

POTENSI *GROWTH FACTOR* (GF) DARI SEL PUNCA MESENKIM UNTUK PEMATANGAN SEL TELUR SECARA *IN VITRO*

¹⁾Ratih Rinendyaputri, ²⁾Uly Alfi Nikmah

^{1),2)}Peneliti Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan

Jl. Percetakan Negara 23 Jakarta Pusat

¹⁾ratihr79@yahoo.com

Abstract

The cause of infertility can be caused by a disorder of female replacement. The inability to ovulate (anovulation) causes no fertilization is one of the main causes of infertility. Assisted reproductive technology (ART) can be one solution to help replace fertilization. However, in vitro maturation of oocyte (IVM) can lose the success of fertilization. Oocyte maturation can be done outside the body (in vitro) by adding various growth factors (GF). Follow the follicles received with the maturation of the egg. Various GFs such as epidermal growth factor (EGF) and insulin growth factor (IGF) so that the egg maturation process occurs, namely maturation of the nucleus and cytoplasm. The maturation of the nucleus with the cell nucleus has succeeded in achieving metaphase II (MII) while the maturation of the cytoplasm is indicated by structural and biochemical complexity in the cytoplasm. The use of GF can be obtained from the secretion of mesenchymal stem cells (MSC), namely conditioned medium (CM-MSC). Growth factors (GF) excreted by MSC such as EGF and IGF can be used to incised oocyte IVM through of garnulosa/cumulus cells expansion.

Keywords: in vitro maturation (IVM), oocyte, growth factor, CM-MSC

PENDAHULUAN

Permasalahan kesehatan reproduksi mencakup kesehatan ibu, keluarga berencana, penularan penyakit infeksi melalui organ reproduksi dan pencegahan serta penanganan infertilitas. Infertilitas merupakan gangguan reproduksi yang dapat dialami oleh satu dari 5 atau 6 pasangan usia subur. Menurut World Health Organization (WHO) infertilitas didefinisikan sebagai ketidakmampuan pasangan mengalami kehamilan meskipun telah melakukan hubungan secara normal selamam 12 bulan. Penyebab infertilitas dapat terjadi pada reproduksi wanita /dan pria, untuk itu pemeriksaan harus dilakukan pada pasangan tersebut.

Kasus infertilitas 50% disebabkan oleh gangguan pada reproduksi wanita, 40% karena gangguan reproduksi pada pria dan 10% penyebabnya tidak diketahui. Faktor lain yang juga berpengaruh adalah usia serta perilaku seksual pasangan. Penyebab utama gangguan reproduksi wanita adalah ketidakmampuan ovulasi (anovulatory). Ovulasi merupakan lepasnya sel telur dari folikel menuju tuba falopii untuk proses fertilisasi (pembuahan).

Anovulatory pada pasangan usia subur dapat disebabkan oleh faktor ketidakseimbangan hormon seperti hyperprolaktinaemia, hyper atau hypogonadotrophic gonadism dan polycystic ovary syndrome (PCOS). Salah satu solusi untuk pasangan dengan anovulatory adalah assisted reproduction technology (ART) seperti in vitro fertilization (IVF) atau intra cytoplasmic sperm injection (ICSI). Keberhasilan IVF dan ICSI sangat ditentukan oleh tingkat maturasi/pematangan sel telur (in vitro maturation/IVM)^{1,2}.

Pematangan sel telur yang meliputi pematangan inti dan sitoplasma dipengaruhi oleh

growth factor (GF) dan gonadotropin hormon. 2 Pematangan inti ditunjukkan dengan pembelahan miosis yaitu tahap metafase II (MII), pada tahap ini sel telur siap untuk mengalami fertilisasi (pembuahan). Pematangan sitoplasma pada sel telur meliputi modifikasi struktur dan biokimia, yaitu redistribusi organel, sitoskeleton dinamika dan pematangan melekul-molekul.³

Pada kasus anovulatory, pematangan sel telur dapat dilakukan secara *in vitro*. Penambahan GF untuk membantu proses pematangan sel telur dapat diperoleh dari sekresi mesenchymal stem cell (MSC). Growth factor (GF) seperti epidermal growth factor (EGF) dan insulin growth factor (IGF) dapat membantu meningkatkan maturasi sel telur. 5 Mesenchymal stem cell (MSC) yang mensekresikan berbagai GF seperti EGF, IGF, fibroblast growth factor (FGF) dan nerve growth factor (NGF) diharapkan dapat menjadi solusi pada gangguan reproduksi, khususnya infertilitas.^{6,7,8}

Pematangan Inti dan Sitoplasma Sel Telur secara *In Vivo*

Proses folikulogenesis merupakan proses penting bagi awal proses perkembangbiakan makhluk hidup khususnya mamalia. Di dalam ovarium, folikulogenesis merupakan proses pertumbuhan folikel dan proses oogenesis. Pada proses oogenesis akan menghasilkan sel telur yang siap untuk dibuahi (fertilisasi). Kedua proses tersebut melibatkan berbagai hormon untuk menghasilkan sel telur dengan kualitas terbaik sehingga proses perkembangan embrio dapat terjadi.⁴

Secara *in vivo* pematangan sel telur terjadi dalam proses oogenesis dan folikulogenesis. Pematangan sel telur dengan kedua proses ini di alami pada masa pasca pubertas.^{4,5} Proses ini melibatkan berbagai hormon serta GF yang diawali dengan adanya stimulasi gonadotrophin releasing hormone (GnRH), yang disekresikan oleh hipotalamus. Hormon ini akan bekerja menstimulasi hipofise anterior untuk mensekresikan follicle stimulating hormon (FSH) dan Leutenizing hormon (LH). Kedua hormon berperan dalam siklus menstruasi yaitu pada fase folikuler (follicular phase) dan fase luteal (luteal phase) dengan target ovarium.^{2,3} Ovarium memiliki berjuta folikel primordial yang akan berkembang menjadi beberapa ratus ribu folikel primer dan sekunder kemudian hanya satu folikel yang matang dan akan terovulasi pada setiap siklus menstruasi.²

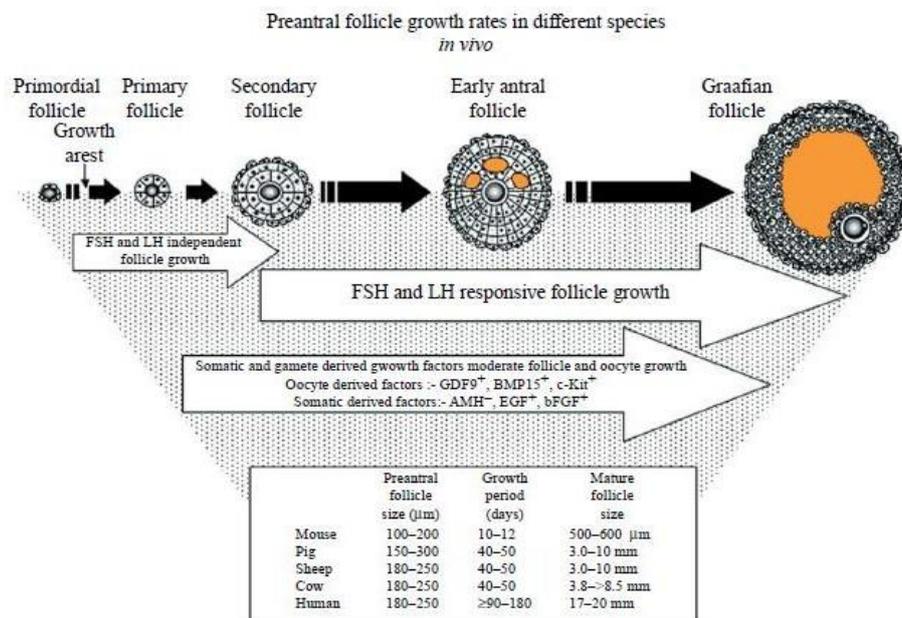
Follicle stimulating hormon (FSH) berperan dalam fase folikuler dalam proses folikulogenesis khususnya pada perkembangan folikel sekunder menjadi folikel tersier dan folikel de Graaf, sedangkan perkembangan folikel primer lebih dipengaruhi oleh efek parakrin (Gambar 1).¹ Pada saat proses folikulogenesis berkembang folikel tidak hanya terjadi penambahan jumlah sel granulosa, sel kumulus serta produksi cairan folikel, namun juga penambahan pada volume sel telur.² Selain itu disekitar folikel primordial dikelilingi sel teka yang berfungsi memproduksi cairan folikel bersama dengan sel granulosa. Semua sel (sel teka dan sel granulosa) di sekitar sel telur menciptakan lingkungan mikro yang mendukung proses pematangan sel telur dengan memproduksi hormon steroid (estrogen) yang disekresikan ke dalam cairan folikel.^{2,3} Estrogen juga akan berfungsi terhadap negatif feedback terhadap sekresi FSH sehingga fase folikuler berakhir dan memasuki fase luteal dengan peran LH.

Leutenizing hormon (LH) sangat berpengaruh terhadap proses ovulasi dan

pematangan sel telur. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa knock out pada reseptor LH (LH reseptor/LHR) menyebabkan tidak hanya terjadi kegagalan ovulasi namun juga kegagalan pencapaian folikel de Graaf.³ Lonjakan LH pada akhir fase folikuler merupakan proses akhir pematangan sel telur sebelum terjadinya ovulasi. Setelah terjadi ovulasi maka terbentuklah corpus luteum yang mensekresikan hormon progesteron jika terjadi implantasi.³

Oogenesis telah dimulai sejak bayi di dalam kandungan, primordial germ cells (PGCs) bersifat diploid, membelah secara mitosis dan bermigrasi menjadi oogonium. Oogonium bermitosis menghasilkan sel telur (oosit) primer. Selanjutnya oosit primer membelah secara meiosis berhenti sampai tahap profase sampai bayi dilahirkan. Oosit primer tetap berada di dalam folikel primordial selama belum menginjak masa pubertas.³ Folikel primordial memiliki sel telur dengan inti bersifat diploid (2N) dengan membran inti yang sangat jelas, disebut germinal vehicle (GV).³

Pematangan inti terjadi selama folikulogenesis dimulai dengan adanya lonjakan LH yang menyebabkan pengurangan cyclic adenosine monophosphate (cAMP) dan protein kinase A (PKA) sehingga meiosis berlanjut. Pematangan inti dimulai pada folikel primer ditandai dengan pecahnya membran inti (2N), disebut germinal vehicle breakdown (GVBD). Pada folikel sekunder inti sel telur bersifat haploid (N) dan selanjutnya mengalami pembelahan meiosis I. Perkembangan folikel antral melibatkan hormon steroid dimana regulasinya dikontrol oleh sekresi hormon gonadotropin dari hipofise anterior. Pada tahap ini oosit sudah menyelesaikan pembelahan meiosis kedua yaitu metafase II (MII) dan siap mengalami ovulasi di dalam Graafian follicle. Pada tahap inilah pematangan inti dan sitoplasma sel telur telah tercapai dan siap untuk dibuahi.²



Gambar 1. Perkembangan folikel (folikulogenesis). Terjadi perubahan besar folikel pada semua spesies. Terjadi penambahan jumlah sel yang mengelilingi sel telur untuk menciptakan lingkungan mikro yang mendukung pematangan sel telur. Peran growth factor dari sel somatik seperti AMH, EGF dan bFGF serta dari sel telur yaitu GDF-9, BMP15 dan c-Kit. (Picton et.al., 2008).

Proses pematangan sel telur sangat kompleks tidak hanya proses pembagian jumlah

kromosom saat pembelahan miosis namun juga distribusi organel di dalam sitoplasma, protein dan faktor transkripsi. Secara ultrastruktur komponen organel setiap tahap sel telur berbeda-beda. Organel seperti mitokondria, ribosom, endoplasmic retikulum (ER), kortikel granul dan aparatus Golgi berperan dalam memproduksi energi serta protein. Mikrofilamen dan mikrotubul skeleton yang berfungsi untuk segregasi kromosom.⁴

Penyebab Anvolutary pada Infertilitas

Hiperprolaktinemia merupakan kondisi tingginya hormon prolaktin di dalam darah yang dapat menjadi penyebab infertilitas primer yaitu sekitar 65% . 7,8 Tingginya kadar prolaktin dapat disebabkan adanya fisologis pada kondisi hamil, tumor di pituitari anterior dan hipotiroid. Pituitari anterior merupakan bagian otak yang mengontrol GnRH, adanya tumor dapat menghambat produksi GnRH dapat menghambat LH dan FSH sehingga proses folikulogenesis tidak terjadi. Selain itu dapat meningkatkan produksi sel lactotroph untuk mensekresikan prolaktin.⁹

Hipogonadotrophin dan hipergonadotrophin gonadism adalah rendahnya hormon yang diproduksi oleh gonad yaitu estrogen dan testosteron. Hal ini dapat disebabkan tinggi atau rendahnya konsentrasi LH dan FSH yang disekresikan melalui pituitari anterior sehingga proses folikulogenesis tidak terjadi. Pada hipogonadotropik hormon dapat disebabkan oleh kelainan genetik Kallman sindrom dan adanya lesi pada hipotalamus atau hipofise. Sedangkan pada hipergonadotropik dapat disebabkan oleh kelainan genetik seperti sindrom Klinifelter dan adanya mutasi pada reseptor maupun subunit dari LH/FSH (Santoro, 2011).¹⁰

Polycystic Ovarium Syndrom (PCOS) merupakan kondisi ketidakseimbangan hormon salah satunya adalah resistensi tubuh terhadap insulin yang menyebabkan hiperandrogen. Insulin diproduksi secara berlebihan oleh pankreas sehingga kadar berlebihan di dalam tubuh. Kadar insulin yang tinggi dapat menghambat aktifitas enzim aromatase dan meningkatkan aktifitas 17 hidrosilase. Di dalam ovarium enzim aromatase berfungsi mengubah androgen dan testosteron menjadi estrogen sehingga inhibisi enzim tersebut menyebabkan peningkatan kadar androgen/hiperandrogen (Rosenfiled and Ehrmman, 2016).¹¹ Peningkatan androgen menyebabkan feedback negatif terhadap stimulasi hormon gonadotropin sehingga proses ovulasi tidak terjadi.

Pematangan Sel Telur secara in Vitro pada Assisted Reproduction Technology (ART)

Pematangan sel telur secara in vitro (in vitro maturation/IVM) tidak hanya dibutuhkan pada pasien infertilitas namun juga pada beberapa kasus seperti kanker yang harus menjalani kemoterapi. Kemoterapi dapat merusak sel-sel tubuh normal lainnya, maka dalam menyelamatkan sel telur pada organ ovariuma. Sel telur yang dalam ovarium dapat diisolasi kemudian dilakukan pematangan in vitro dan dilakukan penyimpanan.¹² Dengan demikian jika suatu saat pasien menginginkan kehamilan maka sel telur tersebut dapat dibuahi menggunakan assisted reproduction technology (ART).¹³ Dengan melakukan IVM pada sel telur maka tingkat keberhasilan ART semakin tinggi.¹⁴

Optimalisasi IVM dapat meningkatkan keberhasilan ART seperti invitro fertilization (IVF) maupun intra sitoplasmic injection (ICSI). Pada prinsipnya IVM dilakukan untuk mematangkan sel telur yang belum matang sehingga kondisi lingkungan yang optimal sangat

dibutuhkan karena kondisi di dalam tubuh dan di luar sangat berbeda. Pemilihan medium serta lama kultur yang dibutuhkan sel telur juga perlu diperhatikan.¹⁵ Reichman et. al. (2010) melaporkan bahwa 24 jam adalah waktu yang optimal untuk pematangan sel telur dan Fasehat (2017) meskipun menambah lama kultur tidak meningkatkan kualitas pematangan sel telur.^{14,15} Proses MII akan dapat berlangsung spontan namun pematangan inti dan sitoplasma lebih penting dalam proses perkembangan embrio.⁴

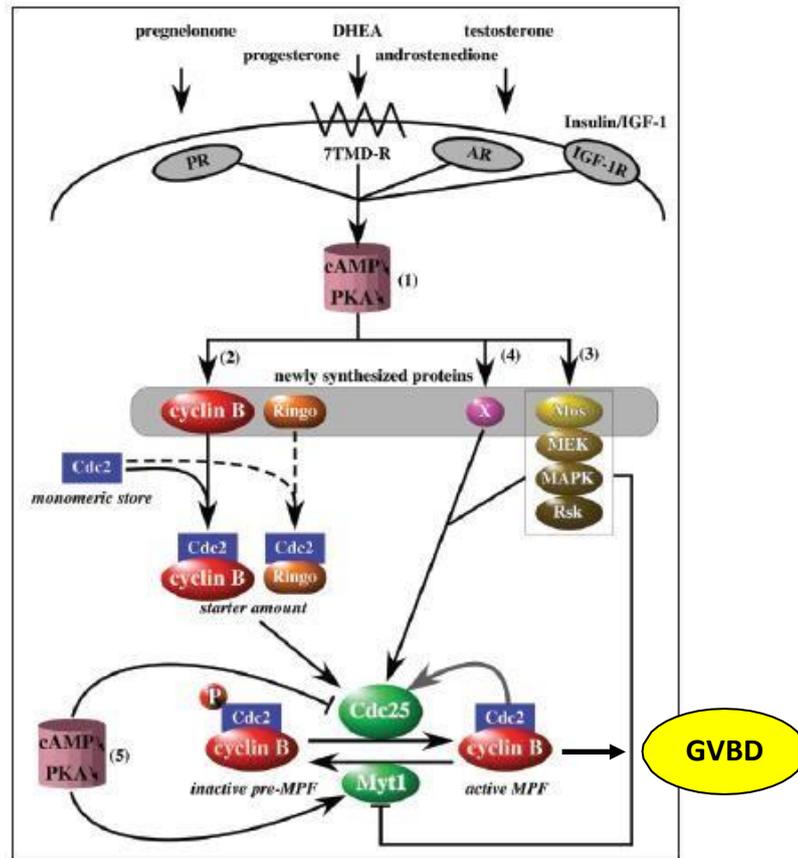
Komposisi medium untuk IVM sel telur merupakan faktor keberhasilan pematangan sel telur yang optimal. Penambahan berbagai hormon seperti FSH, estrogen dan progesteron (Kalita et al. 2019 dan Matsuo et al. 2017).^{17,18} Penggunaan teknik kultur dengan menambahkan cairan folikel serta ko kultur dengan sel kumulus dan sel punca merupakan usaha untuk mengoptimalkan kondisi lingkungan (Maldonado et al. 2018). Optimalisasi kondisi kultur dapat meningkatkan pematangan inti serta meningkatkan kualitas embrio yang terbentuk (Matsuo et al. 2017).¹⁸

Peran Growth Factor (GF) dari Mesenchymal Stem Cell (MSC) sebagai Sumber Growth Factor (GF) untuk pematangan Sel Telur

Mesenchymal stem cells (MSC) merupakan sel punca mesenkim yang dapat diperoleh dari sel punca dewasa. Sel punca mesenkim mampu mensekresikan berbagai GF ke dalam medium kultur (conditioned medium/CM) dengan konsentrasi yang berbeda dalam setiap pasase. Sel punca mesenkim yang diperoleh dari tali pusat dan lemak menunjukkan adanya EGF, VEGF, bFGF, IGF, TGF dan brain derive neutrophic hormone (BDNF).^{7,8}

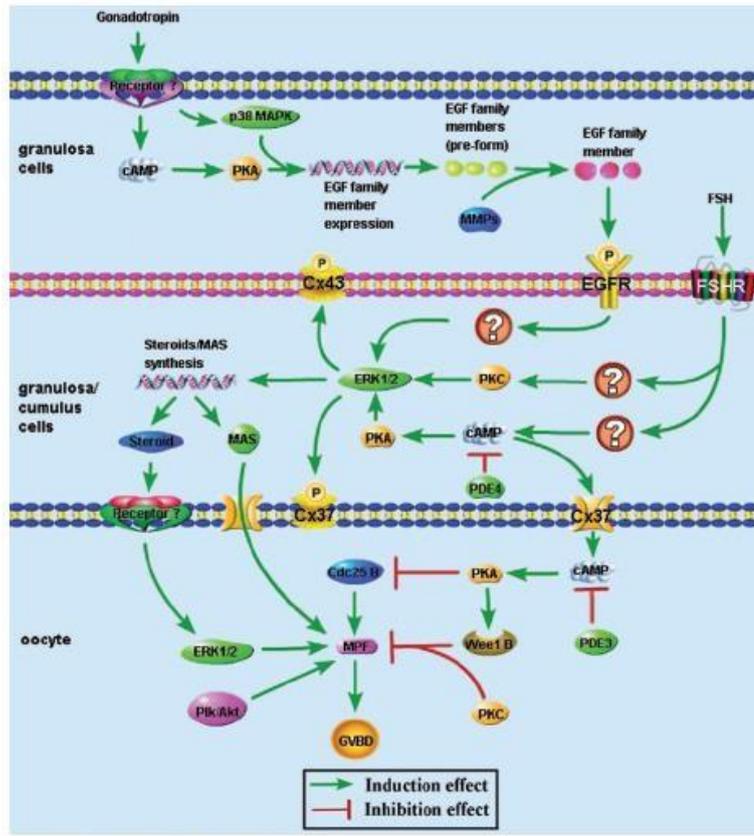
Insulin growth factor (IGF) merupakan salah satu mitogen yang efektif terhadap proses mitosis atau siklus sel pada katak (Gambar 2).¹⁹ Efek parakrin dari IGF-1 sangat berperan terhadap folikulogenesis, secara in vitro dapat dilihat dari ekspansi sel kumulus. IGF-1 meningkatkan proliferasi sel kumulus dan sel granulosa sehingga proses perkembangan serta pematangan folikel dan sel telur berlangsung optimal.²⁰ Li et. al (2016) menyatakan bahwa pada pasien infertil memiliki konsentrasi IGF-1 dalam cairan folikel lebih rendah dibandingkan pada pasien fertil.¹⁹

Endothelial growth factor (EGF) dan fibroblast growth factor 2 (FGF2) akan berikatan dengan GF-reseptor (GFR) bersama dengan sel granulosa dan sel kumulus mempercepat proses miosis, ekspansi sel kumulus serta proses ovulasi (Liang et al. 2007, Procozka et al. 2017 dan Zhang and Ealy. 2012).^{21,22,23} Ni et. al (2015) menyatakan bahwa EGF secara in vitro mampu meningkatkan pematangan sel telur domba melalui jalur MAPK3/1 atau extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2).²⁴ Penambahan IGF I, IGF II dan EGF oleh Sirotkin et. al (2000) dan Hasbi dkk. (2018) dapat meningkatkan pematangan sel telur melalui jalur protein kinase A (PKA) sedangkan Li et. al (2016) menyatakan bahwa IGF-1 meningkatkan ekspansi kumulus serta pematangan sel telur melalui jalur PI3K/Akt.^{6,19,25}



Gambar 2. Pada katak *Insulin growth factor -1* (IGF-1) menghambat aktivasi cAMP dan PKA sehingga Cdc25 teraktivasi melalui berbagai jalur untuk mengaktifkan *maturation promoting factor* (MPF) sehingga proses miosis dimulai yang ditandai dengan munculnya *germinal vesicle breakdown* (GVBD) (Haccard and Jessus, 2006)

Proses pematangan sel telur oleh GF dimediasi dengan maupun tanpa sel kumulus.²⁶ Insulin growth factor (IGF) dan EGF mampu mengaktifasi MPF melalui jalur MAPK yang diinduksi Ras/Raf pada sel telur katak.²⁷ Aktivasi MPF menyebabkan proses siklus sel telur berlanjut pada fase M yang ditandai dengan adanya GVBD.^{3,27} Pada mamalia, produksi GF dimediasi dengan adanya ikatan gonadotropin hormon dengan reseptornya di sel granulosa melalui jalur MAPK. Pada kondisi *in vitro*, GF dapat diperoleh dari penambahan GF dan sekresi MSC yang ditambahkan ke dalam medium kultur.^{25,26} Growth factor (GF) akan berikatan dengan reseptornya di membran sel granulosa yang akan mengaktifasi ERK1/2 untuk mengaktifasi produksi hormon steroid. Hormon steroid yang akan berikatan dengan reseptor di membran mengaktifasi *maturation promoting factor* (MPF), melalui ERK1/2 dan atau Akt (Gambar 3).³



Gambar 3. Pada mamalia, *epidermal growth factor* (EGF) berikatan dengan reseptor EGF (REGF) di sel granulosa kemudian mengaktifasi ERK 1/2 sehingga proses produksi steroid berjalan. Steroid berikatan dengan reseptornya pada membran sel telur dan mengaktifkan *maturation promoting factor* (MPF) sehingga proses meiosis dimulai yang ditandai dengan munculnya *germinal vesicle breakdown* (GVBD) (Liang et al., 2007)

Keterlibatan berbagai hormon untuk pematangan sel telur membuka peluang pemanfaatan CM–MSC untuk membantu pematangan sel telur secara in vitro pada in vitro fertilization (IVF). Hal ini disebabkan karena sel telur yang diperoleh dari pasien untuk IVF memiliki tahapan yang berbeda-beda tergantung ukuran folikel yang terbentuk selama proses stimulasi hormon. Untuk meningkatkan keberhasilan IVF mencapai tahap blastosis maka dibutuhkan lingkungan mikro yang optimal untuk pematangan sel telur.²⁸ Penggunaan conditioned medium (CM) dari adipose tissue mesenchymal stem cell (ATMSC) sangat efektif untuk perkembangan sel telur manusia menjadi embrio pasca intra cytoplasmic sperm injection (ICSI).^{29,30,31} Ling et. al. (2008) menggunakan conditioned medium-bone marrow mesenchymal stem cell (CM-BMMSC) untuk pematangan sel telur dan Miraki et.al (2016) menggunakan mouse CM-embryonic stem cell (ESC) untuk in vitro maturasi sel telur sebelum dilakukan IVF.^{21,29}

Kesimpulan

Growth factor (GF) sekresi dari MSC meningkatkan ekspansi sel kumulus sehingga produksi steroid dapat berperan dalam proses pematangan sel telur secara in vitro pada ART. Pematangan sel telur yang optimal akan meningkatkan keberhasilan ART pada pasien infertilitas.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih kami ucapkan kepada Kepala puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (BTDK), Panitia Pembina Ilmiah (PPI) Puslitbang BTDK dan teman-teman kelompok seminar penelitian stem cell dan penyakit tidak menular (PTM) Subbid. Tidak Menular, Bidang Biomedis Puslitbang BTDK atas segala masukan dan bimbingan selama membuat tulisan.

Daftar Pustaka

- Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility *Reproductive BioMedicine*. 2000; 2(1): 41-53.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W and Chambers EL. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 2008; 136: 703-15.
- Liang C, Su Y, Fan Y, Schatten H, and Sun Q. Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*. 2007; 21(9): 2037–55.
- Sánchez F and Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1822:1896–912.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009; 71:836–48.
- Sirotkin AV, Dukesov J, Makarevich AV, Kubez A, Bulla J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. *Reprod. Nutr. Dev*. 2000; 40: 559–69.
- Shen C, Lie P, Miao T, Yu M Lu Q, Feng T, Li J, Zu T, Liu X and Li H. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Molecular Medicine Report*. 2015;12: 20-30.
- Noverina R, Widowati W, Ayuningtya W, Kurniawan D, Afifah E, Laksmiawati DR, Rinendyaputri R, Rilianawati R, Faried A, Bachtiar I, Wirakusumah FF. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clinical Nutrition Experimental*. 2019; 24:33-44.
- Majumdar A and Mangal N. S. Hyperprolactinemia. *J Hum Reprod Sci*. 2013; 6(3): 168–75.
- Santoro N. Update in Hyper- and Hypogonadotropic Amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2011; 96(11):3281–88.
- Rosenfield RL and Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev*. 2016; 37(5): 467–520.
- Creux H., Monnier P., Son W., Tulandi T., and Buckett W. Immature oocyte retrieval and in vitro oocyte maturation at different phases of the menstrual cycle in women with cancer who require urgent gonadotoxic treatment. *Fertility and Sterility*. 2017;107(1);198-205.