

Ekspresja genu HOXA11 w *endometrium* kobiet bez i z zaburzeniami płodności

HOXA11 gene expression in women with and without impaired infertility

Szczepańska Małgorzata, Wirstlein Przemysław, Skrzypczak Jana

Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp: Geny HOXA są markerami receptywności a ich nieprawidłowa ekspresja może identyfikować kobiety z zaburzeniami implantacji.

Cel: Celem pracy była analiza poziomu HOXA11 mRNA oraz ekspresji i lokalizacji białkowego produktu tego genu w *endometrium* kobiet nieplodnych z endometriozą, nieplodnością idiopatyczną oraz kobiet bez zaburzeń rozrodu w różnych fazach cyklu płciowego.

Materiał i metody: Przeanalizowano poziom transkryptu HOXA11 w *endometrium* kobiet z endometriozą (n=36), nieplodnością idiopatyczną (n=48) oraz bez zaburzeń rozrodu (n=30) w różnych fazach cyklu płciowego. Do oznaczenia poziomu mRNA zastosowano metodę real time PCR.

Przy użyciu techniki immunohistochemicznej porównano lokalizację i ekspresję białka HOXA11 w fazie proliferacyjnej, wczesnej i środkowej sekrecyjnej w *endometrium* w grupach badanych. Biopsję *endometrium* wykonano za pomocą pipelli lub w czasie histeroskopii.

Wyniki: Stwierdzono statystycznie, istotnie wyższy poziom transkryptu HOXA11 w środkowej fazie lutealnej w grupach z nieplodnością idiopatyczną oraz kontrolnej ($p<0,05$). U kobiet z endometriozą w okresie okna implantacyjnego stwierdzono niski poziom transkryptu. Poziom HOXA11 mRNA w grupie bez zaburzeń rozrodu był statystycznie istotnie niższy w fazie proliferacyjnej ($p=0,003$) oraz statystycznie istotnie wyższy ($p=0,018$) w środkowej fazie lutealnej w stosunku do grupy z endometriozą. Reakcja na obecność antygenu HOXA11 lokalizowała się w jądrach komórek podścieliska *endometrium*, cytoplazma nie wybarwiała się.

Wnioski: Wyciszenie ekspresji HOXA11 w *endometrium* w środkowej fazie lutealnej może być powszechnym zjawiskiem wśród pacjentek z endometriozą. Dalsze badania powinny wyjaśnić mechanizm zaburzonej ekspresji genu HOXA11.

Słowa kluczowe: **HOXA11 / *endometrium* / endometrioza / nieplodność idiopatyczna /**

Adres do korespondencji:

Małgorzata Szczepańska
Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33,
tel. 061 841 93 02, fax: 061 841 96 25
e-mail: mal.gin@poczta.fm

Otrzymano: 14.04.2010
Zaakceptowano do druku: 30.05.2010

Summary

Introduction: *HOXA* genes are receptivity markers and their altered expression can help identify women with implantation defect.

Objectives: The purpose of this study was to examine the expression pattern of *HOXA11* and expression and localization of its protein product in the endometrium of women with endometriosis, idiopathic infertility and normal fertile patients during different phases of the menstrual cycle.

Material and methods: We evaluated *HOXA11* mRNA level in the endometrium from endometriosis ($n=36$), idiopathic infertility ($n=48$) and fertile patients ($n=30$) during a menstrual cycle. The amounts of mRNA were determined by real-time quantitative PCR. Using the immunohistochemical techniques we compared the localization of *HOXA11* protein in the proliferative, early secretory and midsecretory endometrium in all of the studied groups. Endometrial biopsy was performed by pipelle or during hysteroscopy.

Results: We observed statistically significantly elevated *HOXA11* transcripts levels in the midsecretory phase in both, the idiopathic infertility and the fertile control groups ($p<0.05$). Patients with endometriosis had low *HOXA11* transcript level in the implantation window.

Normal fertile patients showed statistically significantly decreased ($p=0.003$) *HOXA11* mRNA level in the proliferative phase and statistically significantly increased level ($p=0.018$) in midsecretory phase, comparing to endometriosis patients. *HOXA11* protein were localized in the nuclei of the endometrial stromal cells whereas the cytoplasm of these cells did not stain.

Conclusion: Our results suggest that altered *HOXA11* gene expression in the endometrium during a menstrual cycle may be a common phenomenon among patients with endometriosis and may cause infertility in this group of patients. Further research should explain the mechanism of altered expression of *HOXA11* gene.

Key words: **HOXA11** / **endometrium** / **endometriosis** / **infertility** /

Wstęp

Implantacja blastocysty jest możliwa tylko w bardzo krótkim okresie cyklu zwanym oknem implantacyjnym tzn. 7-9 dni po owulacji. W tym czasie *endometrium* osiąga maksymalną receptywność, która warunkuje przyłączenie zarodka i rozwój ciąży. Uzyskanie optymalnych warunków do implantacji poprzedza proliferacja i różnicowanie elementów *endometrium* w tym gruczołów, podścieliska, naczyń, komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów. Nieprawidłowe wzrastanie oraz różnicowanie *endometrium* może mieć istotne znaczenie w niemożności zajścia w ciążę [1]. W grupie chorych z endometriozą odsetek kobiet niepełodnych sięga 50% [2]. Częstość uzyskanych w tej grupie ciąż jest dwukrotnie niższa w stosunku do kobiet z niepłodnością idiopatyczną, które stanowią około 15% wśród pacjentek niepełodnych [1].

Na podstawie przeprowadzonych badań można twierdzić, iż kobiety z endometriozą nie uzyskują optymalnej receptywności *endometrium* w czasie okna implantacyjnego na skutek zaburzonej ekspresji biomarkerów związanych z implantacją [3, 4, 5]. Wcześniejsze doniesienia naszej grupy badawczej dotyczące receptywności *endometrium* u pacjentek z niepłodnością o różnej etiologii oraz utratami ciąż wskazują na zaburzoną ekspresję wielu molekuł mających bezpośredni związek z implantacją [6, 7, 8, 9]. Jednak mechanizm molekularny, który reguluje rozwój *endometrium* a tym samym zapewnia optymalne warunki do implantacji blastocysty jest ciągle mało poznany.

Czynniki transkrypcyjne wiążą się selektywnie z właściwą sekwencją DNA promotora i regulując ich ekspresję koordynują proces różnicowania komórek. Uzyskanie optymalnej receptywności *endometrium* jest najważniejszym procesem jego transformacji umożliwiającym rozwój ciąży. Jednymi z najlepiej poznanych czynników transkrypcyjnych biorących udział w implantacji są produkty białkowe genów z podklasy *homebox* [10].

Geny z rodziny *HOXA* w życiu płodowym są odpowiedzialne za rozwój segmentowy zarodka wzdłuż jego przednio-tylnej osi ciała, w tym narządów płciowych. Gen *HOXA11* odgrywa rolę w rozwoju dolnej części macicy oraz szyjki macicy [11].

U myszy najbardziej istotnym warunkiem implantacji jest matczyzna ekspresja genów *hoxa10* i *hoxa11*. Myszy transgeniczne pozbawione tych genów są niepełodne z powodu defektu w implantacji [12]. Myszy, u których nie zachodzi ekspresja genów *hoxa10* i *hoxa11* mają prawidłową liczbę zarodków, które można implantować u zdrowych osobników [13].

Geny *HOXA10* i *HOXA11* zidentyfikowano również w ludzkim *endometrium*, jednakże u ludzi nie były badane tak szczegółowo jak u myszy [14]. U kobiet z niezaburzonym rozrodem stwierdzono stopniowy wzrost ekspresji tych genów od fazy proliferacyjnej, przez wczesną fazę lutealną, ze szczytem w okresie okna implantacyjnego [10, 15].

Ekspresja genu *HOXA11* jest w warunkach *in vivo* modulowana progesteronem a także poprzez sygnały przedimplantacyjnego zarodka, co wskazuje na rolę *HOXA11* w procesie zagnieźdzenia [16]. Istnieją tylko nieliczne doniesienia charakteryzujące ekspresję genów z rodziny *HOXA* a w szczególności genu *HOXA11* w *endometrium* kobiet zdrowych oraz z niepłodnością o różnej etiologii. Niewiele jest też danych dotyczących immunohistochemicznej lokalizacji białkowego produktu tego genu.

Cel pracy

Celem pracy była odpowiedź na pytanie czy poziom *HOXA11* mRNA oraz ekspresja i lokalizacja białkowego produktu tego genu w *endometrium* kobiet niepełodnych z endometriozą oraz niepłodnością idiopatyczną różni się w stosunku do kobiet bez zaburzeń rozrodu.

Cel pracy realizowano poprzez ocenę poziomu transkryptu genu *HOXA11* oraz analizę ekspresji i lokalizacji jego białkowego produktu w *endometrium* w różnych fazach cyklu miesięczkowego u pacjentek bez oraz z zaburzeniami rozrodu.

Materiał i metody

Opisane niżej metody rekrutacji pacjentek jak i sposoby pozyskania materiału badawczego, zostały uprzednio zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. *Endometrium* uzyskano od 113 pacjentek w wieku rozrodczym. Analizę objęto 36 kobiet z endometriozą, 48 z niepłodnością idiopatyczną oraz 30, które stanowiły grupę kontrolną. U wszystkich pacjentek wykonano laparoskopię, a w grupach kobiet z endometriozą oraz z niepłodnością idiopatyczną również histeroskopię. U kobiet z grupy kontrolnej *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 odchyleń w badaniu hormonalnym, obrazie HSG oraz ocenie seminologicznej partnerów.

Grupę kontrolną utworzyły pacjentki, u których stwierdzono łagodne zmiany w jajnikach lub podsurowicówkowe mięśniaki macicy. Kobiety te przynajmniej raz rodziły o czasie i miały regularne cykle miesięczne.

Żadna z pacjentek nie przyjmowała antykoncepcji hormonalnej, preparatów hormonalnych oraz nie stosowała kształtki wewnątrzmacicznej w okresie nie krótszym niż 6 miesięcy przed planowaną operacją.

W badaniu histopatologicznym nie stwierdzono zmian w *endometrium* u żadnej z operowanych kobiet. Ocenę fazy cyklu oparto o barwienie H+E, natomiast kryteria Noyesa i Hertiga posłużyły do ustalenia fazy cyklu, z którego pochodził materiał [17].

W grupie kontrolnej 10 błon śluzowych odpowiadało fazie proliferacji, 10 wczesnej sekrecji [17-18 dzień cyklu] i 10 środkowej fazie sekrecji (19-22 dzień cyklu).

W grupie pacjentek z endometriozą 10 błon śluzowych odpowiadało fazie proliferacji, 10 wczesnej fazie sekrecji a 16 środkowej fazie lutealnej tj. 19-22 dzień cyklu. W grupie kobiet z niepłodnością idiopatyczną 15 błon śluzowych odpowiadało fazie proliferacji, 11 wczesnej sekrecji a 22 środkowej fazie lutealnej.

Biopsje *endometrium* pobierano za pomocą pipelli lub podczas zabiegu histeroskopii. Materiał został zabezpieczony w buforze RNAlater i zamrożony w temperaturze -80°C do chwili izolacji totalnego RNA.

Izolacja RNA

Część biopsji *endometrium*, uzyskanego w oknie implantacyjnym przekazano do oceny histologicznej. Pozostałą część rozdzielono, z czego 30mg próbkę umieszczono w buforze

RNAlater solution (Qiagen, Germany), a następnie zamrożona w -80°C do czasu izolacji RNA. Izolację RNA przeprowadzono przy użyciu RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Germany), zgodnie z zaleceniami producenta. Dodatkowo, przeprowadzono trawienie DNazą, RNase-Free DNase Set (Qiagen, Germany) w celu eliminacji ewentualnych zanieczyszczeń DNA.

Odwrotna transkrypcja

Uzyskany wcześniej RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu QuantiTect Reverse Transcription Kit i starterów oligdT (Qiagen, Germany). Uzyskany w ten sposób cDNA został użyty jako matryca w reakcji qPCR.

Real Time PCR

Projektowanie starterów

Startery dla *HOXA11* i *GAPDH* zaprojektowano przy użyciu Primer3 software [18]. Sekwencję starterów dla *ACTB* zaczerpnięto z RTPimerDB [19]. Specyficzność starterów przeanalizowano w bazie BLAST [19]. Dodatkowo, przeanalizowano parametry termodynamiczne zaprojektowanych starterów w programie OligoAnalyzer. Sekwencję starterów, ich temperaturę topnienia oraz wielkość otrzymanego produktu przedstawia tabela I.

Reakcja Real Time PCR

Reakcję prowadzono za pomocą odczynników DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes, Finland), w termocyklerze Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australia). Specyficzność uzyskanych produktów potwierdzono na 2% żelu agarozowym, oraz analizując drugą pochodną krzywej topnienia uzyskanego produktu.

Do wyznaczenia poziomów transkryptów w badanych próbkach wyznaczono krzywą standardową na podstawie szeregu 6 kolejnych, 10-krotnych rozcieńczeń DNA będącego specyficznym produktem reakcji PCR dla każdego z badanych transkryptów. Jakość wyznaczonych krzywych opisana przez parametr R^2 była nie mniejsza niż 0,999, a wydajność reakcji zawierała się pomiędzy 1,0 a 0,97. Profil termiczny reakcji wyznaczono zgodnie z zaleceniami producenta odczynników.

Do wyznaczenia względnego poziomu transkrypcji zastosowano parę genów referencyjnych *ACTB* i *GAPDH* [21]. Poziom transkryptów obu genów wskazywał wysoką korelację: $r=0,89$ i $r=0,96$ ($P<0,01$, Spearman Rank) odpowiednio dla grupy badanej i kontrolnej. Dla każdej próbki przeprowadzono podwójną reakcję w obecności kontroli pozytywnej i negatywnej.

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.

Metodyka immunocytochemiczna

Materiał utrwalono w buforowanej formalinie (pH 7,4-7,6), zatapiano w bloczki parafinowe i krojono na skrawki grubości 3-4µm. Z każdego materiału uzyskiwano 8-10 skrawków naklejonych na szkiełka adhezyjne. Część uzyskanych preparatów wybarwiono hematoksyliną i eozyną (H+E) i na sąsiednich w kolejności skrawkach wykonywano reakcję immunohistochemiczną na obecność antygenu HOXA11.

Tabela I. Sekwencje starterów, wielkość otrzymanego produktu oraz temperatura dysocjacji starterów Tm.

Gen	Tm (°C)	Wielkość produktu (bp)	Sekwencja startera
GAPDH		94	
FF	65,3		TGCCAAATATGATGACATCAAGAA
REV	67,3		GGAGTGGGTGTCGCTGTTG
ACTB		166	
FF	64,2		GCACCACACCTTCTACAATGAGC
REV	64,1		GGATAGCACAGCCTGGATAGCAAC
HOXA11		136	
FF	64,4		CTCAGTGTCTGGCTGCAGAG
REV	64,0		GCTTCCAAGCTCAGTTCAAGA

Tabela II. Porównanie względnego poziomu transkryptu genu HOXA11 metodą nieparametrycznej analizy wariancji Kruskala-Wallisza w badanych grupach w czasie cyklu płciowego.

Grupa	Mediana (Zakres)	p*
	Faza Proliferacyjna	
Kontrola**	0,039 (0,076 - 0)	0,003
Endometrioza**	0,121 (1,769 - 0,031)	
Niepłodność	0,064 (0,099 - 0,011)	
	Wczesna Faza Sekrecyjna	
Kontrola	0,105 (0,137 - 0,077)	0,318
Endometrioza	0,175 (0,264 - 0,031)	
Niepłodność	0,102 (0,204 - 0,032)	
	Środkowa Faza Sekrecyjna	
Kontrola**	0,202 (1,428 - 0,161)	0,018
Endometrioza**	0,127 (0,281 - 0,030)	
Niepłodność	0,169 (0,562 - 0,080)	

*Nieparametryczna, jednoczynnikowa analiza wariancji Kruskala - Wallisa

**Test wielokrotnych porównań Dunna: p<0,05

Immunoreakcję prowadzono z użyciem poliklonalnych, króliczych przeciwciał IgG i systemu HRP, EnVision TM+(DAKO, Denmark).

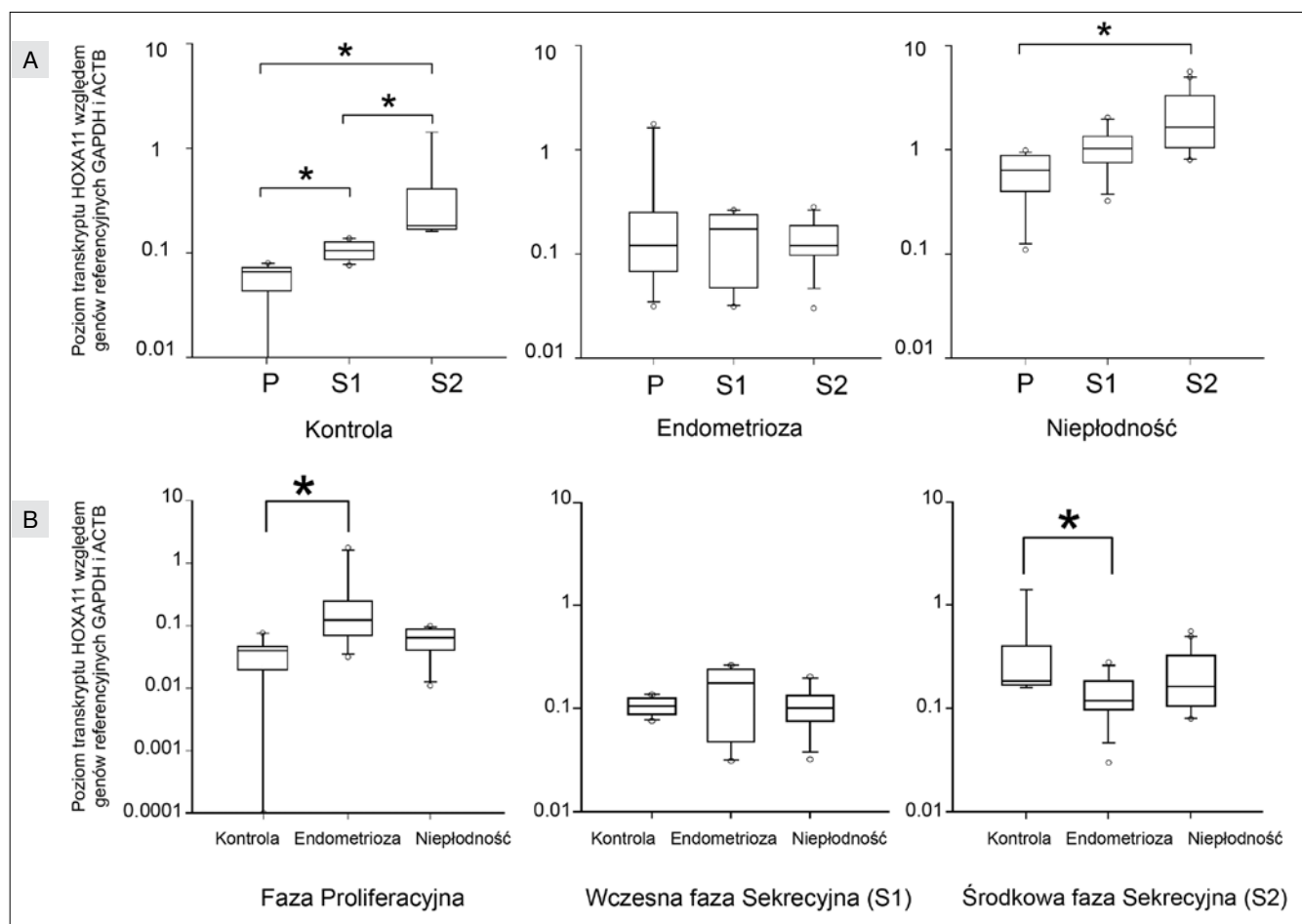
Procedura barwienia

Odparafinowano i odkrywano epitopy w łaźni wodnej z buforem Retrieval Solution w temp. 95-99°C przez 40 min. Endogenną peroksydazę blokowano 3% H₂O₂ przez 5 minut, następnie na okres 30 minut nakładano przeciwciało przeciw HOXA 11. Po upływie tego czasu dwukrotnie płukano w TBS, nakładano II przeciwciało na kolejne 30 min. i ponownie dwukrotnie płukano w TBS.

III przeciwciało (STREPTAVIDIN HRP) nakładano na 30 minut i dwukrotnie płukano w TBS. Po tym czasie dodawano substratu dla HRP na 10 min. i płukano w TBS. Uzyskane preparaty podbarwiono hematoksyliną, odwadniano, prześwietlano i zatapiano w balsamie kanadyjskim.

Do barwienia użyto przeciwciał firmy Santa Cruz Biotechnology skierowanych przeciw HOXA11 w rozcieńczeniu 1:200. Uzyskane wyniki oceniano w mikroskopie Axioskop40, zdjęcia wykonywano aparatem cyfrowym CANON, powerShot G5. Ocenę stopnia ekspresji genu *HOXA11* oparto na liczbie komórek z immunopozytywną reakcją ocenianą pod 40-krotnym powiększeniem obiektywu. Próby kontrolne w procedurze immunobarwienia oparto na pominięciu pierwszego przeciwciała.

Ekspresja genu *HOXA11* w *endometrium* kobiet bez i z zaburzeniami płodności.



Rycina 1. Poziom transkryptu *HOXA11*, w poszczególnych fazach skłasyfikowany ze względu na grupę badaną (A). Poziom transkryptu *HOXA11*, w grupach badanych, skłasyfikowany ze względu na fazę dojrzałości *endometrium* (B).
*Test wielokrotnych porównań Dunna: $p < 0,05$

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania Sigma Stat 3.5. Istotność statystyczna oceniona została za pomocą nieparametrycznej, jednoczynnikowej analizy wariancji Kruskala – Wallisa i testu wielokrotnych porównań Dunna. Wartości $p < 0,05$ przyjęto jako istotne statystycznie.

Wyniki

Poziom *HOXA 11* mRNA w *endometrium* w badanych grupach

Grupa kontrolna

Ekspresję genu *HOXA11* stwierdzano w badanych fazach cyklu miesięczkowego. Najniższe stężenie transkryptu tego genu obserwowano w fazie proliferacyjnej, wyższe w fazie wczesnej sekrecji a najwyższy poziom w okresie okna implantacyjnego. Różnice stężenia transkryptu pomiędzy poszczególnymi fazami były statystycznie istotne ($p < 0,05$). Wyniki przedstawiono w tabeli II, ryc. 1A.

Grupa pacjentek z endometriozą

Najniższą ekspresję genu *HOXA11* stwierdzono w fazie proliferacji, najwyższą we wczesnej fazie lutealnej. W okresie okna implantacyjnego ekspresja była niższa w stosunku do

wczesnej fazy sekrecyjnej. Różnice w stężeniu transkryptu w poszczególnych fazach cyklu nie były istotne statystycznie. Wyniki przedstawiono w tabeli II, ryc. 1A.

Grupa pacjentek z niepłodnością idiopatyczną

Poziom transkryptu genu *HOXA 11* był najniższy w fazie proliferacyjnej, najwyższy zaś w środkowej fazie lutealnej. Stwierdzono istotną statystycznie ($p < 0,05$) różnicę między poziomem transkryptu w fazie proliferacyjnej a okresem okna implantacyjnego. Natomiast różnica poziomu transkryptu między wczesną i środkową fazą lutealną nie była tak znacząca jak w grupie kontrolnej. Wyniki przedstawiono w tabeli II, ryc. 1A.

Poziom *HOXA11* mRNA w analizowanych fazach cyklu miesięczkowego

Faza proliferacji

Na podstawie oceny poziomu transkryptu genu *HOXA11* w fazie proliferacji stwierdzono, iż jest on najniższy u kobiet z grupy kontrolnej. Wartość ta była istotnie statystycznie niższa ($p = 0,003$) w stosunku do kobiet z endometriozą. U kobiet z niepłodnością idiopatyczną stężenie *HOXA11* mRNA było wyższe w stosunku do grupy kontrolnej, niższe natomiast jak u pacjentek z endometriozą. Różnice nie były statystycznie istotne. (Rycina 1B).

Wczesna faza sekrecyjna

Poziom transkryptu genu *HOXA11* między 17 a 18 dniem cyklu był najniższy w grupie pacjentek z niepłodnością idiopatyczną, minimalnie wyższy u kobiet z grupy kontrolnej, najwyższy u chorych z endometriozą. Różnice w poziomie transkryptu pomiędzy badanymi grupami były niewielkie i nieistotne statystycznie. (Rycina 1B).

Środkowa faza sekrecyjna

W okresie okna implantacyjnego (19-22 dzień cyklu) najwyższy poziom mRNA genu *HOXA11* stwierdzono u pacjentek z grupy kontrolnej. Wartość ta była istotnie statystycznie wyższa w stosunku do poziomu stwierdzonego w grupie chorych z endometriozą ($p=0,018$). U kobiet z niepłodnością idiopatyczną stężenie *HOXA11* mRNA było niższe w stosunku do grupy kontrolnej, wyższe natomiast jak u pacjentek z endometriozą. Różnice nie były statystycznie istotne. (Rycina 1B).

Immunohistochemiczna ocena lokalizacji białka *HOXA11* w błonie śluzowej macicy w badanych grupach

Grupa kontrolna

Reakcja na obecność antygeny *HOXA11* lokalizowała się w jądrach komórek podścieliska *endometrium*, natomiast jądra komórek nabłonkowych cew gruczołowych i nabłonka wyścielającego jamę macicy pozostawały negatywne. (Rycina 2).

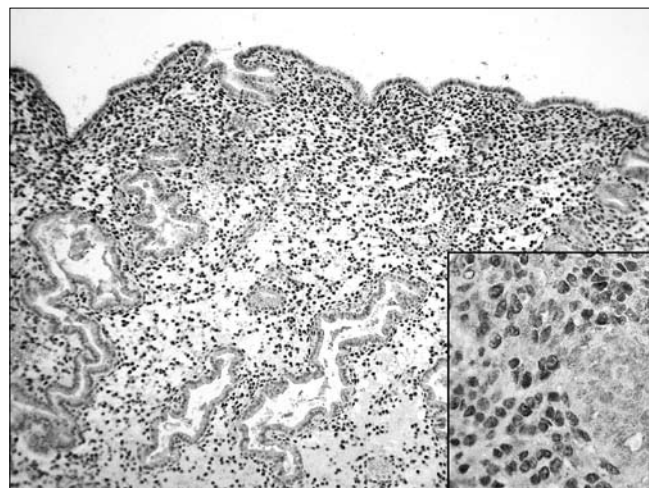
Rozłożenie pozytywnej immunoreakcji na terenie *endometrium* zależało od fazy cyklu.

W fazie proliferacji immunoreakcja na obecność białka *HOXA11* była bardzo słaba i tylko w pojedynczych komórkach lub zgrupowanych w gniazda. Wybarwiały się jądra komórkowe podścieliska zlokalizowane pod nabłonkiem wyścielającym jamę macicy. W fazie wczesnej sekrecji liczba komórek immunopozytywnych powiększyła się i nadal lokalizowała się głównie pod nabłonkiem. W obszarach podnabłonkowych ekspresja tego antygeny była najsilniejsza, natomiast w głębszych warstwach intensywność zabarwienia była wyraźnie słabsza. W miarę zaawansowania fazy cyklu obszar pozytywnej reakcji powiększał się obejmując głębsze warstwy *endometrium*, ale stopień ekspresji immunoreakcji nie zwiększał się i nie obejmował strefy bazalnej.

Grupa pacjentek z endometriozą

W grupie pacjentek z endometriozą intensywność immunoreakcji była wyraźnie wyższa w stosunku do grupy kontrolnej, a lokalizacja reakcji na terenie komórek była podobna jak w grupie kontrolnej. W komórkach podścieliska wybarwiały się tylko jądra na intensywnie brązowy kolor, natomiast komórki nabłonkowe cew gruczołowych i nabłonka wyścielającego jamę macicy były negatywne. Poza tym stwierdzono również różnice w rozłożeniu immunoreakcji w obszarze *endometrium* w zależności od fazy cyklu. (Ryc. 3).

W grupie z endometriozą pozytywna immunoreakcja obejmowała całą strefę funkcjonalną *endometrium* niezależnie od wczesnej i środkowej fazy cyklu. Ponadto obserwowano również pozytywną immunoreakcję w strefie bazalnej, czego nie zanotowano w grupie kontrolnej.



Rycina 2. *Endometrium* w środkowej fazie cyklu pacjentki grupy kontrolnej. Immunoreakcja z przeciwciałem anti-*HOXA11*; widoczne intensywne wybarwienie jąder komórek podścieliska z ich zagęszczeniem w strefie pod nabłonkiem wyścielającym jamę macicy. Nabłonki cew gruczołowych i wyścielający błonę śluzową jamy macicy są ujemne. Powiększenie ok. 200x. Obraz pod dużym powiększeniem ok. 400x widoczny w prawym, dolnym rogu.

Grupa pacjentek z niepłodnością idiopatyczną

Analizując nasilenie ekspresji badanego antygeny u kobiet z niepłodnością idiopatyczną nie stwierdzono różnic w stopniu ekspresji białka *HOXA11* w stosunku do grupy kontrolnej. Stwierdzono natomiast znaczne różnice w immunoreakcji tuż pod nabłonkiem błony śluzowej. U 32 z 48 (66,7%) kobiet z niepłodnością idiopatyczną nie stwierdzono immunoreakcji w komórkach podścieliska w tej strefie *endometrium* bądź występowała ona tylko w nielicznych jądrach komórkowych. (Rycina 4).

Dyskusja

Tylko nieliczne markery receptywności *endometrium* są rzeczywiście niezbędne dla procesu implantacji. Na podstawie przeprowadzonych badań wiadomo, iż po celowym wyeliminowaniu wielu istotnych dla tego procesu molekuł implantacja wciąż zachodzi prawidłowo [22]. Geny *HOXA* kodują czynniki transkrypcyjne, które są niezbędne dla procesu implantacji i prawdopodobnie koordynują rozwój *endometrium* w odpowiedzi na hormony steroidowe [16]. Zaburzoną ekspresję genów *HOXA* stwierdzono u kobiet z obniżonym odsetkiem implantacji. Uważa się, iż geny te są markerami receptywności a ich nieprawidłowa ekspresja może identyfikować kobiety z zaburzeniami implantacji [11].

W pracy porównano poziom *HOXA11* mRNA a także dokonano immunohistochemicznej oceny ekspresji i lokalizacji produktu białkowego genu *HOXA11* w *endometrium* w różnych fazach cyklu płciowego kobiet bez zaburzeń rozrodu oraz pacjentek z endometriozą i niepłodnością idiopatyczną. Z oczywistych względów (niemożność kilkukrotnej biopsji *endometrium* w czasie jednego cyklu płciowego u tej samej pacjentki) analizowano poziomy transkryptu w poszczególnych fazach cyklu w jednorodnych grupach chorych.

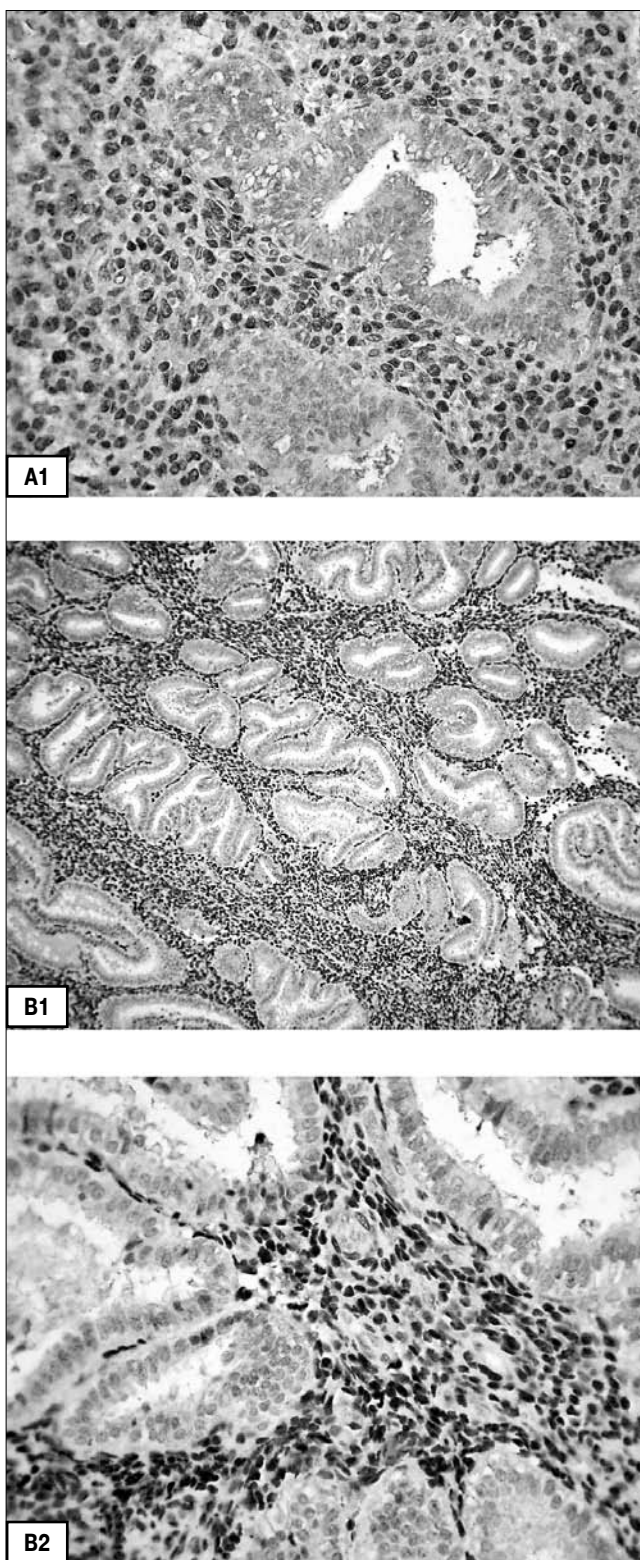
Przeprowadzone przez nas, przy użyciu metody RT-PCR badania, wykazały istotną statystycznie różnicę w poziomie HOXA11 mRNA w *endometrium* kobiet bez zaburzeń rozrodu między poszczególnymi fazami cyklu płciowego, z maksimum w okresie okna implantacyjnego. Podobne do naszych wyników uzyskał Wang i wsp. oraz Taylor i wsp., którzy badali ekspresję genu *HOXA11* w *endometrium* kobiet regularnie miesiączkujących [15, 23]. Autorzy ci ponadto wykazali ekspresję genu *HOXA11* w doczesnej co może wskazywać na fakt, że gen ten ma istotne znaczenie nie tylko w proliferacji, różnicowaniu oraz receptywności *endometrium* ale kontynuuje swoje działanie w ciąży. Analiza poziomu transkryptu genu *HOXA11* w *endometrium* kobiet z niepłodnością idiopatyczną podobnie jak w grupie kobiet bez zaburzeń rozrodu wykazała jego stopniowy wzrost w przebiegu cyklu płciowego. W tej grupie chorych podobnie jak w grupie kontrolnej maksymalny poziom HOXA11 mRNA stwierdzono w okresie okna implantacyjnego (różnica statystycznie istotna w stosunku do fazy proliferacyjnej).

W analizowanych fazach cyklu płciowego stwierdzono jednak niższą ekspresję genu *HOXA11* w grupie kobiet z niepłodnością idiopatyczną w stosunku do grupy kontrolnej. Różnice te nie były statystycznie istotne. W grupie kobiet z endometriozą nie stwierdzono wzrostu poziomu HOXA11 mRNA w okresie okna implantacyjnego. Podobne wyniki uzyskał Taylor i wsp. [15]. Na podstawie naszych badań stwierdziliśmy, iż u chorych z endometriozą ekspresja badanego genu była istotnie statystycznie niższa w stosunku do grupy kontrolnej zarówno w fazie proliferacji jak i w środkowej fazie sekrecyjnej.

W naszej pracy dzięki zastosowaniu metody immunohistochemicznej wykazano, iż immunoreakcja anty-HOXA11 występuje w jądrach komórek podścieliska *endometrium*. Zgodną z naszą immunolokalizację wskazali Taylor i wsp., natomiast wg innych autorów produkt białkowy HOXA11 jest obecny zarówno w jądrach komórkowych jak i cytoplazmie komórek podścieliska, gruczołach, nabłonku wyściełającym a nawet w naczyniach krwionośnych [10, 15, 23]. Najprawdopodobniej opisane różnice lokalizacji reakcji immunohistochemicznych wynikają z zastosowania przez autorów odmiennych technik badawczych. Wang i wsp. posługując się metodą hybrydizacji *in situ* wykazali silną ekspresję *HOXA11* w fazie proliferacji zarówno w nabłonku cew gruczołowych jak i w komórkach podścieliska [23].

Stężenie mRNA we wszystkich analizowanych przez nas grupach było niższe w fazie proliferacji w porównaniu z fazą sekrecji. Podobnie badania immunohistochemiczne w naszej pracy nie potwierdziły wysokich ekspresji *HOXA11* w fazie proliferacji. Uzyskane przez nas wyniki mogą sugerować, że aktywność *HOXA11* głównie wiąże się z procesem receptywności a w mniejszym stopniu z proliferacją *endometrium*. Ponadto rozmieszczenie białka HOXA11 jedynie w komórkach podścieliska nasuwa sugestie, że te komórki pełnią ważną rolę w utrzymaniu właściwej receptywności *endometrium* w okresie okna implantacyjnego. Natomiast układ cew gruczołowych bogatych w glikogen w fazie sekrecji może stanowić materiał energetyczny dla implantującego się zarodka.

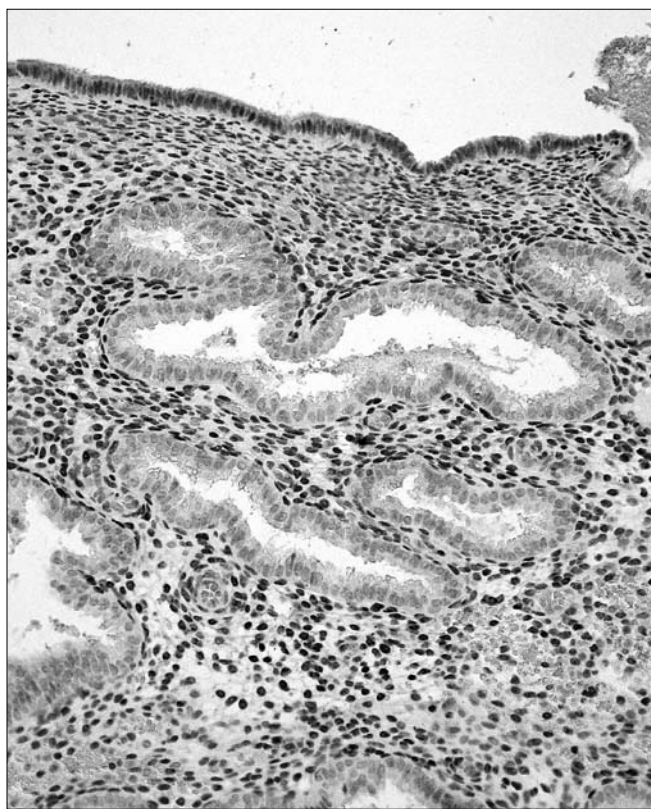
Przeprowadzone przez nas badania immunocytochemiczne wskazują na brak immunopoztywnej reakcji na białko HOXA11 w komórkach podścieliska w strefie podnabłonkowej jamy macicy w fazie sekrecji u 66,7% kobiet z niepłodnością idiopatyczną.



Rycina 3. *Endometrium* pacjentki z endometriozą. Widoczna jest intensywna immunoreakcja z przeciwciałem antyHOXA11 w fazie proliferacji (A1 – pow. 200x) i sekrecji (B1 – pow. ok. 200x i B2 – pow. ok. 400x). We wszystkich skrawkach tkankowych intensywna immunoreakcja widoczna w jądrach komórek podścieliska i ujemna w nabłonku cew gruczołowych.

Zarówno w grupie kobiet z endometriozą jak i niepłodnością idiopatyczną stwierdzono wzmożoną ekspresję białka HOXA11 w całej fazie lutealnej, nie stwierdzono również różnic w intensywności wybarwienia się komórek podścieliska pomiędzy wczesną fazą sekrecji a oknem implantacyjnym.

Na podstawie przeprowadzonych badań można twierdzić, że w okresie okna implantacyjnego, poziom HOXA11 mRNA jest obniżony zarówno w grupie kobiet z niepłodnością idiopatyczną, jak i u kobiet z endometriozą w stosunku do kobiet z niezaburzonym rozrodem. Powyższe wyniki sugerują, iż zarówno kobiety z endometriozą jak i niepłodnością idiopatyczną nie uzyskują optymalnej receptywności *endometrium* w okresie okna implantacyjnego. Jednak u kobiet z niepłodnością idiopatyczną stwierdza się w przeciwieństwie do kobiet z endometriozą stały wzrost poziomu HOXA11 mRNA w czasie cyklu płciowego. Powyższe obserwacje mogą wskazywać, iż zaburzona ekspresja genu *HOXA11* w *endometrium* kobiet z endometriozą może być jedną z przyczyn niemożności zajścia w ciążę w tych grupach pacjentek. Natomiast niemożność zajścia w ciążę u kobiet z niepłodnością idiopatyczną może być związana z obniżoną ekspresją genu *HOXA 11* tylko w wybranych sytuacjach. Trwa dyskusja nad mechanizmem obniżonej ekspresji genów w *endometrium*. Jedną z najbardziej powszechnych przyczyn powodujących zaburzenie ekspresji jest ich metylacja [24, 25].



Rycina 4. *Endometrium* pacjentki z idiopatyczną niepłodnością w środkowej fazie sekrecji. Reakcja z przeciwciałem antiHOXA11. Widoczny wyraźny brak reakcji w jądrach komórek podścieliska (na kolor niebieski wybarwione są jądra hematoksylina) w strefie pod nabłonkiem wyścielającym jamę macicy. Powiększenie ok. 200x.

Wnioski

Wyniki naszych badań sugerują, iż zaburzona ekspresja *HOXA11* w *endometrium* w środkowej fazie lutealnej może być powszechnym zjawiskiem wśród pacjentek z endometriozą. Dalsze badania powinny wyjaśnić czy obniżony poziom mRNA w *endometrium* kobiet z endometriozą jest rezultatem zjawisk epigenetycznych.

Podziękowania

Praca powstała w oparciu o granty Ministerstwa Nauki i Edukacji NN407162633 i UE 162/E-392/CD/DFS-4/2004

Piśmiennictwo

- Adamson G, Baker V. Subfertility: causes, treatment and outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003, 17, 169-185.
- Olive D, Lindheim S, Pritts E. Endometriosis and infertility: what do we do for each stage? *Curr Womens Health Rep.* 2003, 3, 389-394.
- Wei Q, Clair JB, Fu T, [et al.]. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2009, 91, 1686-1691.
- Arici A, Oral E, Bukulmez O. The effect of endometriosis on implantation. Result from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril.* 1996, 65, 603-607.
- Hahn D, Carraher R, Foldes R. Experimental evidence for failure to implant as a mechanism of infertility associated with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1986, 155, 1109-1113.
- Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J. The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on reproductive potential of infertile women – a prospective study. *Am J Reprod Immunol.* 2007, 58, 65-74.
- Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M, [et al.]. TGF superfamily and MMP2, MMP9, TIMP1 genes expression in the endometrium of women with impaired reproduction. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007, 45, 143-148.
- Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M. Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility? *Am J Reprod Immunol.* 2007, 57, 40-48.
- Skrzypczak J, Wirstlein P, Mikolajczyk M. Is glyodelin an important marker of endometrial receptivity? *Ginekol Pol.* 2005, 76, 770-781. Polish.
- Godbole G, Modi D, Puri C. Regulation of homeobox A10 expression in the primate endometrium by progesterone and embryonic stimuli. *Reproduction.* 2007, 134, 513-523.
- Daftary G, Taylor H. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocrine Reviews.* 2006, 27, 331-355.
- Gendron R, Paradis H, Hsieh-Li H. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in *hoxa-11* null mice. *Biol Reprod.* 1997, 56, 1097-1105.
- Benson G, Lim H, Paria B, [et al.]. Mechanisms of reduced fertility in *Hoxa-10* mutant mice: uterine homeostasis and loss of maternal *Hoxa-10* expression. *Development.* 1996, 58, 337-347.
- Kwon H, Taylor H. The role of HOX genes in human implantation. *Ann NY Acad Sci.* 2004, 1034, 1-18.
- Taylor H, Bagot C, Kardana A, [et al.]. HOX gene expression is altered in endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 1999, 14, 1328-1331.
- Taylor H, Igarashi P, Olive D, [et al.]. Sex steroids mediate HOXA 11 expression in the human peri implantation endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84, 1129-1135.
- Noyes R, Hertig A, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril.* 1950, 1, 3-25.
- http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
- <http://medgen.ugent.be>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, [et al.]. Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. *Postępy Hig Med Dosw.* 2007, 61, 500-510. Polish.
- Kao L, Tulac S, Lobo S, [et al.]. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology.* 2002, 143, 2119-2138.
- Wang L, Luo Z, Zhu Z, [et al.]. Expression of HOXA 11 gene in human endometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 191, 767-772.
- Kim J, Taylor H, Ladhani O, [et al.]. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13, 323-332.
- Wu Y, Halverson G, Basir Z, [et al.]. Aberrant methylation at HOXA 10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 193, 371-380.