

## Bab 1

### Pendahuluan

#### 1.1 Latar Belakang.

Endometriosis merupakan penyakit ginekologi yang paling sering ditemui pada wanita usia reproduksi. Dampak endometriosis terhadap fungsi reproduksi cukup berat. Hal ini terbukti dari didapatkannya penurunan fekunditas (2-10%) dan keberhasilan pada Teknologi Reproduksi Berbantu (TRB) yang menurun 50% dibanding wanita non endometriosis (Fritz et al 2011).

Pada Endometriosis tingkat lanjut, penurunan kesuburan ini disebabkan oleh distorsi anatomi akibat adanya perlekatan di peritonium dan *tuba fallopii*. Mekanisme endometriosis ringan dan sedang, menyebabkan infertilitas belum diketahui. Fenomena tersebut menunjukkan bahwa infertilitas pada wanita endometriosis bukan hanya disebabkan oleh gangguan anatomi akibat perlekatan dan tumor. Pada wanita endometriosis ringan dan sedang ternyata didapatkan periode folikulogenesis yang lebih lama, laju pertumbuhan folikel dominan yang lebih lambat secara signifikan serta angka fertilisasi yang menurun dibanding wanita infertilitas akibat faktor lain (Gupta *et al.*, 2008; Hendarto, 2012). Pada TRB, durasi stimulasi lebih lama (11 vs 10 hari), dosis obat stimulasi ovulasi yang diperlukan lebih tinggi (39 vs 34,1 ampul) dan kadar estrogen serum yang lebih rendah (3955 vs 4479 ng/mL) dibandingkan wanita infertilitas faktor *tuba fallopii* (Dong *et al* 2013). Hendarto *et al* 2009 mendapatkan *Growth Differentiation Factor 9* (GDF9) folikel wanita endometriosis lebih rendah dibanding non endometriosis sedangkan Lemos *et al* 2008 mendapatkan kadar serum *Anti Mullerian Hormone* (AMH) wanita endometriosis *minimal* dan *mild* lebih rendah dan diameter folikel preovulatoir lebih kecil dibanding non endometriosis. *Anti Mullerian Hormone* adalah hormon yang dikeluarkan oleh sel granulosa yang sedang berproliferasi, hal

ini menunjukkan bahwa salah satu penyebab penurunan respon ovarium pada endometriosis adalah gangguan mitosis di sel granulosa yang pada akhirnya dapat mengganggu folikulogenesis. **Belum ada penjelasan penyebab gangguan proliferasi sel granulosa pada wanita endometriosis.**

Sel granulosa adalah sel yang mempunyai peran besar terhadap sistem endokrin di reproduksi wanita. Aktivitas steroidogenesis sel granulosa ini dapat memberikan umpan balik tentang informasi laju folikulogenesis dan maturasi oosit pada sistem saraf pusat yang dikenal dengan sistem *Hipotalamus - Pituitari – Ovarium* (HPO) (Fritz *et al* 2011). Hormon estrogen yang merupakan hormon seks steroid yang diproduksi oleh sel granulosa mempunyai peran penting untuk mempersiapkan implantasi di endometrium, komunikasi HPO, memacu proliferasi sel granulosa itu sendiri sehingga sering dipakai sebagai parameter laju pertumbuhan folikel pada program stimulasi ovulasi. Retikulum Endoplasmik (RE) merupakan salah satu organel didalam sitoplasma yang berperan penting pada sintesa protein terutama sel yang mempunyai fungsi endokrin seperti sel granulosa (Alberts *et al* 2008, Schroder, 2008).

Retikulum Endoplasmik mempunyai fungsi untuk memodifikasi asam amino setelah disintesa oleh ribosom sehingga menjadi protein dapat menjalankan fungsinya. Kinerja dari RE ini sangat tergantung dengan kondisi lingkungan sel (Alberts *et al* 2008). Adanya stress oksidatif, peningkatan asam lemak dan hipoksia dapat menyebabkan kegagalan memodifikasi protein dan menyebabkan *Unfolded protein* dapat memicu terjadinya respon stress retikulum endoplasmik untuk mengurangi akumulasi *unfolded protein* serta terjadi penekanan *cap-dependent translation* yang berakibat penurunan sintesa protein. Bila stress ini berkepanjangan justru menyebabkan apoptosis (Schroder, 2008). Liu *et al.* (2012) membuktikan bahwa hipoksia pada testis tikus *Sprague-Dawley* dapat menyebabkan peningkatan beberapa petanda stress retikulum endoplasmik yaitu *Binding immunoglobulin protein* (Bip), *Protein Kinase*

*RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) dan *C/EBP Homologous Protein* (CHOP). Stress retikulum endoplasmik pada testis tikus menyebabkan penurunan aktifitas *Steroidogenesis acute regulatory protein* (StAR), *3 Beta Hidroxy steroid dehidrogenase* (3B-HSD) dan diikuti penurunan kadar *testosterone*. Pengamatan pada sel granulosa mencit C57BL6 oleh Babayev *et al.* (2014) menunjukkan bahwa pemberian *Tunicamycin* dan *Thapsigargin* (*Non competitive inhibitor of ER Ca ATPase*) dapat menimbulkan stress RE dan menekan aktifitas steroidogenesis enzim CYP19a1. Stimulasi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) pada saat terjadi stress retikulum endoplasmik dapat menyebabkan apoptosis.

Studi lain yang dilakukan oleh Hamanaka *et al.* (2005) bahwa peningkatan PERK pada stress RE akan memfosforilasi *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A* (*eIF2 $\alpha$* ) yang kemudian terjadi penurunan *Cyclin D1* dan mengakibatkan berhentinya siklus sel fibroblast pada stadium G1. L. Wu *et al.* (2012) mendapatkan bahwa asam palmitik memicu Stress RE (*Activating Transcription Factor 6* (ATF6), *Activating Transcription Factor 4* (ATF4), *X-box Binding Protein 1* (XBP1s) dan Bip pada kompleks kumulus dan menyebabkan penurunan angka fertilisasi dan gangguan perkembangan. Pemberian salubrinal (*Specific inhibitor of eIF2 $\alpha$* ) sebagai anti stress RE dapat memperbaiki angka fertilisasi dan perkembangan embryo (Wu. *et al* 2012).

Dari beberapa pengamatan diatas tersebut membuktikan bahwa terjadinya stress RE yang berkepanjangan dapat menyebabkan dampak yang merugikan bagi sistem reproduksi. Kondisi lingkungan yang kaya akan senyawa stress oksidatif dapat sebagai pemicu terjadinya akumulasi *unfolded protein* di RE dan mengaktifasi reaksi stress RE. Jeanson *et al.* (2011) mendapatkan bahwa pada *in vitro*, stress oksidatif dapat mengaktifasi Bip / *Glucose Related Protein 78 kDa* (GRP78), XBP1s, *Glucose Related Protein 94 kDa* (GRP94) dan *calreticulin*. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) diantaranya adalah stimulasi *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ). *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  dapat

memicu peningkatan produksi ROS intraseluler oleh mitokondria kemudian dapat menyebabkan Stress retikulum endoplasmik (Kim *et al.*, 2010). Hal tersebut menunjukkan bahwa paparan terhadap TNF $\alpha$  dapat memicu peningkatan ROS intraluler dan menyebabkan akumulasi *Unfolded protein* kemudian menyebabkan stres RE yang berdampak terhadap penurunan sintesa protein, bahkan terjadi apoptosis.

Zalir peritoneum pada wanita endometriosis kaya akan sitokin proinflamasi. Sitokin ini berasal dari interaksi yang terus menerus antara lesi endometriosis dan sel makrofag di peritoneum. Pada implan lesi endometriosis terjadi aktivasi yang terus menerus pada *Nuclear Factor Kappa B* (NF $\kappa$ B) yang merupakan faktor transkripsi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Kadar TNF $\alpha$  pada zalir peritonium wanita endometriosis lebih tinggi dibanding wanita infertilitas faktor *tuba fallopii*. Kadar TNF $\alpha$  ini mempunyai kontribusi terhadap patogenesis terjadinya implan lesi endometriosis diperitoneum. Kadar TNF $\alpha$  di peritoneum ini meningkat sesuai dengan derajat endometriosis berdasarkan *Revised American Fertility Society* (R-AFS).

Disisi lain, ovarium secara anatomis berada di bagian paling rendah dari rongga pelvis dan terendam dalam cairan peritonium yang kaya akan sitokin proinflamasi khususnya TNF $\alpha$ . 70% lesi endometriosis berada di rongga pelvis khususnya kantung Douglas dimana lokasi tersebut sangat berdekatan dengan ovarium tempat dimana terjadi folikulogenesis, steroidogenesis dan oogenesis (Donnez *et al* 2004). Sel granulosa merupakan sel sekretorik tempat terjadinya steroidogenesis. Peran Retikulum endoplasmik sangat besar pada sel sekretorik dan rentan terjadi stress RE bila terpapar pada lingkungan yang stress oksidatif. Kami menduga Stress RE dapat terjadi pada sel granulosa sehingga terjadi gangguan folikulogenesis dan gangguan proliferasi sel (Al Fozan *et al.*, 2004). Toya *et al.* (2000) mendapatkan gangguan proliferasi sel granulosa pada wanita endometriosis sedang dan berat yang mengikuti program TRB. Pada pengamatan tersebut mendapatkan bahwa siklus sel granulosa wanita endometriosis peningkatan sel granulosa pada fase S dan penurunan fase

M/G2 secara signifikan namun kadar *Estradiol* (E2) tidak berbeda signifikan dibanding wanita infertilitas faktor lain. Choi *et al.* (2000) mendapatkan bahwa *Cyclin D2* ini tinggi pada wanita yang hamil pada program TRB dan dapat dipakai sebagai petanda folikulogenesis di ovarium. Sedangkan *Cyclin D2* ini ternyata mempunyai peran penting terhadap proliferasi sel granulosa dan ekspresinya tinggi pada folikel *antral* hingga preovulatoar. Peningkatan *Cyclin D2* ini dipengaruhi oleh estrogen dan FSH serta dihambat oleh *Leutenizing Hormone* (LH) (Robker *et al.*, 1998). **Belum ada data bagaimana mekanisme lingkungan zalir peritoneum yang kaya akan TNF $\alpha$  terhadap proses *Folding Protein* di RE dan dampaknya terhadap *Cyclin D2* di sel granulosa folikel dominan.**

Ovarium terendam dalam zalir peritoneum yang kaya akan TNF $\alpha$  pada wanita endometriosis. TNF $\alpha$  akan berikatan dengan reseptornya di sel granulosa yang kemudian akan menstimulasi mitokondria untuk memproduksi ROS yang pada gilirannya akan terjadi stress oksidatif pada sel granulosa. Stress oksidatif ini diduga dapat menyebabkan akumulasi *unfolded protein* di retikulum endoplasmik dan mengaktivasi respon stres retikulum endoplasmik di sel granulosa. Stress RE ini merupakan mekanisme adaptasi sel dalam kondisi lingkungan yang kurang baik. Respon stress RE akan memicu penekanan translasi protein secara global melalui fosforilasi eIF2 $\alpha$  oleh PERK. Kemudian ATF6 memicu produksi protein residen retikulum endoplasmik agar mampu meningkatkan aktifitas *folding protein*. Namun bila kondisi stres oksidatif ini berlangsung terus menerus maka akan memicu terjadinya apoptosis melalui CHOP. eIF2 $\alpha$  yang terfosforilasi diduga akan menekan translasi mRNA CYP19a1 dan *Cyclin D2*, sehingga terjadi gangguan proliferasi sel granulosa yang mengakibatkan gangguan folikulogenesis.

## 1.2 Kajian Masalah.

Gangguan folikulogenesis pada endometriosis ternyata bukan hanya terjadi pada penderita endometriosis yang didapatkan endometrioma atau pasca tindakan kistektomi saja, tetapi juga terjadi pada wanita yang stadium endometriosis ringan (Hendarto *et al* 2009, Lemos *et al* 2008). Folikulogenesis yang terjadi di lapisan korteks ovarium di kantung Douglas selalu terjadi kontak terus menerus dengan implan endometriosis dan zalir peritoneum yang kaya akan stres oksidatif dan sitokin proinflamasi (Donnez, 2004, Fritz *et al* 2011). Sel granulosa mempunyai peran yang besar terhadap laju Folikulogenesis dan oogenesis. Retikulum Endoplasma pada sel sekretorik seperti sel granulosa ini mempunyai tugas yang penting dalam menjaga kualitas produksi sehingga protein yang disekresikan dapat dalam bentuk formasi yang benar dan melaksanakan fungsinya dengan baik (Alberts *et al* 2008). Stres oksidatif dapat menyebabkan gangguan *folding* protein yang pada gilirannya menyebabkan akumulasi *unfolded protein* dan memicu reaksi *unfolded protein response* (UPR) yang berakibat supresi translasi global, perubahan siklus sel dan akhirnya apoptosis (Xue *et al* 2005, Kim J *et al* 2010).

Disisi lain, penanganan endometriosis saat ini adalah berdasarkan gejala. Penanganan penderita endometriosis dan infertilitas masih menuai banyak kontroversi tentang apakah endometriosisnya ditangani terlebih dahulu atukah langsung menangani infertilitasnya tanpa menghiraukan endometriosisnya. Salah satu tahapan TRB yang paling penting adalah stimulasi ovulasi. Pada tahapan ini folikel di ovarium dipacu oleh gonadotropin agar mampu menghasilkan multi ovulasi. Steroidogenesis dan proliferasi sel granulosa yang optimal sangat diperlukan agar mampu menghasilkan lingkungan intrafolikuler yang *estrogen dominant*. Bila sel granulosa di ovarium wanita endometriosis terjadi stres RE saat stimulasi ovulasi, maka diduga justru dapat memperlambat laju folikulogenesis dan gangguan maturasi oosit.

### 1.3 Rumusan masalah.

1. Apakah Kadar TNF $\alpha$  zalir peritoneum wanita endometriosis lebih tinggi dibanding wanita non endometriosis ?
2. Apakah ekspresi mRNA GRP78 di sel granulosa folikel dominan pada wanita endometriosis lebih tinggi dibanding wanita non endometriosis?
3. Apakah ekspresi mRNA eIF2 $\alpha$  di sel granulosa folikel dominan pada wanita endometriosis lebih tinggi dibanding wanita non endometriosis ?
4. Apakah ekspresi mRNA CHOP di sel granulosa folikel dominan pada wanita endometriosis lebih tinggi dibanding wanita non endometriosis ?
5. Apakah ekspresi protein *Cyclin D2* di sel granulosa folikel dominan pada wanita endometriosis lebih rendah dibanding wanita non endometriosis ?
6. Apakah siklus sel granulosa di folikel dominan pada wanita endometriosis lebih banyak pada siklus sel fase G1 dibanding wanita non endometriosis ?
7. Apakah ada hubungan antara kadar TNF $\alpha$  zalir peritoneum, ekspresi mRNA GRP78, eIF2 $\alpha$ , CHOP, *Cyclin D2* dan siklus sel granulosa yang diisolasi zalir folikel dominan ?

### 1.4 Tujuan penelitian.

#### 1.4.1 Tujuan umum.

Mencari mekanisme perubahan siklus sel granulosa pada folikel dominan wanita endometriosis.

#### 1.4.2 Tujuan khusus.

1. Membandingkan dan menjelaskan kadar TNF $\alpha$  zalir peritoneum pada wanita endometriosis dan non endometriosis.

2. Membandingkan dan menjelaskan ekspresi mRNA GRP78 pada sel granulosa folikel dominan wanita endometriosis dan non endometriosis.
3. Membandingkan dan menjelaskan ekspresi mRNA eIF2 $\alpha$  pada sel granulosa folikel dominan wanita endometriosis dan non endometriosis.
4. Membandingkan dan menjelaskan ekspresi mRNA CHOP pada sel granulosa folikel dominan wanita endometriosis dan non endometriosis.
5. Membandingkan dan menjelaskan ekspresi *Cyclin D2* pada sel granulosa folikel dominan wanita endometriosis dan non endometriosis.
6. Membandingkan dan menjelaskan jumlah sel granulosa folikel dominan yang berada di fase G1 pada wanita endometriosis dan non endometriosis.
7. Melakukan Analisis jalur untuk Mencari hubungan kadar TNF $\alpha$  zalir peritoneum, ekspresi mRNA GRP78, eIF2 $\alpha$ , CHOP, *Cyclin D2* dan siklus sel granulosa yang diisolasi dari zalir folikel dominan di ovarium.

## **1.5 Manfaat penelitian.**

### **1.5.1 Manfaat pada Ilmu Pengetahuan.**

1. Memberi informasi tentang pengaruh GRP78 dan *Cyclin D2* terhadap gangguan folikulogenesis pada wanita endometriosis.
2. Memberi informasi pada penelitian selanjutnya tentang perubahan fungsi RE dan perubahan siklus sel pada wanita infertilitas dan endometriosis.
3. Memberi peluang untuk penelitian selanjutnya tentang durasi fase “istirahat” sel pada wanita endometriosis.

### **1.5.2 Manfaat pada pelayanan..**

1. Memberikan informasi tentang skor R-AFS dalam memprediksi resiko terjadi stress RE disel granulosa.



2. Penggunaan TNF $\alpha$  di zalir peritoneum, GRP78 dan protein *Cyclin D2* pada sel granulosa sebagai petanda biokimia untuk memprediksi folikulogenesis pada wanita endometriosis.
3. Memberikan informasi perlunya pemberian terapi hormonal untuk menekan endometriosis sebelum penanganan infertilitas.
4. Memberikan informasi tentang perlunya membuat metoda stimulasi ovulasi yang optimal untuk wanita endometriosis.