

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

**MEKANISME STRES RETKULUM ENDOPLASMIK DAN EKSPRESI
CYCLIN D2 TERHADAP PERUBAHAN SIKLUS SEL GRANULOSA
OVARIUM WANITA ENDOMETRIOSIS DENGAN INFERTILITAS**



JIMMY YANUAR ANNAS

**PROGRAM PASCA SARJANA ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS PASCA SARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2018

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

**MEKANISME STRES RETKULUM ENDOPLASMIK DAN EKSPRESI
CYCLIN D2 TERHADAP PERUBAHAN SIKLUS SEL GRANULOSA
OVARIUM WANITA ENDOMETRIOSIS DENGAN INFERTILITAS**

JIMMY YANUAR ANNAS

**PROGRAM PASCA SARJANA ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS PASCA SARJANA UNIVERSITAS AIRLANGGA**

SURABAYA

2018

IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**MEKANISME STRES RETKULUM ENDOPLASMIK DAN EKSPRESI CYCLIN
D2 TERHADAP PERUBAHAN SIKLUS SEL GRANULOSA OVARIUM
WANITA ENDOMETRIOSIS DENGAN INFERTILITAS**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Dan dipertahankan dihadapan
Panitia ujian Akhir Tahap II (Terbuka)**

**Hari : Jumat
Tanggal : 28 September 2018
Jam : 09.00**

Oleh:

**JIMMY YANUAR ANNAS
NIM 090970155**

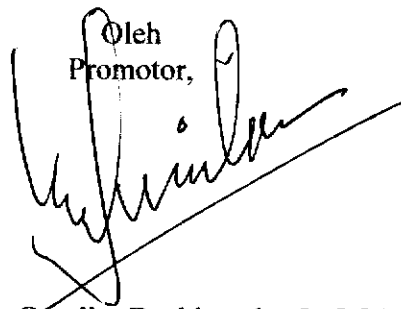
**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2018**

LEMBAR PENGESAHAN

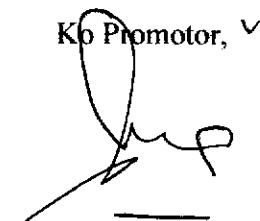
DISERTASI

**MEKANISME STRES RETKULUM ENDOPLASMIK DAN EKSPRESI CYCLIN
D2 TERHADAP PERUBAHAN SIKLUS SEL GRANULOSA OVARIUM
WANITA ENDOMETRIOSIS DENGAN INFERTILITAS**

TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 3 AGUSTUS 2020

Oleh
Promotor,


Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG(K)
NIP. 19490813 197811 1 001

Ko Promotor, ✓


Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K)
NIP. 19610817 198802 1 002

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya, (Jimmy yanuar annas, 090970155, menyatakan bahwa:

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar benar hasil karya saya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatasnamakan saya serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiarism*) dari karya orang lain.

Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapat gelar akademik baik di universitas Airlangga maupun di perguruan tinggi lainnya.

2. Dalam disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan degna disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka

3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar benarnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis disertasi ini serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 28 September 2018

Pernyataan ini dibuat oleh,



Jimmy yanuar annas

NIM 090970155

Lembar penetapan panitia penguji

**Disertasi ini telah disetujui dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)
Pada tanggal 13 September 2018**

Panitia penguji

Ketua : Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan dr., M.Sc., Spar(K)

Anggota : Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG(K)

Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K)

Prof. Dr. Soegiharto Soebijanto, dr., SpOG(K)

Dr. Widjiati, drh., MSi.

Prof. Retno Handayani, dr., MS., Ph.D

Prof. Dr. Kuntoro, dr., MPH., DR.PH

Ditetapkan dengan surat keputusan

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Tentang Panitia Penguji Disertasi

Nomor 273/UN3.1.1/KD/2018

Tanggal 5 September 2018

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil ‘Aalamiin, puji syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Tidak lupa shalawat serta salam saya sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW.

Disertasi ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari Penasihat Akademik, Promotor, Ko Promotor dan Tim Penguji, oleh karena itu pada kesempatan ini dengan segala kerendahan hati, perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., SpOG(K) sebagai Promotor disertasi ini, yang dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran memberikan dukungan mental, meluangkan waktu untuk berdiskusi dan memberi masukan untuk kesempurnaan disertasi ini.

Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K), Ketua Departemen/SMF obstetri dan ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang sekaligus sebagai Ko promotor pada disertasi ini, yang telah memberikan masukan penting dan sangat mendasar dari bidang keahliannya yang sangat bermanfaat bagi peningkatan mutu disertasi ini.

Dengan selesainya penelitian ini perkenankanlah saya juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT.Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga, dan Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt., mantan Rektor Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Soetojo dr., SpU(K), selaku Dekan Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., SpPD.K-EMD. FINASIM selaku mantan Dekan: Prof. Dr. David Sontani Perdanakusuma, dr., SpBP-RE(K) selaku Wakil Dekan I dan Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr., MS selaku mantan Wakil Dekan I; Prof. Dr. Budi Santosos, dr. SpOG (K) selaku Wakil Dekan II dan Prof. Djoko Santoso, dr. PHD., SpPD. K-GH.FINASIM selaku mantan Wakil Dekan II; Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., SpMK(K) selaku Wakil Dekan III dan Prof. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK(K) selaku mantan Wakil Dekan III beserta seluruh jajarannya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr.,M.Sc.,Sp.PD-KR, FINASIM, selaku KPS Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor dan Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., SpA(K),SpJP, FIHA, serta Prof. Dr. Harjanto J.M., dr., AIFM selaku mantan Koordinator Program Studi, yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk menyelesaikan disertasi.

Harsono,dr., selaku Direktur RSUD Dr. Soetomo dan Dodo Anondo, dr., MPH selaku mantan Direktur RSUD Dr. Soetomo atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Yoes Prijatna Dachlan dr. MSc, selaku staf pengajar Departement/SMF Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang bersedia menjadi penguji dan memberi masukan demi kesempurnaan disertasi ini.

Prof. Dr. Soegiarto Soebijanto, dr., SpOG(K), selaku staf pengajar Departement/SMF Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, yang bersedia menjadi penguji dan memberi masukan demi kesempurnaan disertasi ini.

Dr. Widjiati, drh, MSi selaku staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya, yang bersedia menjadi penguji dan memberi masukan demi kesempurnaan disertasi ini.

Prof. Dr. Kuntoro, dr., MPH, DR.PH , selaku staf pengajar Fakultas Kedokteran Masyarakat Universitas Airlangga Surabaya, yang bersedia menjadi penguji dan memberi masukan demi kesempurnaan disertasi ini.

Prof. Retno Handayani, dr., MS., Ph.D selaku staf pengajar Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang bersedia menjadi penguji dan memberi masukan demi kesempurnaan disertasi ini.

Prof. Prajitno Prabowo, dr., SpOG(K), Prof. Samsulhadi, dr., SpOG(K), Prof. Lila Dewata, dr., SpOG(K), dan Prof. Soehartono DS, dr., SpOG(K), selaku Guru Besar di Divisi Fertilitas Endokrin Reproduksi serta Relly Januari Primariawan, dr. SpOG(K) selaku Kepala Divisi Fertilitas Endokrin Reproduksi dan semua teman teman di divisi Fertilitas Endokrin Reproduksi, Dr. Sri Ratna Dwiningaih, dr SpOG(K), Dr. Ashon Sa'adi, dr., SpOG (K), M. Y. Ardianta Widyanugraha, dr., SpOG, Arif Tunjung Seto, dr., SpOG, yang telah memberi kesempatan kepada saya menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Seluruh Guru Besar dan staf pengajar di Departemen/SMF Obstetri dan Ginekologi RSUD Dr Soetomo – FK UNAIR yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, atas segala kerjasama, bimbingan, motivasi dan dorongan yang diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan jenjang doktor.

Seluruh staf pengajar di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Purnomo Suryohusodo, dr., SpBK; Prof. Dr. Suhartono

Taat Putra, dr., MS; Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh.; Prof. Dr. I Ketut Suidiana, drs., Msi; Prof. Dr. Zainuddin, Apt.; Prof Dr. Juliati Hood Asegaf, dr., MS., SpPA(K), FIAC; Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr. PH; Widodo JP, dr., MPH., Dr. PH; Siti Pariani, dr., MS., M.Sc, PhD; Dr. Sunarjo, dr., MS., M.Sc; Dr. F. Sustini, dr., MS.; Dr. F.M Judajana, dr., SpPK(K); Toetik Koesbardiati, dra., PhD; Prof. Dr. Harjanto J.M., dr., AIFM; Prof. Dr Siswandono, Apt., MS; Prof. Dr. Joes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., SpPar(K) yang telah memberikan ilmu pengetahuan dasar dan terapan yang sangat berharga dan bermanfaat membantu saya dalam menyusun disertasi ini.

Seluruh staf di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas segala bantuannya kepada saya dalam kelancaran administrasi pendidikan.

Seluruh rekan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah bekerja sama dan saling memotivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Akhirnya dalam kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang kepada:

Orang tua saya, Prof. Samsulhadi, dr., SpOG(K) dan Ani rahayu, drg., Sp.Ort. yang telah mengasuh, mendidik, mengayomi, memberikan doa restu dan memberi teladan yang baik dengan penuh kasih sayang hingga saat ini. Juga kepada mertua saya, ayahanda Ir. Drs. H. Mujianto (Alm) dan dra. Hj. Hermin rahmawati yang telah memberikan dukungan moral dalam menjalani pendidikan.

Juga pada Kakak Ipar Nova wisnu wardhana dan adik ipar Satriyo murti pamungkas atas dukungan yang diberikan selama ini

Istri saya tercinta Dini octavia sitaresmi, dr. yang senantiasa memberikan semangat untuk menyelesaikan disertasi ini, serta memberikan dukungan dan doa. Dan kepada kedua putri saya

Nasya selensafir yasarmeita dan Maritza yasaralesha rayansita yang menjadi sumber semangat untuk menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih juga kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memotivasi, mendukung, dan membantu hingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Semoga disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi umat manusia dan kemajuan ilmu kedokteran pada khususnya. Semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala selalu melimpahkan taufik dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikan disertasi ini. Amiin.

Surabaya, Agustus 2018

Penulis.

RINGKASAN

Endometriosis merupakan penyakit yang menimbulkan reaksi inflamasi kronis dan dapat mengganggu fungsi reproduksi wanita. Pada wanita endometriosis, fekunditas lebih rendah 50% dan bahkan angka kehamilan program Teknik Reproduksi Berbantu (TRB) lebih rendah dibanding non endometriosis. Respon ovarium pada wanita endometriosis juga terganggu. Buktinya adalah pada stimulasi ovulasi didapatkan durasi stimulasi ovulasi yang lebih lama, dosis gonadotropin yang lebih tinggi dan kadar estrogen saat penentuan yang lebih rendah dibanding non endometriosis. Gangguan folikulogenesis dan respon ovarium pada endometriosis ini belum diketahui sebabnya. Folikulogenesis yang baik harus didukung oleh proliferasi, steroidogenesis, serta komunikasi sel granulosa dengan oosit yang optimal. Beberapa penelitian mendapatkan tanda penurunan Folikulogenesis berupa *Growth Differentiation Factor 9* (GDF9) dan *Anti Mullerian Hormone* (AMH) yang rendah pada endometriosis. Namun disisi lain *Antral Follicle Count* (AFC) dan estrogen tidak menunjukkan perubahan yang berarti. Hal ini belum diketahui sebabnya. *Anti Mullerian Hormone* dihasilkan oleh sel yang mempunyai aktivitas proliferasi atau mitosis tinggi. Kemungkinan ada gangguan pada proliferasi sel granulosa wanita endometriosis dan belum ada data bagaimana gambaran siklus sel granulosa pada wanita endometriosis dibanding non endometriosis.

Retikulum endoplasmik (RE) merupakan organel penting di sel granulosa untuk sekresi hormon. Retikulum Endoplasmik bertanggung jawab terhadap *folding* rantai asam amino menjadi protein fungsional dan dapat berikatan dengan reseptornya. Stres oksidatif atau kondisi lingkungan yang merugikan lainnya dapat mengganggu aktivitas *folding protein* sehingga terjadi akumulasi *unfolded protein* dan memicu *Unfolded Protein Response* (UPR). *Unfolded Protein Response* ini akan menyebabkan peningkatan *Glucose Related Protein 78* (GRP78) untuk berusaha

meningkatkan kapasitas *folding* serta mengurangi lalu lintas lumen RE dengan atenuasi translasi global melalui *Protein kinase RNA- like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) dan *Eukaryotic translation initiation factor 2 α* (eIF2 α). Bila sel sudah tidak mampu beradaptasi, maka akan menginisiasi apoptosis melalui *C/EBP Homologous Protein* (CHOP). Endometriosis adalah inflamasi kronis yang ditandai peningkatan *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) di zalir peritoneum. Inflamasi ini kemungkinan dapat mempengaruhi aktivitas proliferasi sel granulosa di ovarium yang secara anatomis berada di kantung Douglas dan terjadi kontak terus menerus dengan implan endometriosis dan zalir peritoneum. Penelitian ini mempelajari pengaruh TNF α zalir peritoneum terhadap sel granulosa dari zalir folikel dominan di ovarium wanita endometriosis.

Ini adalah penelitian observasional dengan studi potong lintang. Studi ini dilaksanakan bulan Januari 2016 hingga Mei 2018. Tujuh belas wanita pasangan infertilitas yang di laparoskopi pada saat ditemukan folikel 17mm dari Ultrasonografi (USG) di Poli Fertilitas Graha Amerta, RSUD Dr Soetomo Surabaya. Dilakukan aspirasi zalir peritoneum & zalir folikel dominan. Kadar TNF α di zalir peritoneum di periksa dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Sel granulosa diisolasi dari zalir folikel dan dievaluasi ekspresi mRNA GRP78, eIF2 α dan CHOP diperiksa dengan *Real time Polymerase Chain Reaction* (qPCR), Siklus sel dengan *Flowcytometry*. Protein *Cyclin D2* dievaluasi dengan *Western blotting* (WB).

Kami mendapatkan 13 wanita endometriosis dan empat wanita non endometriosis. Kadar TNF α di zalir peritoneum lebih tinggi pada kelompok endometriosis (48,66 \pm 3,9 ng/mL) dibanding non endometriosis (37,6 \pm 3,8), $p < 0,001$. Pada Sel granulosa zalir folikel dominan kelompok endometriosis didapatkan ekspresi mRNA GRP78 3,32 kali, eIF2 α 8,54 kali, dan CHOP 1,78 kali lipat lebih tinggi dibanding kelompok non endometriosis. Ekspresi *Cyclin D2* kelompok endometriosis lebih tinggi 97,056% dibanding non endometriosis 86,217% walaupun secara

statistik tidak signifikan. Sel granulosa menunjukkan pada endometriosis fase G0/G1 lebih tinggi, fase S dan M lebih rendah dibanding non endometriosis ($p < 0,001$). Analisis jalur mendapatkan kadar TNF α di zalir peritoneum menyebabkan perubahan ekspresi mRNA GRP78 disel granulosa yang diisolasi dari zalir folikel dominan.

Kantung Douglas merupakan daerah yang paling rendah di rongga pelvis. Ovarium berada di *fossa ovarika* yang selalu terendam dalam zalir peritoneum. 70-80% implan endometriosis menyebar di bagian belakan dinding uterus, ligamen sakrouterina, fosa ovarika dan bahkan di permukaan ovarium. Penelitian ini menunjukkan kadar TNF α zalir peritoneum yang lebih tinggi dibanding non endometriosis. Untuk mengetahui Stres RE dan siklus sel granulosa, kami melakukan isolasi sel granulosa dari zalir folikel dominan yang kemudian dilakukan pemeriksaan qPCR dan *flowcytometry* untuk evaluasi mRNA GRP78, CHOP, eIF2 α dengan tujuan untuk mengetahui gambaran *chaperone residence endoplasmic reticulum* dan siklus sel granulosa. Pemeriksaan qPCR menunjukkan *fold changes* mRNA GRP78, CHOP, eIF2 α pada sel granulosa wanita endometriosis lebih tinggi dibanding non endometriosis. Paparan TNF α di zalir peritoneum kemungkinan dapat menyebabkan stres oksidatif intraseluler di sel granulosa. Stres oksidatif ini dapat menyebabkan akumulasi *unfolded protein* di lumen RE dan mengaktivasi UPR yang berusaha memperbaiki *unfolded protein* dengan meningkatkan GRP78, bersamaan dengan itu PERK akan memfospforilasi eIF2 α dan terjadi atenuasi translasi global yang berdampak pada penekanan *Cyclin D2* dan siklus sel granulosa.

Walaupun ekspresi mRNA GRP78 dan eIF2 α lebih tinggi, pada penelitian ini ternyata ekspresi *Cyclin D2* lebih tinggi dibanding non endometriosis. Bahan sampel penelitian ini diambil pada akhir fase folikuler dimana kadar estrogen juga tinggi. Pengaruh positif *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan estrogen pada *Cyclin D2* kemungkinan dapat melebihi pengaruh negatif

supresi dari Stres RE. Dampak stres RE ternyata masih dapat menyebabkan perubahan siklus sel granulosa ovarium walaupun ekspresi *Cyclin D2* wanita endometriosis lebih tinggi. Hal ini kemungkinan stres RE menyebabkan faktor lain ikut menghambat laju siklus sel. Analisis jalur menunjukkan bahwa TNF α zaliir peritoneum berpengaruh terhadap GRP78 di sel granulosa dan TNF α pada penelitian ini meningkat sejalan dengan derajat endometriosis berdasarkan *Revised American Fertility Society (R-AFS)*. *Tumor Necrosis Factor α* zaliir peritoneum menyebabkan stres RE serta menunjukkan perubahan siklus sel granulosa. *Glucose Related Protein 78 (GRP78)* masih mampu menanggulangi akumulasi *unfolded protein* di lumen RE sehingga pengaruhnya lebih kearah atenuasi translasi global dibanding apoptosis.

Penelitian ini menunjukkan bahwa endometriosis mempunyai dampak yang negatif pada sel granulosa folikel dominan. Sel granulosa mempunyai peran steroidogenesis pada folikulogenesis dan komunikasi dengan sel oosit pada oogenesis. Stres RE pada sel granulosa ini bisa saja merupakan dasar terjadinya infertilitas pada wanita endometriosis derajat minimal hingga *moderate*.

SUMMARY

Endometriosis is a disease that causes chronic inflammatory reactions and can interfere with female reproductive function. In women with endometriosis, fecundity is 50% lower and the pregnancy rate of the Assisted Reproductive Technique (ART) program is even lower than in non-endometriosis. Ovarian response in women with endometriosis is also impaired, as with longer duration of ovulation stimulation, the gonadotropin dose is found to be higher and the estrogen level is lower than in non-endometriosis. The cause of this disturbance in folliculogenesis and ovarian response to endometriosis is unknown. Reliable folliculogenesis must be supported by optimal proliferation, steroidogenesis, and communication between granulosa cells and oocytes. Several studies have found signs of decreased folliculogenesis in the form of low Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) and Anti Mullerian Hormone (AMH) in endometriosis. However, on the other hand, Antral Follicle Count (AFC) and estrogen did not show significant changes. The cause of this has not been identified. Anti Mullerian Hormone is produced by cells that have high proliferation or mitotic activity. Possibly, there is a disruption in the proliferation of granulosa cells in endometriotic women. However, data regarding the profile of granulosa cell cycle in women with endometriosis compared to non-endometriosis are still lacking.

The endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle in granulosa cells for hormone secretion. The endoplasmic reticulum is responsible for folding amino acid chains into functional proteins and can bind to their receptors. Oxidative stress or other adverse environmental conditions can interfere with protein folding activity, resulting in the accumulation of unfolded protein and triggering the Unfolded Protein Response (UPR). Unfolded Protein Response will cause an increase in Glucose Related Protein 78 (GRP78) to increase folding capacity and reduce RE lumen

traffic with global translational attenuation through protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α). When cells are unable to adapt, cells will initiate apoptosis through C/EBP Homologous Protein (CHOP). Endometriosis is a chronic inflammation characterized by an increase in Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) in the peritoneal fluid. This inflammation is likely to affect the proliferation of granulosa cell activity in the ovaries that are anatomically situated in the Douglas pouch and there is continuous contact with endometriosis implant and peritoneal fluid. This study studied the effect of TNF- α of the peritoneal fluid on granulosa cells from the dominant follicular fluid in the ovaries of women with endometriosis.

This was an observational study with cross-sectional design. This study was conducted from January 2016 to May 2018 involving 17 female infertility couples who underwent laparoscopy when a 17 mm follicle was found with ultrasonography (USG) at the Fertility Clinic, Graha Amerta, Dr. Soetomo Regional Hospital, Surabaya, Indonesia. Aspiration of the peritoneal fluid and dominant follicular fluid was performed. TNF- α level in the peritoneal fluid was checked by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Granulosa cells were isolated from follicular fluid and the expression of GRP78, eIF2- α and CHOP mRNA was examined by Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), and cell cycle by Flowcytometry. Cyclin D2 protein was evaluated by Western blotting (WB).

We identified 13 women with endometriosis and four women without endometriosis. TNF- α levels in the peritoneal fluid were higher in the endometriosis group (48.66 ± 3.9 ng/mL) than in non-endometriosis (37.6 ± 3.8), $p < 0.001$. In the endometriosis group, the dominant follicle fluid granulosa cells showed mRNA expression of GRP78 3.32 times, eIF2- α 8.54 times, and CHOP 1.78 times higher than in non-endometriosis group. Cyclin D2 expression in the endometriosis

group was 97.056% higher than in the non-endometriosis group which was 86.217%, although it was not statistically significant. In the endometriosis group, granulosa cells showed higher G0/G1 phase and lower S and M phases than in non-endometriosis group ($p < 0.001$). Path analysis revealed that TNF- α level in peritoneal fluid influenced changes in GRP78 mRNA expression in granulosa cells isolated from dominant follicular fluid.

Douglas pouch is the lowest area in the pelvic cavity. The ovaries are in the ovarian fossa which is always submerged in the peritoneal fluid. Seventy to eighty percent of endometriosis implants spread at the back of the uterine wall, the sacrouterine ligaments, ovarian fossae and even on the surface of the ovary. This study showed a higher level of peritoneal fluid TNF- α than in non-endometriosis. To identify ER stress and the granulosa cell cycles, we isolated granulosa cells from dominant follicular fluid and then performed qPCR examination.

Although mRNA expression of GRP78 and eIF2- α was higher, this study found that Cyclin D2 expression was higher than in non-endometriosis. The study samples were taken at the end of the follicular phase when estrogen levels were also high. The positive effects of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and estrogen on Cyclin D2 may outweigh the negative effects of the suppression of ER stress. The impact of ER stress can still cause changes in ovarian granulosa cell cycles, although the expression of Cyclin D2 in endometriosis women is higher. This is probably because ER stress causes other factors to participate in inhibiting the rate of cell cycle. Path analysis showed that TNF- α of the peritoneal fluid affected GRP78 in granulosa cells and TNF- α in this study increased in line with the degree of endometriosis according to the Revised American Fertility Society (R-AFS). Tumor Necrosis Factor- α of the peritoneal fluid causes ER stress and shows changes in granulosa cell cycle. Glucose Related Protein 78 (GRP78) is still able to

overcome the accumulation of unfolded protein in ER lumen so that the effect is more towards global translational attenuation than towards apoptosis.

This study showed that endometriosis had a negative impact on the dominant follicular granulosa cells. Granulosa cells have a role for steroidogenesis in folliculogenesis and communication with oocyte cells in oogenesis. The ER stress in granulosa cells may be the basis for infertility in women with minimal to moderate endometriosis.