y., Liu L., Liu J., Jiang Y., Kudo T., Sutou S.: Characterization of Bovidae sex-determining gene SRY. *Gen. Sel. Evol.* 2001, **33**, 687.
- Satoh S., Hirata T., Miyake Y., Kaneda Y.: The possibility of early estimation for fertility in bovine heterosexual twin females. *J. Vet. Med. Sci.* 1997, **59**, 221–222.
- Cavaliere J., Farin P.: Birth of a Holstein freemartin calf co-twinning to a schistosomus reflexus fetus. *Theriogenology*. 1999, **52**, 815–826.
- Saba N., Cunningham N., Millar P.: Plasma progesterone, androstenedione and testosterone concentrations in freemartin heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1975, **45**, 37–45.

Dr hab. Izabela Szczerbal,  
e-mail: izabela.szczerbal@up.poznan.pl