

## The Correlation Of Age, BMI, FBS And Akt Protein Expression In Granulosa Cells Of Polycystic Ovarium Anovulatory

Efriyan Imantika<sup>1</sup>, Djaswadi Dasuki<sup>2</sup>, Ita Fauziah Hanoum<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Physiology division of Medicine Faculty Universitas Lampung

<sup>2</sup>Basic Medical Sciences&Biomedis Postgraduate Medicine Faculty Universitas Gadjah Mada

### Abstract

Polycystic ovarium is one of ovarium disorder causes 40 % women's infertility. The incidence in population depend on ethnic variance, obesity, insulin resistance and diabetic mellitus. Etiology and basic mechanism of polycystic ovarium are still unclear including several factor. Current research find that disruption of apoptotic regulation due to hyperandrogenism which caused by hyperinsulin involving PI3-kinase Akt signalling pathway. Akt fosforilate and activate target protein Bad to stimulate growth and cell survival then inhibit apoptotic process. To explore correlation of age, BMI and FBS with Akt protein expression as a basic mechanism causes apoptotic disruption of follicular in ovarium polycystic. A case control study of 13 polycystic anovulatoar patient on going an IVF programe in Permata Hati clinic and 10 normal ovulatoar women on going a MOW programe in Kontap clinic DR. SARDJITO hospital was performed. Granulosa cells were obtained from antral follicular fluid patient after sentrifugated to identificate Akt protein expression by immunocitochemistry. Age and FBS variables has a significant correlation with Akt expression ( $p < 0.05$ ), while there is no significant correlation between BMI and Akt expression. Increment of age decrease Akt protein expression while increment of FBS increase Akt protein expression. There is no significant correlation between BMI and Akt protein expression. [JuKeUnila 2014;4(7):31-38]

**Keyword:** Akt expression, Age, BMI and FBS

### Pendahuluan

Ovarium polikistik terjadi jika ditemukan adanya lebih dari 10 folikel dengan berbagai diameter (2-8 mm) yang tersusun dipinggir subkapsuler ovarium dan tersusun seperti cincin disertai adanya hiperplasia stroma ovarium. Pada keadaan normal, hipotalamus akan mengeluarkan GnRH yang akan merangsang hipofisis anterior untuk menghasilkan hormon gonadotropin (FSH dan LH). LH kemudian akan berikatan dengan reseptornya di sel teka lutein untuk menghasilkan androgen yang kemudian akan berdifusi ke sel granulosa. Ikatan FSH dengan reseptornya di sel granulosa akan menyebabkan terjadinya aromatisasi androgen menjadi estrogen dengan cepat. Peningkatan FSH menyebabkan meningkatnya kadar estrogen ovarium yang memicu semakin banyaknya reseptor LH di sel teka dan merangsang hipofisis untuk menghasilkan LH lebih banyak

sehingga menimbulkan *LH surge* pada pertengahan siklus dan menyebabkan terjadinya ovulasi.<sup>1,2</sup>

Pada ovarium polikistik, respon folikel terhadap LH terjadi pada diameter kurang dari 10 mm sehingga differensiasi akhir sel granulosa tidak sesuai dan mengakibatkan perkembangan folikel tidak teratur. Folikel dikelilingi sel teka yang hiperplasia sebagai akibat overproduksi androgen karena sekresi LH yang abnormal. Hal ini menyebabkan meningkatnya sensitivitas sel teka terhadap LH dan faktor pertumbuhan gonadotropin sedangkan sel granulosa resisten terhadap FSH.<sup>1,3,4</sup>

Menurut Aziz *et al.*, (2006) ovarium polikistik juga dihubungkan dengan peningkatan LH dan androgen dengan prevalensi yang lebih tinggi terjadi pada wanita obese dan hirsutisme. Peningkatan hormon androgen dihubungkan dengan obesitas android,

deposisi lemak visceral, dislipidemia dan gejala lainnya yang berhubungan dengan resistensi insulin. Peningkatan kadar insulin menyebabkan 2 akibat langsung, yang pertama yaitu: peningkatan sekresi GnRH pulsatif yang akan menstimulasi peningkatan sekresi LH karena insulin memiliki reseptor yang tersebar di otak terutama hipotalamus. Peningkatan kadar LH inilah yang menstimulasi sel teka interna ovarium memproduksi androgen. Akibat yang kedua, insulin yang tinggi juga menghambat produksi SHBG dan IGF-BP sehingga konsentrasi testosteron bebas dalam darah meningkat. Dengan demikian, peningkatan androgen memiliki efek langsung pada ovarium dengan meningkatkan jumlah dan ukuran folikel namun respon sel granulosa terhadap FSH menurun.<sup>1, 6, 7, 8</sup>

Gangguan steroidogenesis memperberat hiperandrogenisme mengakibatkan bertambahnya jumlah dan menurunnya kualitas folikel preantral karena perkembangan folikel ke tahap selanjutnya terhenti disertai gangguan regulasi apoptosis sehingga menghalangi atresia folikel. Regulasi apoptosis folikular diperlukan untuk mengatur perkembangan folikel primordial sampai ke tahap preovulatory dan hanya satu yang dominan akhirnya terjadi ovulasi, sedangkan lebih dari 99 % folikel akan mengalami atresia. Atresia diatur oleh kematian sel terprogram (apoptosis) dan *survival-promoting factor* termasuk hormon gonadotropin dan regulator intraovarian (steroid gonadal, sitokin dan protein intraseluler). Penelitian saat ini, menunjukkan bahwa apoptosis sel granulosa memegang peranan penting dalam atresia folikular.<sup>9, 10</sup>

Pada proses apoptosis, kerja reseptor dengan ligan kematian tidak selalu menghasilkan kematian sel yang mengindikasikan pentingnya inhibitor intraseluler dari jalur sinyal apoptosis. Jalur sinyal PI3-kinase Akt merupakan jalur utama aktivasi hormon insulin terhadap reseptornya. Akt memfosforilasi

dan mengaktifkan protein target untuk memicu pertumbuhan dan *survival* sel dengan mengaktifkan protein Bad sehingga protein Bcl-2 tetap terikat dengan Bad dan mencegah terjadinya apoptosis.<sup>11, 12</sup>

Penurunan sensitivitas insulin diikuti dengan penurunan yang signifikan terhadap transport glukosa, namun masih belum jelas apakah ini merupakan defek primer atau sekunder terhadap hiperinsulinemia. Persamaan defek yang terjadi pada pasien NIDDM dan ovarium polikistik yaitu adanya penurunan uptake glukosa akibat menurunnya GLUT4 sebagai transporter glukosa. Defek pada jalur sinyal downstream reseptor insulin yaitu fosforilasi IRS-1 atau aktivasi dari PI3-kinase yang bertanggung jawab dalam terjadinya resistensi insulin. Protein Akt terletak pada kromosom 19q13.1-13.2. Jalur sinyal PI3-kinase Akt merupakan jalur utama yang diaktifasi hormon insulin dan berperan penting untuk *survival* dan pertumbuhan berbagai jenis sel. Anggota famili IGF akan berikatan dengan reseptor tirosin kinase (RTK) spesifik yang akan mengaktifasi PI3-kinase menghasilkan PIP<sub>3</sub> yang berfungsi merekrut 2 protein kinase pada membran plasma melalui PH domain yaitu Akt dan PDK1. Aktivasi Akt akan memfosforilasi protein target yang berada di membran plasma, sitosol ataupun nukleus yang memerintahkan *survival* dan pertumbuhan sel.<sup>13, 14, 15</sup>

## Metode

Jenis penelitian ini adalah observasional dengan rancangan penelitian *case-control study* menggunakan sampel berupa sel granulosa folikel ovarium pasien ovarium polikistik anovulasi yang mengikuti program IVF di Klinik Permata Hati dan wanita ovulasi normal yang mengikuti program MOW di klinik kontak RSUP dr. Sardjito Yogyakarta periode 1 Januari - 30 Juli 2013.

Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapatkan surat kelayakan etika penelitian pada manusia dari Komite Etik

Penelitian Kedokteran dan Kesehatan (MHREC) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan surat terlampir.

Uji hipotesis menggunakan uji t tidak berpasangan dan analisis bivariabel menggunakan uji korelasi regresi pearson untuk menguji tingkat kemaknaan hubungan antara usia, kadar GDP dan IMT dengan ekspresi protein Akt dengan derajat kemaknaan  $p < 0,05$  dan tingkat kepercayaan 95 %. Data disajikan dalam bentuk rerata  $\pm$  SB dan nilai p.

Pengambilan sampel cairan folikular pada pasien ovarium polistik yang mengikuti program IVF dan atau menjalani laparotomi, sampel diambil setelah pasien mendapatkan stimulasi hormonal terlebih dahulu. Pada saat folikel dominan terlihat melalui USG transvaginal, kemudian dijadwalkan *ovum pick-up*. Cairan folikular didapatkan melalui pungsi pada saat dilakukan *ovum pick-up* bersama cairan *flushing*. Cairan folikular kemudian disimpan pada suhu ruangan maksimal selama 6 jam atau didalam pendingin maksimal selama 2x24 jam. Sampel dari pasien yang akan menjalani MOW, prosedur aspirasi cairan folikuler dilakukan jika terlihat folikel antral yang ditandai dengan penonjolan pada permukaan ovarium (stigma) dan berwarna jernih keputihan (diameter folikel 12-17 mm), dilakukan aspirasi menggunakan spuit 3cc dengan jarum ukuran G23.

Gula darah puasa dihitung dengan metode GOD-PAP (Glucose Oksidase Para Amino Fenazon) dengan prinsip pembacaan titik ujung (*end-point*). Penghitungan IMT diperoleh dari data sekunder yang didapat dari rekam medik pasien.

Prosedur pembuatan preparat immunositokimia menggunakan alat citospin 3 (Thermo Shandon, Chesire UK). Sebelumnya sampel disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Supernatant dibuang, sel granulosa berada di interspace, kemudian dibuat preparat dengan prosedur immunositokimia (Enien *et al.*, 1998). Antibodi primer yang digunakan yaitu anti-Akt (Bioss Inc, USA). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop kontras perbesaran 200x dan 400x kemudian difoto menggunakan peralatan mikrofotografi.

Preparat yang memberikan gambaran membran plasma atau sitoplasma sel yang berwarna coklat menandakan adanya ekspresi Akt positif sedangkan sitoplasma sel yang berwarna biru tua atau ungu tidak mengekspresikan Akt. Sel yang mengekspresikan Akt dihitung tiap lapang pandang pada sel granulosa yang intak (+) dibagi dengan jumlah seluruh sel intak dikali 100 %. Ekspresi rata-rata protein Bcl-2 dan Akt dihitung tiap 5 lapang pandang. Pengamatan dan pembacaan dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi.

## Hasil

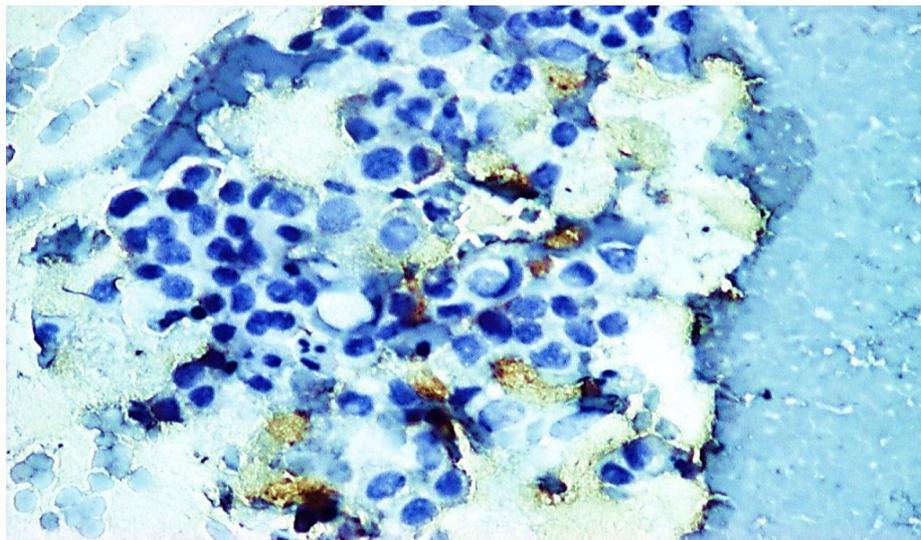
Dari tabel 1 diatas, terlihat bahwa rerata usia pada kelompok kasus lebih rendah yaitu  $33 \pm 4.1$  sedangkan pada kelompok kontrol yaitu  $37.4 \pm 5.58$ . Hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol, pasien yang mengikuti program MOW umumnya telah berumur dan memiliki anak lebih dari 2. Indeks Massa Tubuh (IMT) pada kelompok kasus yaitu  $22.71 \pm 2.67$  sedangkan pada kelompok kontrol yaitu  $23.69 \pm 2.63$ .

**Tabel 1. Analisis univariat: Karakteristik subjek penelitian**

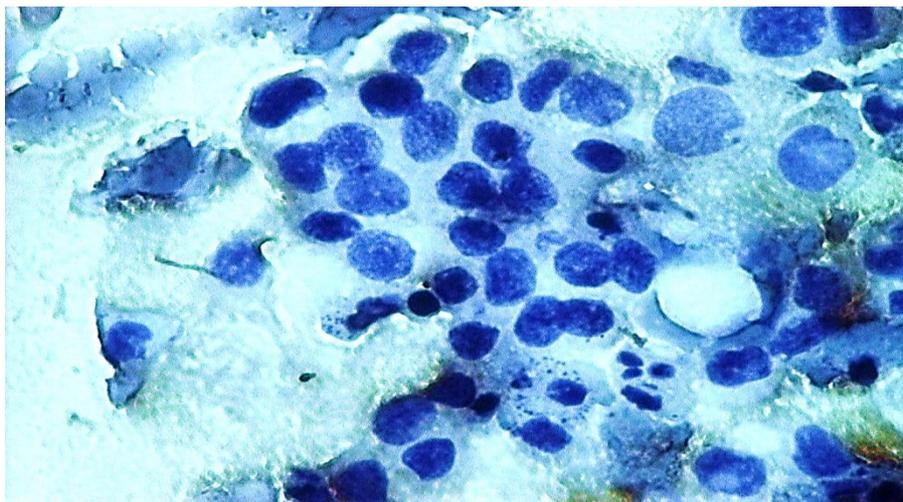
Variabel	Kelompok Subjek		Total (n=23)
	Anovulasi (n=13) (polikistik ovarium) Rerata±SB	Ovulasi normal(n=10) Rerata±SB	Rerata±SB
Usia (tahun)	33 ± 4.1	37.4 ± 5.58	37.4 ± 5.58
IMT (kg/m <sup>2</sup> )	22.7 ± 2.67	23.69 ± 2.63	23 ± 2.64
GDP (mg/dl)	94.69 ± 7.06	81.3 ± 13.1	88.87 ± 11.98
Ekspresi Akt	16.54 ± 2.59	8.34 ± 1.00	12.97 ± 4.62

Untuk GDP, pada kelompok kasus terdapat rerata GDP yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kasus rerata GDP yaitu 94.69 ± 7.06 sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 81.3 ± 13.1.

Ekspresi protein Akt lebih tinggi pada kelompok kasus dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kasus rata-rata ekspresi Akt 16.54 ± 2.59 sedangkan pada kelompok kontrol 8.34 ± 1.00.



**Gambar 1. Gambaran mikroskopis ekspresi Akt pada sel granulosa (tanda panah menandai sel yang mengekspresikan protein Akt, perbesaran 200x)**



**Gambar 2. Gambaran mikroskopis ekspresi Akt pada sel granulosa (tanda panah menandai sel yang mengekspresikan protein Akt perbesaran 400x)**

Protein Akt terletak di membran sitoplasma dan akan ditranslokasikan ke membran plasma jika teraktifasi melalui berbagai jalur. Pada kelompok kasus terlihat sel yang mengekspresikan Akt lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol. (Gambar 2)

Pada penelitian ini, penilaian dilakukan dengan menghitung persentase sel yang terwarnai positif dibandingkan dengan jumlah seluruh sel yang didapat pada 5 lapangan pandang .

**Tabel 2. Analisis bivariat: Korelasi regresi hubungan usia, IMT dan GDP dengan ekspresi protein Akt**

Variabel	Ekspresi Akt	
	r	p
Usia	-0,42	0,04*
IMT	-0,23	0,29
GDP	0,48	0,02*

r: korelasi regresi

\* signifikan ( $p < 0,05$ )

Dari data pada tabel 2, didapatkan variabel usia dan kadar Gula Darah Puasa (GDP) yang memiliki hubungan bermakna dengan ekspresi Akt ( $p < 0,05$ ). Nilai koefisien determinasi untuk variabel usia yaitu -0,42 ( $p = 0,04$ ) menunjukkan bahwa hubungan antara usia dan ekspresi Akt bersifat negatif, artinya peningkatan usia menurunkan ekspresi Akt sebesar 42 %. Variabel GDP memiliki nilai koefisien determinasi 0,48 ( $p = 0,02$ ) menunjukkan pola hubungan yang positif, artinya peningkatan kadar GDP meningkatkan ekspresi Akt sebesar 48 %.

### Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan hasil rerata ekspresi Akt pada kelompok kasus (ovarium polikistik anovulasi) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (wanita ovulasi normal). Hal ini sesuai dengan penelitian Dunaif *et al* (1995), pada wanita SOPK terdapat gangguan sinyal intraseluler pada reseptor insulin akibat adanya hiperinsulinemia. Defek pada jalur sinyal downstream reseptor insulin yaitu fosforilasi IRS-1 atau aktivasi dari PI3-kinase yang bertanggung jawab dalam terjadinya resistensi insulin pada SOPK. Jalur sinyal PI3-kinase Akt

merupakan jalur utama yang diaktifasi hormon insulin yang berperan penting untuk *survival* dan pertumbuhan berbagai jenis sel. Dalam hal ini, gangguan sinyal yang melalui reseptor insulin dan mengaktifasi Akt ikut berperan dalam terjadinya gangguan regulasi apoptosis dengan cara meningkatkan *survival* sel granulosa.<sup>13</sup>

Anggota famili IGF akan berikatan dengan reseptor tirosin kinase (RTK) spesifik yang akan mengaktifasi PI3-kinase menghasilkan PIP<sub>3</sub> yang berfungsi merekrut 2 protein kinase pada membran plasma melalui PH domain yaitu Akt dan PDK1. Aktifasi Akt akan memfosforilasi protein target yang berada di membran plasma, sitosol ataupun nukleus yang memerintahkan *survival* dan pertumbuhan sel.<sup>14, 15</sup>

Menurut penelitian Villavicencio *et al* (2012), menemukan bahwa terjadi peningkatan fosforilasi Ser473-Akt pada sel endometrium pasien SOPK dibandingkan dengan pasien non-SOPK. Akt memberikan sinyal kelangsungan hidup kepada sel sehingga terjadi peningkatan proliferasi dan tingkat *survival* sel. Dilaporkan bahwa ikatan estrogen terhadap reseptornya membentuk kompleks dengan PI3-Kinase yang mengarah pada peningkatan aktivitas kinase dan fosforilasi Akt.<sup>16</sup>

Serine/ threonine protein kinase Akt terlibat dalam banyak proses seluler meliputi pertumbuhan sel, *survival*, proliferasi dan metabolisme. Aktivitas Akt diatur oleh PI3 Kinase dalam respon terhadap stimulus ekstraselular yang berbeda. Akt berkolaborasi dengan kinase lainnya dalam mengatur koordinat perkembangan folikel dan oosit. Penelitian Cecconi *et al* (2012) menyatakan bahwa Akt menentukan kutub folikel primordial dan transisi dari keadaan diam ke fase pertumbuhan. Kinase juga memodulasi apoptosis sel granulosa melalui folikulogenesis. Pada oosit, Akt berperan dalam mengontrol kemajuan meiosis dan pada metafase II, mengatur emisi badan

polar dan pengaturan spindle. Penghambatannya secara negatif menyebabkan gangguan perkembangan embrio preimplantasi. Oleh karena itu, disregulasi Akt dihubungkan dengan beberapa penyakit pada manusia meliputi infertilitas dan penyakit ovarium.<sup>17</sup>

Serine threonine kinase Akt/ Protein kinase B merupakan mediator metabolik penting sebagai respon *survival* terhadap insulin dan faktor pertumbuhan. Akt diaktifasi melalui translokasi ke plasma membran ketika PI3-kinase terikat pada domain pleckstrin homolognya. Untuk mengaktifkannya secara penuh, dibutuhkan fosforilasi selanjutnya oleh PDK1 pada Thr-308 dan PDK2 pada Ser-473. Akt memacu *survival* sel oleh faktor pertumbuhan melawan beberapa stimulus apoptotik. Protein anti-apoptosis Bcl-2/ Bcl-xL mencegah aktifasi caspase-9 oleh Apaf-1 dan sitokrom-c. Nasib sel yang terpapar sinyal apoptosis ditentukan oleh keseimbangan antara protein pro- dan anti-apoptotik. Akt mencegah apoptosis melalui fosforilasi protein Bad pada Ser-136 sehingga menjadi inaktif dan melepaskan protein Bcl-2.<sup>18</sup>

Menurut Kennedy *et al* (1997), menemukan bahwa Akt tidak menginduksi ekspresi Bcl-2 tetapi menghambat aktivitas ICE yang secara khusus membelah PARP. Sedangkan menurut Hu *et al* (2004), Akt menstimulasi ekspresi protein anti apoptosis, FLICE-FLIP yang menghambat aktifasi caspase-8. Pugazenthi *et al* (2012), menemukan bahwa Akt memicu kelangsungan hidup sel dengan mengatur aktifasi transkripsional protein Bcl-2 sehingga mempengaruhi ekspresinya. Perbedaan penemuan ini merupakan hal yang wajar karena sinyal yang datang baik dari dalam maupun luar sel dan berikatan dengan reseptor tirosin kinase (RTK) akan diteruskan dan mengaktifasi berbagai jalur sinyal yang sesuai dengan mekanisme yang berbeda.<sup>6, 18, 19</sup>

## Simpulan

1. Peningkatan usia menurunkan Ekspresi Akt sedangkan peningkatan kadar GDP meningkatkan ekspresi Akt
2. Kadar Gula Darah Puasa (GDP) tidak mempengaruhi ekspresi Akt

## Daftar Pustaka

1. Greenspan FS, Baxter JD. Polycystic Ovarii Syndrome. In: Basic & Clinical Endocrinology. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2008.
2. Olive DL, Patter SE. Reproductive physiology. In: Berek, D. L. (Ed): Berek & Novak Gynecology. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2012: 138-158
3. Minehata MF, Inoue N, Goto Y, Manabe N. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti- apoptotic molecule. J Reprod Dev 2006; 52 (6): 695-705
4. Manabe M, Goto Y, Minehata MF, Inoe N, Maeda A, Sakamaki K, Miyano T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. J Reprod Dev 2004; 50 (5): 128-35
5. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K., Walter, P., 2008. Apoptosis. In: *Molecular Biology of The cell*. 5th ed. Garland Science, UK: h1115-27.
6. Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Quirk SM. Cell cycle progression and activation of akt kinase are required for insulin- like growth factor i-mediated suppressions of apoptosis in granulosa cells. Molecular Endocrinol 2004.; 18 (2): 326-338
7. Adams JM, Taylor AE, Crowley WF, Hall JE. Polycystic ovarian morphology with regular ovulatory cycles: insight into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. J Clin Endocrinol 2004.; 89 (9):4343-4350
8. Chang JR. Polycystic ovary syndrome and hyperandrogenic states. In: Yen SSC, Jaffe RB (Ed.): Reproductive Endocrinology. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2009.
9. Avellaira C, Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Wells P, Romero C, Vega M. Expression of molecules associated with tissue homeostasis in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. Human Reprod 2006; 21 (12): 3116-3121
10. Villaroel C, Merino PM, Lopez P, Eyzaguirre FC, Velzen AV, Iniguez G, Codner E.. Polycystic ovarian morphology in adolescents with regular menstrual cycles is associated with elevated anti-mullerian hormone. Human Reprod 2011; 26 (10): 2861-2868
11. Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, Mcallister JM. Differential activity of cytochrome P450 17- $\alpha$  hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and PCOS theca cells. J Clin Endocrinol Metab 2000; 86 (6): 2304-2312
12. Suhartono H. Polimorfisme pentanukleotida (tttta)<sub>n</sub> gena *cyp11a* dan gena *cyp 17* pada penderita sindroma ovarium polikistik (sopk) etnis melanesia dan melayu. Yogyakarta: FK UGM. 2011 (Disertasi)
13. Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblast and in skeletal muscle. J Clin Invest 1995; 96: 801-810
14. Murphy MK, Hall JE, Adams JM, Lee H, Welt CK. Polycystic ovarian morphology in normal women does not predict the development of polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol 2006; 91 (10): 3878-3884
15. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P. Apoptosis. In: Molecular Biology of The cell. 5th ed. UK: Garland Science, 2008:1115-27
16. Villavencio A, Goyeneche A, Telleria C, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Vega M. Involvement of Akt, Ras and cell cycle regulators in the potential development of endometrial hyperplasia in women with polycystic ovarian syndrome. Gynecol Oncol, 2009; 105 (1): 102-107
17. Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. The Role of Akt signalling in the mammalian ovary. Int. J. Dev. Biol 2012 ; 56: 809-817
18. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JEB. Akt/ Protein Kinase B Up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-

response Element-binding Protein. JBC 275  
2000 ; (915): 10761-767  
19. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD,  
Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N.

The PI 3-Kinase/ Akt signalling pathway  
deliver an anti-apoptotic signal. Genes Dev  
1997; 11: 701-713