

# Ocena ekspresji genów z grupy HOXA w endometrium kobiet z endometriozą

## *Evaluation of HOXA group gene expression in endometrium of women with endometriosis*

Małgorzata Szczepańska, Przemysław Wirstlein, Jana Skrzypczak

Klinika Rozrodczości, Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Jana Skrzypczak

Przeгляд Menopauzalny 2007; 5: 266–271

### Streszczenie

Przyczyna niepłodności u kobiet z endometriozą nie została do końca wyjaśniona. Geny HOXA-10 i HOXA-11 są członkami podklasy genów homeobox. Ich ekspresja w gruczołach oraz podścielisku endometrium jest obserwowana w ciągu całego cyklu, natężenie ekspresji wzrasta maksymalnie w okresie okna implantacyjnego.

**Cel pracy:** Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy zaburzona ekspresja genów z rodziny HOXA jako markera receptywności w endometrium może mieć znaczenie w etiopatogenezie niepłodności u kobiet z endometriozą.

**Materiał i metody:** Materiał biologiczny stanowiło endometrium uzyskane od 13 chorych z endometriozą, 10 pacjentek z niepłodnością idiopatyczną oraz 17 kobiet z grupy kontrolnej. Wszystkie pacjentki były operowane w okresie tzw. okna implantacyjnego, tzn. 7–9 dni po owulacji. Biopsje endometrium wykonywano za pomocą pipelli lub podczas zabiegu histeroskopii. Ekspresję poszczególnych genów oznaczono przy użyciu metody PCR z użyciem odwrotnej transkryptazy (ang. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* – RT-PCR).

**Wyniki:** W endometrium kobiet z endometriozą stwierdzono niższą ekspresję genów HOXA-10 i HOXA-11 zarówno w stosunku do kobiet z grupy kontrolnej, jak i pacjentek z niepłodnością idiopatyczną. Uzyskane wartości nie były jednak statystycznie znamienne. Wykazano obecność istotnych statystycznie, dodatnich ( $p < 0,0001$ ) korelacji między ekspresją HOXA-10 i HOXA-11 we wszystkich analizowanych grupach.

**Wnioski:** Zaburzona ekspresja genów HOXA-10 i HOXA-11 w postaci braku wzrostu ekspresji w środkowej fazie lutealnej u kobiet z endometriozą może być jednym z czynników etiologicznych niepłodności w tej grupie kobiet.

**Słowa kluczowe:** HOXA-10, HOXA-11, endometrium, endometrioza

### Summary

The aetiology of infertility in patients with endometriosis is not fully explained. HOXA-10 and HOXA-11 genes are members of the homeobox genes subclass. Their expression is observed in glands and stroma of endometrium throughout the menstrual cycle, and their maximal expression is observed during the implantation window.

**Objective:** The study was designed to answer the question whether the infertility in endometriosis patients could be caused by decreased expression of HOXA-10 and HOXA-11 genes in endometrium.

**Material and method:** Biological material consisted of endometria obtained from 13 patients with endometriosis, 10 women with idiopathic infertility and 17 patients in the control group. In all patients surgery was performed during the implantation window, 7-9 days after ovulation. The endometrial biopsies were obtained by Pipell or during hysteroscopy. The expression of analyzed genes was assessed using RT-PCR method.

**Results:** In endometrium of women with endometriosis we found lower HOXA-10 and HOXA-11 gene expression compared to patients from both control and idiopathic infertility groups. However, there was no statistical significance. Significant positive correlations ( $p < 0.0001$ ) were found between HOXA-10 and HOXA-11 expression in all analyzed groups.

**Conclusions:** Skewed expression of HOXA-10 and HOXA-11 during the mid-luteal phase in women with endometriosis could be one of the aetiological factors of infertility in this group of women.

**Key words:** HOXA-10, HOXA-11, endometrium, endometriosis

Adres do korespondencji:

dr med. **Małgorzata Szczepańska**, Klinika Rozrodczości, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, ul. Polna 33, tel. +48 61 841 93 02, e-mail: mal.gin@poczta.fm

Endometrioza jest przewlekłym schorzeniem związanym z bólem i niepłodnością. Częstość jej występowania ocenia się na 10% wśród kobiet w wieku rozrodczym, natomiast u kobiet z niepłodnością rozpoznawana jest w 50% przypadków [1]. Wyniki metaanaliz dotyczące ciąży kobiet z endometriozą wskazują na 2-krotnie niższy ich odsetek w stosunku do grupy z czynnikiem jajo-wodowym czy niewyjaśnioną przyczyną niepłodności [2–4]. W sytuacji rozpoznania endometriozy zaawansowanej, pod postacią torbieli endometrialnych oraz zrostów, niemożność zajścia w ciążę wydaje się mieć swoje uzasadnienie. Jednak na podstawie danych literaturowych oraz obserwacji klinicznych wiadomo, że również endometrioza minimalna często współistnieje z niepłodnością. Na podstawie wyników zapłodnienia pozaustrojowego można twierdzić, iż niższy odsetek ciąż w endometriozie jest wynikiem zmniejszonej rezerwy jajnikowej, gorszej jakości oocytów i zarodków oraz niższego odsetka implantacji [4]. Wiadomo, że wśród kobiet z endometriozą, które uzyskały oocyty od dawczyń, liczba uzyskanych ciąż jest limitowana procesem implantacji [5]. Wpływ endometriozy na implantację został zademonstrowany na modelu króliczym [6]. W grupie z endometriozą oraz w grupie kontrolnej liczba ciałek żółtych oraz zapłodnionych komórek jajowych była podobna, natomiast stwierdzono 50-procentową redukcję w częstości implantacji u królików z endometriozą.

Powodzenie implantacji zależne jest od receptywności endometrium. Za markery receptywności endometrium uważa się substancje występujące zarówno na powierzchni endometrium, jak i wydzielane do jamy macicy, których ekspresja maksymalnie nasila się w okresie implantacji blastocysty [7]. U kobiet z endometriozą sugeruje się występowanie zaburzeń w ekspresji uznanych markerów receptywności endometrium, takich jak integryny, Cox-2, kalcytonina oraz trofinina [8–11].

Ostatnio zwrócono szczególną uwagę na geny HOXA-10 i HOXA-11, których ekspresję obserwuje się w endometrium w czasie całego cyklu miesięczkowego, jednak jej największy wzrost stwierdza się w środkowej fazie lutealnej [12].

Geny HOXA-10 i HOXA-11 są członkami podklasy genów *homeobox*, po raz pierwszy opisanych u *Drosophila melanogaster*. Geny te charakteryzują się obecnością zbudowanej z 183 par zasad sekwencji DNA, znanej jako *homeobox*, która koduje 61-aminokwasową domenę zwaną homeodomeną [13]. Produkty tych genów działają jako czynniki transkrypcyjne, regulujące działanie innych genów. Geny z rodziny HOXA, których jest przynajmniej 16, są odpowiedzialne za rozwój segmentowy zarodka, wzdłuż jego przednio-tylnej osi ciała, w tym narządów płciowych. Gen HOXA-10 odgrywa rolę w rozwoju macicy, natomiast gen HOXA-11 w rozwoju dolnej części macicy oraz szyjki macicy [14]. Podczas gdy ekspresja ge-

nów HOXA obserwowana jest w gruczołach oraz podścielisku endometrium w ciągu całego cyklu, jej natężenie wzrasta maksymalnie w środkowej fazie lutealnej, w okresie okna implantacyjnego [15, 16]. Mimo że nieznanne są mutacje ludzkich genów HOXA-10 i HOXA-11, pacjentki z obniżoną ekspresją tych 2 genów w czasie fazy wydzielniczej mają obniżony odsetek implantacji [17].

Celem pracy była odpowiedź na pytania, czy zaburzona ekspresja genów z rodziny HOXA jako markera receptywności w endometrium może mieć znaczenie w etiopatogenezie niepłodności u kobiet z endometriozą.

Cel pracy realizowano poprzez ocenę ekspresji genów HOXA-10 i HOXA-11 w endometrium w okresie okna implantacyjnego u kobiet z endometriozą, niepłodnością idiopatyczną oraz w grupie kontrolnej.

## Materiał i metody

Materiał biologiczny stanowiło endometrium uzyskane od 40 pacjentek w wieku rozrodczym.

Analizą objęto 13 pacjentek z endometriozą, 10 z niepłodnością idiopatyczną oraz 17 kobiet, które stanowiły grupę kontrolną.

U wszystkich pacjentek wykonano laparoskopię (u 15 wraz z histeroskopią) w okresie tzw. okna implantacyjnego, tzn. 7–9 dni po owulacji, której dokładny dzień został ustalony na podstawie ultrasonograficznej oceny jajczkowania. U 25 pacjentek, u których nie wykonano histeroskopii, endometrium uzyskano za pomocą pipelli. Pacjentki były klasyfikowane do poszczególnych grup na podstawie rozpoznania ustalonego w trakcie laparoskopii.

Pacjentki, u których na podstawie wizualizacji ognisk rozpoznano endometriozę, utworzyły grupę badaną. Stopień zaawansowania endometriozy określono na podstawie klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Płodności.

Do grupy kobiet z niepłodnością idiopatyczną zaliczono pacjentki, u których w laparoskopii nie zaobserwowano żadnych zmian w miednicy mniejszej. U tych chorych przed wykonaniem procedury operacyjnej nie stwierdzono odchyłań w badaniu hormonalnym, obrazie HSG oraz ocenie semiologicznej.

Grupę kontrolną utworzyły pacjentki, u których stwierdzono łagodne zmiany w jajnikach lub mięśniaki macicy. Przynajmniej raz rodziły one o czasie i miały regularne cykle miesięczkowe. Badanie histopatologiczne wykluczyło zmiany w endometrium.

Biopsje endometrium pobierano w okresie okna implantacyjnego, za pomocą pipelli lub podczas zabiegu histeroskopii. Materiał został zabezpieczony w buforze RNAlater® (Qiagen, Australia) i zamrożony w temperaturze –80°C do chwili izolacji totalnego RNA.

Izolację kwasu RNA z zabezpieczonych biopsji przeprowadzono wg instrukcji producenta, zestawem do izolacji RNA – Rnaesy Protect Mini Kit (Qiagen, Australia).

Oznaczenie ekspresji poszczególnych genów metodą RT-qPCR przeprowadzono w II etapach:

- I etap – odwrotna transkrypcja zestawem odczynników QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Australia). Z każdej próbki roztwór zawierający nie więcej niż 1 µg wyizolowanego RNA został poddany procesowi RT wg wskazówek producenta zestawu odczynników. W skład procedury wchodziła także eliminacja potencjalnie obecnego DNA. Produktem tego etapu był powstały w wyniku konwersji mRNA komplementarny DNA.
- II etap – reakcja *real-time* PCR; 2 µl matrycy zawierającej nie więcej niż 200 ng cDNA, uzyskanego w pierwszym etapie zostało wykorzystane do przeprowadzenia ilościowej analizy ekspresji badanych genów zestawem odczynników DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit Finnzymes (Finlandia). Profil reakcji i skład mieszaniny reakcyjnej zostały opracowane wg wskazówek producenta odczynników. Startery do reakcji qPCR zostały zaprojektowane programem Primer3 [18].

Specyficzność oligonukleotydów wyznaczonych w tej procedurze została potwierdzona w bazie BLAST (tab. I) [19].

Do wyznaczenia wydajności reakcji qPCR wykorzystano szereg 6 kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń DNA

będącego specyficznym produktem reakcji PCR dla każdego z badanych transkryptów.

Reakcje qPCR prowadzono przy użyciu termocyklera Rotor-Gene3000, CorbettResearch (Australia). W trakcie reakcji qPCR, po każdym cyklu wyznaczany był przyrost produktu, a po zakończeniu reakcji program sterujący termocyklerem wyznaczył poziom fluorescencji (Ct), przy którym tempo przyrostu produktu reakcji osiągnęło wartość wykładniczą.

Do wyznaczenia względnego poziomu ekspresji i analizy statystycznej uzyskanych wyników użyto oprogramowania:

- REST2005 [20],
- MedCalc [21].

## Wyniki

### Ocena ekspresji HOXA-10 w endometrium

Analiza ekspresji genu HOXA-10 przy użyciu metody RT-PCR w endometrium wykazała, iż u kobiet z endometriozą była ona o 44% niższa w porównaniu z endometriem kobiet z grupy kontrolnej oraz o 32% niższa w porównaniu z kobietami z niepłodnością idiopatyczną.

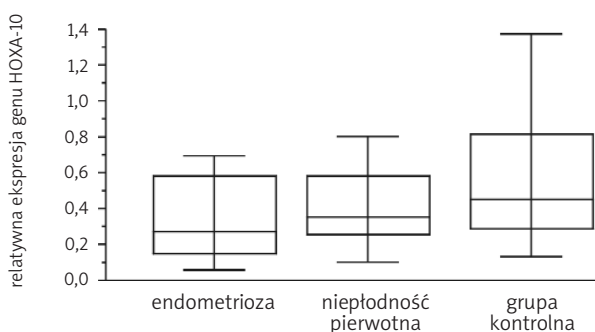
Także ekspresja HOXA-10 w endometrium od kobiet z niewyjaśnioną przyczyną niepłodności była o 33% niższa w porównaniu z pacjentkami z grupy kontrolnej (ryc. 1).

Obniżoną ekspresję stwierdzano w 64% endometrium w grupie pacjentek z endometriozą oraz w 62% w grupie pacjentek z niepłodnością idiopatyczną.

### Ocena ekspresji HOXA-11 w endometrium

Na podstawie badania ekspresji genu HOXA-11 w endometrium stwierdzono, iż w grupie kobiet z endometriozą ekspresja była o 60% niższa w porównaniu z endometriem pacjentek z grupy kontrolnej oraz o 37% niższa w porównaniu z pacjentkami z niepłodnością idiopatyczną.

Podobnie jak podczas analizy ekspresji genu HOXA-10 stwierdzono, iż ekspresja HOXA-11 w endometrium pobranym od kobiet z niepłodnością idiopatyczną była o 46% niższa w porównaniu z chorymi z grupy kontrolnej (ryc. 2).



**Ryc. 1.** Poziomy relatywnej ekspresji genu HOXA-10 w badanych grupach. Wykres przedstawia wartości średnie, wartości 25. i 75. percentyla oraz wartości minimalną i maksymalną

**Tab. I.** Specyficzność oligonukleotydów

Gen	Tm	Wielkość (nn)	Sekwencja
<b>GAPDH</b>			
FF	65,3	24	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA
REV	67,3	19	GGAGTGGGTGTCGCTGTTG
<b>HOXA-10</b>			
FF	64,9	18	CTGACTGGGCTGGGTTTG
REV	64,9	19	ACCTCAGGCCAGACACCTC
<b>HOXA-11</b>			
FF	64,6	20	CTCAGTGTCTGGCTGCAGAG
REV	63,9	21	GCTTCCAAGCTCAGTTCAAGA

Obniżoną ekspresję stwierdzano w 67% endometrium w grupie pacjentek z endometriozą oraz w 56% w grupie z niepłodnością idiopatyczną.

Analiza statystyczna nie wykazała jednak istotnych różnic zarówno w natężeniu ekspresji genów HOXA-10 i HOXA-11, jak i w częstości występowania obniżonej ekspresji między analizowanymi grupami.

### Analiza korelacji

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność istotnych statystycznie, dodatnich ( $p < 0,0001$ ) korelacji między ekspresją HOXA-10 i HOXA-11 we wszystkich analizowanych grupach (ryc. 3.–5.).

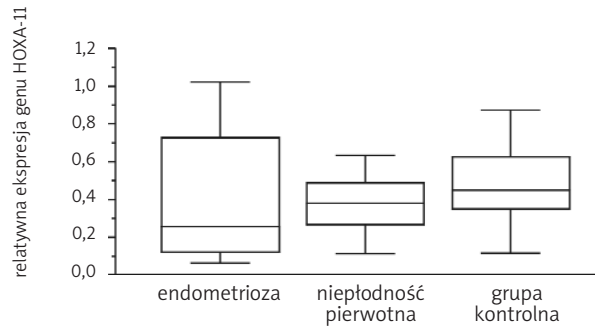
### Dyskusja

Liczne badania wskazują, iż obniżona płodność kobiet z endometriozą może wynikać z nieprawidłowej funkcji endometrium. W tej grupie pacjentek stwierdzono zaburzoną ekspresję integryn  $\alpha\beta$ , EMX2, interleukiny 11 oraz czynnika hamującego białaczkę (ang. *leukemia inhibitory factor* – LIF) w błonie śluzowej macicy w okresie okna implantacyjnego [8, 17, 18, 22, 23].

W prawidłowo funkcjonującym endometrium stwierdza się zróżnicowaną ekspresję genów HOXA-10 i HOXA-11, ze szczytem w okresie okna implantacyjnego, natomiast – jak wykazano na modelu mysim – jej obniżenie związane jest ze zmniejszonym odsetkiem implantacji na skutek zaburzonej receptywności endometrium [21].

W pracy przeanalizowano ekspresję genów HOXA-10 i HOXA-11 w okresie okna implantacyjnego w endometrium kobiet z endometriozą, niepłodnością oraz w grupie kontrolnej.

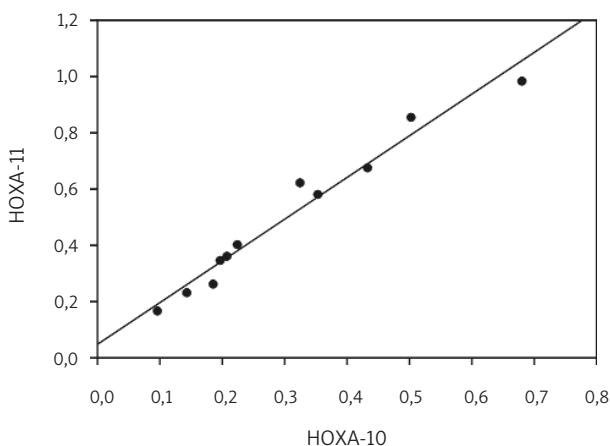
Benson i wsp. [25] oraz Hsieh-Li i wsp. [26] na podstawie doświadczeń przeprowadzonych na myszach sformułowali wniosek, że najbardziej istotnym warunkiem im-



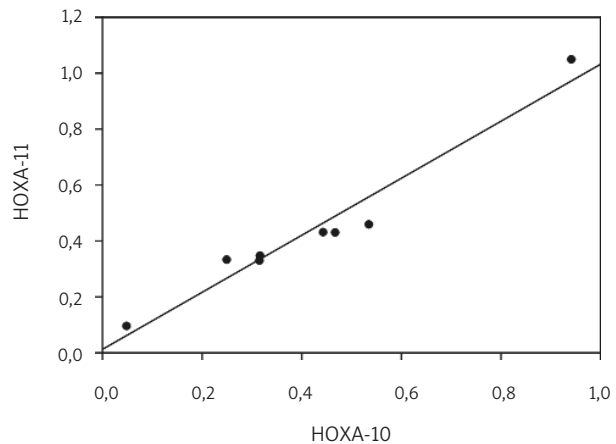
Ryc. 2. Poziomy relatywnej ekspresji genu HOXA-11 w badanych grupach. Wykres przedstawia wartości średnie, wartości 25. i 75. percentyla oraz wartości minimalną i maksymalną

plantacji jest matczyzna ekspresja genów HOXA. Zaobserwowali oni, że u myszy transgenicznych pozbawionych genu HOXA-10 notuje się przemianę górnego segmentu macicy w strukturę podobną do jajowodu i zahamowanie implantacji, nawet jeżeli zarodek jest transportowany do niezmiennego dolnego segmentu macicy. Podobnie myszy homozygotyczne mające zmutowane geny HOXA-11 są niepłodne z powodu defektów w implantacji [26]. Myszy, u których nie zachodzi ekspresja HOXA-10 i HOXA-11, wytwarzają prawidłową liczbę zarodków, które są zdolne do implantowania się u innych myszy. Z kolei zarodki myszy z prawidłową ekspresją HOXA-10 i HOXA-11 nie są zdolne do implantacji u myszy pozbawionych HOXA-10 i HOXA-11 [27]. Znaczenie genu HOXA-10 w procesie implantacji zostało potwierdzone eksperymentalnie przy użyciu oligonukleotydów antysensownych w stosunku do HOXA-10. Zostały one wstrzyknięte do mysich macic, wynikiem czego zmniejszył się odsetek implantacji [28].

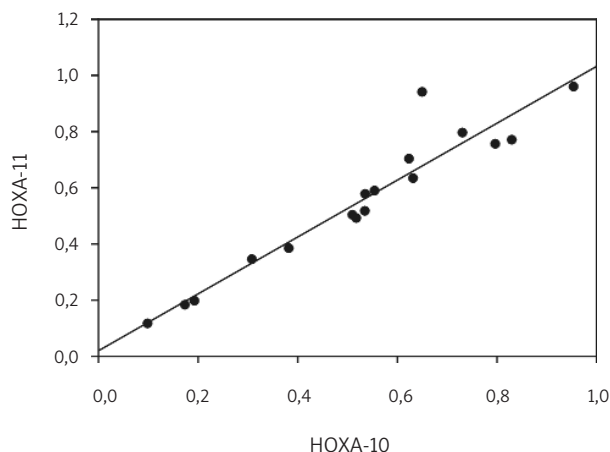
Wydaje się, iż zarówno HOXA-10, jak i HOXA-11 mają istotne znaczenie nie tylko u myszy. Również u ludzi



Ryc. 3. Korelacja względnej ekspresji HOXA-10 i HOXA-11 w grupie pacjentek z endometriozą ( $p < 0,0001$ )



Ryc. 4. Korelacja względnej ekspresji HOXA-10 i HOXA-11 w grupie pacjentek z niepłodnością idiopatyczną ( $p < 0,0001$ )



Ryc. 5. Korelacja względnej ekspresji HOXA-10 i HOXA-11 w grupie kontrolnej ( $p < 0,0001$ )

zaburzenie ekspresji tych genów w endometrium obserwuje się w sytuacjach związanych z obniżeniem implantacji – w zespole PCO, wodniaku jajowodu oraz endometriozie [29–31]. Ponadto dodanie płynu jajowodowego z wodniaka jajowodu do medium hodowlanego skutkuje obniżeniem ekspresji HOXA-10 *in vitro* [30]. Wzrost ekspresji HOXA-10 odnotowano natomiast w jajowodzie z ciążą ektopową [32].

Badania, przeprowadzone przez autorów niniejszej pracy przy użyciu metody RT-PCR, nie wykazały istotnej statystycznie różnicy w ekspresji genów HOXA między analizowanymi grupami. W grupie kobiet z endometriozą stwierdzono niższą odpowiednio o 44 i 60% ekspresję genów HOXA-10 i HOXA-11 w porównaniu z pacjentkami z grupy kontrolnej. Prawdopodobnie na brak potwierdzenia statystycznej różnicy miała wpływ zbyt mała liczebność grup. Ciekawym spostrzeżeniem jest również to, iż pacjentki z niewyjaśnioną przyczyną niepłodności, podobnie jak kobiety z endometriozą, wykazywały aż o 1/3 niższą ekspresję HOXA-10 i prawie o połowę niższą ekspresję HOXA-11. Fakt ten sugeruje, iż również w tej grupie pacjentek niepłodność może być wynikiem nieprawidłowego funkcjonowania endometrium. We wszystkich badanych grupach analiza korelacji wykazała ponadto istotną statystycznie ( $p = 0,0001$ ), pozytywną zależność między ekspresją HOXA-10 a HOXA-11. Uzyskany wynik nie jest dla autorów zaskoczeniem i potwierdza fakt, iż wzrost ekspresji obserwowany w okresie okna implantacyjnego dotyczy obu genów.

Istnieją pojedyncze doniesienia, dotyczące badań ekspresji genu HOXA-10 i HOXA-11 u kobiet z endometriozą. Wu i wsp. [34] stwierdzili obniżenie ekspresji genu HOXA-10 w grupie 6 kobiet z torbielami endometrialnymi w porównaniu z kobietami zdrowymi. Ponadto u 3 pacjentek w grupie badanej wykazali zaburzenia w metylacji 3 fragmentów genu HOXA-10. Autorzy sugerują, iż zaburzona ekspresja badanych genów, która

prawdopodobnie wpływa negatywnie na implantację zarodka, jest wynikiem ich nieprawidłowej metylacji.

Analiza przeprowadzona przez Taylor i wsp. [17] za pomocą metody *Northern blot* wykazała brak charakterystycznego wzrostu ekspresji genów HOXA-10 i HOXA-11 w środkowej fazie lutealnej, która była istotnie statystycznie niższa ( $p = 0,01$ ) w grupie kobiet z endometriozą w porównaniu z kobietami zdrowymi zarówno w okresie okna implantacyjnego, jak i późnej fazie lutealnej. Podobne spostrzeżenia opisali Kim i wsp. [35], którzy przeanalizowali ekspresję genu HOXA-10 w endometrium małą z indukowaną endometriozą. Autorzy zaobserwowali stopniowy spadek HOXA-10 mRNA wraz z czasem trwania choroby (istotny od 12. mies.), a także regulowaną przez geny HOXA zaburzoną ekspresję  $\beta 3$ -integriny i EMX2.

Zjawisko obniżonej płodności chorych z endometriozą jest najprawdopodobniej złożone. Spośród wielu czynników determinujących zajście w ciążę w tej grupie kobiet, endometrium wydaje się mieć istotne znaczenie. Uzyskanie optymalnych warunków do implantacji wymaga współdziałania ogromnej liczby molekuł, których rola w procesie różnicowania endometrium nie jest, niestety, zrozumiała w stopniu satysfakcjonującym. Geny HOXA-10 i HOXA-11, których nieprawidłowa (nawet w niewielkim stopniu) ekspresja, w postaci braku charakterystycznego jej wzrostu w okresie okna implantacyjnego, może skutkować kaskadą zaburzonego funkcjonowania innych związków, a w efekcie być jednym z etiologicznych czynników niepłodności kobiet z endometriozą.

## Piśmiennictwo

- Olive D, Lindheim S, Pritts E. Endometriosis and infertility: what do we for each stage? *Curr Womens Health Rep* 2003; 3: 389-94.
- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on IVF outcome. *Fertil Steril* 2000; 74: 574-84.
- Simon C, Guttierrez A, Vidal A. Outcome of endometriosis in assisted reproduction: results from in vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994; 9: 725-9.
- Arici A, Oral E, Bukulmez O. The effect of endometriosis on implantation. Result from Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1996; 65: 603-7.
- Pelicer A, Navarro J, Bosch E. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 943: 122-30.
- Hahn DW, Carraher RP, Foldes RG, et al. Experimental evidence for failure to implant as a mechanism of infertility associated with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1109-13.
- Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikołajczyk M. Is glycodefin an important marker of endometrial receptivity? *Gin Pol* 2005; 76: 770-81.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, et al. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 643-9.
- Chakraborty I, Das SK, Wang J, et al. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-2 genes in the periimplantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 1996; 16: 107-22.
- Kumar S, Zhu L, Polihronis M. Progesterone induces calcitonin gene in expression in human endometrium within the putative window of implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4443-50.
- Fukada MN, Sato T, Nakayama J. Trophinin and tustin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation. *Genes Dev* 1995; 9: 1199-210.

12. Taylor HS, Arici A, Olive D, et al. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* 1998; 101: 1379-84.
13. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; 68: 283-302.
14. Taylor H. The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med* 2000; 18: 311-20.
15. Taylor H, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system; late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997; 57: 1338-45.
16. Ma L, Benson GV, Lim H, et al. Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in müllerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* 1998; 197: 141-54.
17. Taylor HS, Bagot C, Kardana A, et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14: 1328-31.
18. [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
19. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on)
20. <http://www.gene-quantification.de/download.html> – rest-2005
21. <http://www.medcalc.be/>
22. Dimitriadis E, Stoikos C, Stafford-Bell M, et al. Interleukin-11, IL-11 receptor alpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *J Reprod Immunol* 2006; 69: 53-64.
23. Mikotajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2007; 21: 3054-58.
24. Gui Y, Zhang J, Yuan L, Lessey BA. Regulation of HOXA-10 and its expression in normal and abnormal endometrium. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 866-73.
25. Benson GV, Lim H, Paria BC, et al. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996; 58: 337-47.
26. Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 1995; 121: 373-85.
27. Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod* 1997; 56: 1097-105.
28. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995; 374: 460-3.
29. Bagot CN, Troy PJ, Taylor HS. Alteration of maternal Hoxa 10 expression by in vivo gene transfection affects implantation. *Gene Ther* 2000; 7: 1378-84.
30. Taylor HS, Igarashi P, Olive D, et al. Sex steroids mediate HOXA 11 expression in human peri-implantation endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1129-35.
31. Daftary G, Taylor H. Hydrosalpinx fluid diminishes endometrial cell HOXA-10 expression. *Fertil Steril* 2002; 78: 577-80.
32. Cermik D, Selam B, Taylor H. Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 238-43.
33. Salih S, Taylor H. HOXA 10 gene expression in human fallopian tube and ectopic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1404-6.
34. Wu Y, Halverson G, Basir Z, et al. Aberrant methylation at HOXA 10 may be responsible for its aberrant expression in endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 371-80.
35. Kim J, Taylor H, Lu Z, et al. Altered expression of HOXA 10 in endometriosis: potential role in decidualisation. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 323-32.