

Pengaruh Vitrifikasi terhadap Maturitas dan Kualitas Oosit Matur dan Imatur: Kajian terhadap Gap-Junction, Apoptosis, Oocyte Secreted Factors, Reseptor FSH dan LH pada Sel Kumulus-Granulosa = Effect of Mature and Immature Oocytes Vitrefication on Maturity- and Quality-Associated Genes: Focus on Gap-Junction, Apoptosis, Oocyte Secreted Factors, FSH dan LH Receptors on Cumulus-Granulosa Cells

Sirait, Batara Imanuel, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920530130&lokasi=lokal>

Abstrak

Pengawetan fungsi reproduksi dengan simpan beku oosit matur tidak dapat dilakukan pada pasien kanker, sehingga simpan beku oosit imatur menjadi pilihan. Simpan beku oosit imatur masih terkendala angka maturasi dan fertilisasi yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh vitrifikasi sel kumulus granulosa sebagai representasi maturitas dan kualitas oosit matur dan imatur. Penanda maturitas adalah GDF-9, BMP-15, FSHR, LHR, dan koneksin-37, sedangkan kaspase-3 dan survivin sebagai penanda kualitas. Kadar protein total dan protein spesifik penanda maturitas (FSHR, LHR) dan kualitas (kaspase-3) oosit juga diteliti untuk memperoleh gambaran komprehensif pascavitrifikasi.

Disain penelitian adalah true eksperimental in-vitro, dilakukan dari bulan Juli 2020 sampai Februari 2022. Subjek penelitian adalah pasien yang menjalani program fertilisasi in-vitro di klinik bayi tabung Morula IVF, RSIA Bunda Jakarta. Sampel sel kumulus-granulosa dari 38 pasien dengan diagnosis sindrom ovarium polikistik (SOPK) dianalisis. Prosedur vitrifikasi dilakukan dengan memajan sel kumulus-granulosa pada medium ekuilibrasi (VS1, 15% etilen glikol) selama 5 menit dan medium vitrifikasi (VS2, 15% etilen glikol, 15% dimethyl sulfoxide dan 0,5 M sukrosa) selama 30 detik. Sel kumulus-granulosa dimasukkan secara cepat ke nitrogen cair (suhu -196 oC). Setelah 5 menit, sampel dihangatkan dengan memajankan larutan sukrosa bertingkat 0,5 M, 0,25 M, 0.125 M. Metode real-time quantitative polimerase chain reaction (rt-qPCR) digunakan untuk mengukur ekspresi relatif dan sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk mengukur kadar protein. Analisis data menggunakan T-independent atau Mann-Whitney. Analisis ekspresi relatif gen target level mRNA menggunakan rumus Pfaffl.

Didapatkan kadar protein total yang tidak berbeda bermakna antara sel kumulus-granulosa oosit matur dan imatur (30 µg/mL dan 12,5 µg/mL, nilai $p > 0,05$). Kadar protein spesifik FSHR, LHR dan Kaspase-3 juga tidak berbeda bermakna antara kelompok oosit matur dan imatur (masing-masing adalah 0,47 µg/mL dan 0,48 µg/mL, 0,1 µg/mL dan 0,09 µg/mL, 0.51 µg/mL dan 0.58 µg/mL, nilai $p > 0,05$). Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi relatif BMP-15, LHR dan koneksin-37 pascavitrifikasi pada kelompok sel kumulus-granulosa oosit matur dan imatur (masing-masing 1,6 dan 1,4 kali untuk BMP-15, 2,3 dan 2,3 kali untuk LHR, 0,9 dan 0,9 kali untuk koneksin-37, nilai $p < 0,01$). Didapatkan penurunan bermakna ekspresi relatif GDF-9 dan FSHR pada kelompok sel kumulus-granulosa oosit matur dan imatur (masing-masing 0,2 dan 0,1 kali untuk GDF-9, 0,3 dan 0,02 kali untuk FSHR, nilai $p < 0,01$). Ekspresi relatif gen penanda kualitas oosit matur dan imatur yaitu survivin dan kaspase-3 tidak berubah pascavitrifikasi (1,3 dan 1,2 kali untuk survivin, 0,7 dan 0,8 kali untuk kaspase-3, nilai $p > 0,05$). Analisis kadar protein FSHR, LHR, dan kaspase-3 pascavitrifikasi menunjukkan bahwa vitrifikasi tidak mengubah ekspresi gen sel kumulus granulosa oosit matur dan imatur (masing-masing adalah 0,4;0,4 µg/mL dan 0;4;0,5 µg/mL untuk FSHR, 0,1;0,1 µg/mL dan

0,1;0,1 µg/mL untuk LHR, 1,9;1,5 µg/mL dan 1,7;1,6 µg/mL untuk kaspase-3, nilai $p > 0,05$).

Disimpulkan simpan beku sel kumulus-granulosa dengan metode vitrifikasi tidak mengubah ekspresi gen penanda maturitas dan kualitas oosit kecuali GDF-9 dan FSHR. Vitrifikasi terbukti aman untuk mempertahankan viabilitas sel kumulus-granulosa sebagai representasi kesintasan oosit matur dan imatur.

.....Fertility preservation through mature oocytes cannot be recommended for cancer patients and immature oocytes is preferable. However, immature oocyte vitrification remains unfavorable due to low number of mature oocytes as well as low fertilizability post-warming. This study aimed to investigate the effect of cumulus-granulosa cells' vitrification on maturity and quality-associated markers of mature and immature oocytes as an indirect assessment. Expression of GDF-9, BMP-15, FSHR, LHR, and Connexin-37 genes which represent oocyte maturity and oocyte quality (caspase-3 and survivin) were analyzed post-warming. Protein total and specific proteins including FSHR, LHR, and Caspase-3 were also measured to comprehend the effect of vitrification.

This was an in-vitro experimental study conducted from Juli 2020–February 2022 in Morula IVF Jakarta Clinic. A total of 38 cumulus-granulosa cell samples from infertile women diagnosed with polycystic ovary syndrome (PCOS) were analyzed. Vitrification was commenced by exposing the cells sample to the equilibration medium containing 15% EG for 5 minutes followed by exposing the cells to vitrification medium (15% EG and 15% DMSO) for 30 seconds. Cell samples were subsequently immersed in liquid nitrogen (-196 °C) for 5 minutes. Warming procedure using sucrose solution (0.5 M, 0.25 M, 0.125 M) was performed consecutively. Real-time quantitative polymerase chain reaction (rt-qPCR) dan sandwich ELISA was utilized to measure relative expression and concentration of both total and specific protein. Data analysis was performed using T-independent or Mann-Whitney and Pfaffl formulation for fold-changes measurement.

This study found that concentration of both total (30 µg/mL vs. 12.5 µg/mL, $p > 0.05$) and specific proteins was similar between cumulus-granulosa cells of mature and immature oocytes (FSHR: 0.47 µg/mL vs. 0.48 µg/mL, LHR: 0.1 µg/mL vs. 0.09 µg/mL, and caspase-3: 0.51 µg/mL and 0.58 µg/mL, respectively, $p > 0.05$). Relative expression of maturity-associated genes such as BMP-15, LHR and connexin-37 post-warming did not significantly different in either cumulus-granulosa cells obtained from mature or immature oocytes (BMP-15: 1.6 vs. 1.4 fold, LHR: 2.3 vs. 2.3 fold, connexin-37: 0.9 vs. 0.9 fold, $p > 0.05$). However, we observed decreased relative expression of GDF-9 and FSHR post-warming in either cumulus-granulosa cells obtained from mature or immature oocytes (GDF-9: 0.2 vs 0.1 fold, and FSHR: 0.3 vs. 0.02 fold, $p < 0.01$, respectively). In protein level, concentration of FSHR, LHR, and caspase-3 as well as protein total post-warming did not significantly different than that of fresh condition (FSHR: 0.4 vs. 0.4 µg/mL and 0.4 vs. 0.5 µg/mL, LHR: 0.1 vs. 0.1 µg/mL dan 0.1 vs. 0.1 µg/mL, and caspase-3: 1.9 vs. 1.5 µg/mL and 1.7 vs. 1.6 µg/mL, respectively, $p > 0,05$).

This study concluded that vitrification is a safe procedure for fertility preservation which is able to preserve cumulus-granulosa cells viability as a representative of mature and immature oocytes survival post-warming.