

# Aktivitas NADH- tetrazolium reductase sel sel trofoblas pada blastosis yang mengalami hatching dan gagal hatching

<sup>1</sup>Roza Helmita, <sup>2</sup>Ita Djuwita, <sup>3</sup>Bambang Purwantara, <sup>2</sup>Adi Winarto

<sup>1</sup>Mahasiswa Pascasarjana Institut Pertanian Bogor,

<sup>2</sup>Bagian Anatomi, Histologi dan Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,

<sup>3</sup>Bagian Fisiologi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

## ABSTRACT

Implantation is the most critical stage in the establishment of pregnancy. In mammals, it has been estimated that between 25% and 60% of conceptuses are lost before or at the time of implantation. The objectives of this study were to investigate the activity of the mitochondrial NADH-tetrazolium reductase, the outgrowth and differentiation of trophoblast cells in *in vitro* culture of hatched and non hatched blastocyst. Blastocysts were collected from mice cornua utery at day-4 of pregnancy and were divided into 3 groups: blastocysts undergo hatching within 24 hours, 48 hours and non hatching. Embryos were cultured in DMEM medium in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 10 days. The trophoblasts monolayer were processed for Gimsa staining and histochemistry analysis of NADH-tetrazolium reductase activity. The outgrowth of trophoblast cells were measured using eyespiece micrometer. The results showed that the activity of NADH-tetrazolium reductase of 24 h and 48 h hatched blastocysts showed higher intensity than the non hatched blastocysts ( $P < 0,05$ ). The trophoblast outgrowth diameter of 24 h hatched blastocyst was significantly higher than the non hatched blastocyst, but not significantly different with the 48 h hatched. Morphology examination using light microscope showed that the trophoblast monolayer of 24 h hatched blastocyst differentiated into cytotrophoblast, syncytiotrophoblast and spongiotrophoblast after 5 days of *in vitro* cultured. In conclusion, in *in vitro* study the failure of blastocysts implantation was due to the impairment of NADH dehydrogenase activity in complex I mitochondria and the failure of outgrowth and differentiation of the trofoblast cells.

**Key words:** NADH-tetrazolium reductase, trophoblast, hatching, implantation

## PENDAHULUAN

Perkembangan embrio praimplantasi ada kalanya mengalami gangguan, sehingga tidak semua embrio praimplantasi dapat mengalami *hatching* dan implantasi. Hal ini ditunjukkan dari hasil transfer blastosis manusia yaitu hanya sekitar 47%-60% yang berhasil mengalami implantasi dan hamil<sup>1</sup>. Bahkan blastosis yang dikultur *in vitro* kemudian ditransfer, menunjukkan tingkat implantasi sekitar 25%<sup>2</sup>, sedangkan pada mencit tingkat implantasi embrio segar 31.3% dan embrio vitrifikasi 11.1%<sup>3</sup>.

Banyak faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya kegagalan implantasi blastosis di antaranya, adalah: (1) gangguan pada organel sel, misalnya mitokondria sehingga proses pembentukan energi tidak berjalan dengan baik<sup>4,5,6,7,8,9</sup> dan (2) faktor usia tua (*aging*) yang dapat berkontribusi dalam perkembangan kualitas embrio

praimplantasi<sup>10</sup>. Kegagalan ini menyebabkan embrio tidak dapat berkontak dengan endometrium sehingga implantasi dan kebuntingan tidak terjadi.

Selama perkembangan embrio praimplantasi dari zigot sampai mencapai blastosis, terjadi peningkatan aktivitas metabolisme serta kebutuhan energi<sup>11,12</sup>. Proses pembentukan energi sangat berhubungan erat dengan aktivitas mitokondria sebagai organel pembangkit energi dalam sel (*power house cell*) sehingga gangguan atau rusaknya mitokondria dapat mempengaruhi proses pembentukan energi yang sangat dibutuhkan dalam proses *hatching* dan implantasi blastosis. Didalam mitokondria pembentukan energi berupa *adenosin triphosfat* (ATP) terjadi melalui dua interaksi siklus metabolisme, yaitu siklus asam sitrat (siklus kreb's) dan oksidasi fosforilasi (OXPHOS)<sup>13,14</sup>. Salah satu produk dari siklus asam sitrat adalah *nicotinamide adenin dinucleotide dehydrogenase* (NADH) yang

berfungsi sebagai substrat pada reaksi transduksi energi dalam sistem rantai transpor elektron (RTE) atau OXPHOS. Pelepasan energi NADH terjadi secara bertahap dengan melibatkan enzim-enzim seperti NADH-dehidrogenase pada kompleks I<sup>15</sup>.

Walaupun kajian dan informasi terhadap proses implantasi secara *in vitro* telah banyak dilaporkan, namun kajian *in vitro* mengenai kegagalan *hatching* dan implantasi yang dikaitkan dengan kemampuan mitokondria menghasilkan energi untuk pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel trofoblas belum dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari dan memperoleh informasi mengenai: (1) aktivitas *nicotinamide adenin dinucleotide dehydrogenase* (NADH) mitokondria, (2) kemampuan *outgrowth* sel-sel trofoblas dan (3) diferensiasi sel-sel trofoblas dari blastosis yang mengalami *hatching* dan gagal *hatching* dalam medium kultur *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi dasar mengenai pengaruh aktivitas NADH mitokondria selama proses implantasi embrio serta kemampuan sel-sel trofoblas untuk tumbuh dan berdiferensiasi terhadap kegagalan *hatching* dan implantasi.

## BAHAN DAN METODE

### Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Blastosis mencit dibagi kedalam tiga perlakuan, yaitu: (1) blastosis yang *hatching* dan implantasi cepat (24 jam), (2) blastosis yang *hatching* dan implantasi lambat (48 jam) dan (3) blastosis yang gagal *hatching*. Masing-masing kelompok dikultur sampai membentuk monolayer selama 10 hari, selanjutnya diukur penjumlahan sel-sel trofoblas (*outgrowth*) dan diidentifikasi morfologi sel-sel trofoblas yang mengalami diferensiasi serta aktivitas NADH-tetrazolium reductase secara histokimia. Masing-masing perlakuan menggunakan minimal 10 embrio.

### Koleksi Blastosis

Mencit putih (*Mus musculus albino*) dara strain DDY umur 6-8 minggu disuperovulasi dengan penyuntikan hormon *Pregnant mare's serum gonadotrophin* (PMSG, Folligon®, Intervet, Netherland) dengan dosis 5 IU/ekor dan 46 jam kemudian dengan hormon *human chorionic gonadotrophin* (hCG, Chorulon®, Intervet, Netherland) (dengan dosis yang sama) secara *intraperitoneal* (i.p.) Setelah penyuntikan hCG, mencit betina dikawinkan dengan pejantan dengan perbandingan jantan : betina, 1:1. Mencit betina yang telah dikawini pejantan dicirikan

dengan adanya sumbat vagina 18 jam pasca hCG dan dianggap sebagai hari pertama kebuntingan. Sumbat vagina adalah masa perkejuan berwarna putih kekuningan di dalam lumen vagina.

Mencit betina dimatikan 96-98 jam pasca hCG dengan cara *dislocatio cervicalis*. Blastosis diperoleh dengan cara membilas (*flushing*) kedua kornua uterus dengan menggunakan spuit 1 cc yang berisi medium *Modified Phosphat Buffered Saline* (mPBS). Selanjutnya embrio dicuci sebanyak tiga kali di dalam larutan mPBS<sup>16</sup>.

### Kultur Blastosis Secara *In Vitro*

Blastosis yang terkoleksi dimasukkan ke dalam 20 µl medium tetes pada cawan petri steril yang ditutupi dengan mineral oil. Medium yang dipakai adalah *Tissue Culture Medium* (TCM 199 Gibco-BRL) yang diberi gentamicin 50 µg/ml medium, *New Born Calf Serum* (NBCS) 20%. Proses kultur dilakukan di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C selama 24-48 jam sampai blastosis mengalami *hatching*. Blastosis yang gagal *hatching* dan masih hidup dibantu proses *hatching* nya dengan menggunakan enzim pronase 0,05% (Sigma, USA).

Blastosis dari masing-masing kelompok perlakuan dikultur dalam medium *Dubellco's Modified Eagles' Medium* (DMEM Gibco-BRL) yang ditambahkan 50µg/ml gentamicin, NBCS 20%, 1µl/ml ITS (kandungan insulin 5mg/ml, tranferin 10mg/ml, selenium 5mg/ml; Sigma St Louis USA) dan β-mercaptoethanol 14,3 mM (Sigma St Louis USA). Blastosis dikultur selama 10 hari sampai sel-sel trofoblas membentuk monolayer

### Pengukuran *Outgrowth* Sel-sel Trofoblas

Dalam medium kultur *in vitro* sel-sel trofoblas akan tumbuh dan melakukan penjumlahan ke arah eksternal, yang diistilahkan dengan *outgrowth*. *Outgrowth* sel-sel trofoblas diukur dengan menggunakan *eyespiece micrometer* dibawah mikroskop inverted cahaya.

### Morfologi Sel Trofoblas Secara Histologis

Pengamatan morfologi sel-sel trofoblas yang mengalami diferensiasi dilakukan dengan pewarnaan Giemsa sebagai berikut: Preparat monolayer sel-sel trofoblas direndam dalam metanol selama 30 menit, kemudian dibilas dengan akuades selama lima menit sebanyak tiga kali. Selanjutnya diwarnai dengan Giemsa selama 10- 15 menit dan dibilas kembali dengan akuades sebanyak tiga kali selama lima menit, dan diperiksa dibawah mikroskop cahaya<sup>17</sup>.

### Aktivitas NADH-Tetrazolium Reduktase dengan Pewarnaan Histokimia

Adanya aktivitas (produksi) NADH diuji secara histokimia menggunakan reaksi NADH-tetrazolium reduktase berdasarkan metode Malik et al.<sup>15</sup> dengan modifikasi. Penilaian aktivitas NADH-TR dilakukan berdasarkan pengamatan intensitas warna biru dari nitroblue tetrazolium pada sel-sel trofoblas yakni: (1) biru tua, (2) biru, (3) biru muda, dan (4) tidak berwarna biru. Warna biru tua atau biru pada sel trofoblas menunjukkan kadar enzim NADH yang tinggi yang mengindikasikan bahwa fungsi mitokondria untuk menghasilkan ATP dalam kondisi sangat baik. Sedangkan biru muda atau tidak berwarna biru menunjukkan kadar enzim NADH yang rendah yang mengindikasikan adanya gangguan atau disfungsi pada fungsi mitokondria untuk menghasilkan ATP.

### Pemeriksaan aktivitas NADH tetrazolium reduktase secara histokimia:

- a. Monolayer sel-sel blastosis diinkubasi pada suhu 37°C, dalam campuran pereaksi yang terdiri dari: 0,2 mol/L buffer fosfat (pH 7,4) yang mengandung 0,1 mol/L sodium laktat, 0,1% laktat dehydrogenase (LDH; Boehringer Mannheim), 0,5 mg/ml NAD (Boehringer Mannheim) dan 0,5 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT; Boehringer Mannheim), selama 60 menit dalam suasana gelap.
- b. Reaksi enzim NADH-TR dihentikan dengan mencuci kultur monolayer sel dengan buffer fosfat 0,05 mol/L. NADH-TR akan mengubah NBT yang tidak berwarna menjadi produk reduksi yang berwarna biru. Pengamatan dilakukan terhadap intensitas perbedaan warna biru diantara tiga kelompok perlakuan.

### Analisis Data

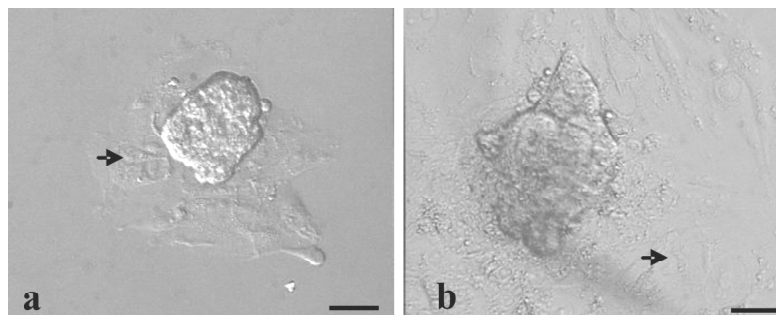
Data *outgrowth* (pertumbuhan) sel trofoblas dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Sedangkan data morfologi sel-sel trofoblas yang mengalami diferensiasi berupa data kualitatif, dianalisis secara deskriptif. Data aktivitas NADH-TR yang berupa data kualitatif, dianalisis dikonversi untuk dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pertumbuhan (*outgrowth*) Sel-Sel Trofoblas

Sebelum dan pada saat implantasi didalam uterus blastosis akan mengalami serangkaian proses yakni: (1) *Hatching* (penetasan atau keluarnya) blastosis dari zona pelusida, (2) adhesi dan perlekatan sel-sel trofoblas ke dinding endometrium (3) proliferasi, serta diferensiasi, dan (4) sel-sel trofoblas melakukan invasi serta infiltrasi kedalam endometrium. Secara *in vitro* proses tersebut diatas terbatas pada proses *hatching*, adesi dan perlekatan yang diikuti dengan pertumbuhan (*outgrowth*) dan diferensiasi sel-sel trofoblas. *Outgrowth* dan diferensiasi sel-sel trofoblast tersebut dapat dianalogkan dengan proses invasi secara *in vivo*, sedangkan proses infiltrasi tidak teramati karena sistem kultur yang digunakan dilapisi *feeder layer* yang bertindak dinding endometrium.

Blastosis *hatching* yang dikultur secara *in vitro* mengalami proses adesi dan perlekatan dalam waktu 24 jam kultur, sedangkan mitosis dan proliferasi sel-sel trofoblas tampak setelah 48 jam kultur sehingga terjadi peningkatan diameter *outgrowth* sel-sel trofoblas membentuk monolayer dengan arah radial yang tidak beraturan (Gambar 1).



**Gambar 1. Pertumbuhan sel-sel trofoblas didalam medium kultur *in vitro*. (a) Hari ke-2, (b) Hari ke-5. Tanda panah: Pertumbuhan sel-sel trofoblast dalam bentuk monolayer yang tidak beraturan. Bar: 50µm.**

Hasil pengukuran diameter sel-sel trofoblas yang tumbuh selama 10 hari kultur pada blastosis yang *hatching* dalam waktu 24 dan 48 jam adalah masing-masing  $549,7 \pm 322,28 \mu\text{m}$  dan  $395,6 \pm 143,71 \mu\text{m}$ , dan keduanya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perbedaan waktu blastosis 'hatching' tidak memberikan pengaruh yang bermakna ter-

hadap tingkat pertumbuhan sel-sel trofoblas. Pertumbuhan sel-sel trofoblas dari blastosis yang *hatching* 24 jam secara bermakna lebih tinggi jika dibandingkan dengan blastosis gagal *hatching* ( $549,7 \pm 322,28 \mu\text{m}$  vs  $180,2 \pm 59,68 \mu\text{m}$  (Tabel 1) dan (Gambar 1). Dengan demikian, kegagalan *hatching* berkaitan dengan rendahnya kemampuan pertumbuhan sel-sel trofoblas.

**Tabel 1 Diameter pertumbuhan sel-sel trofoblas**

Waktu <i>hatching</i>	Jumlah blastosis	Mean $\pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )
24 jam	20	$549.7 \pm 322^a$
48 jam	6	$395.6 \pm 143^{ab}$
Gagal	12	$180.2 \pm 59^b$

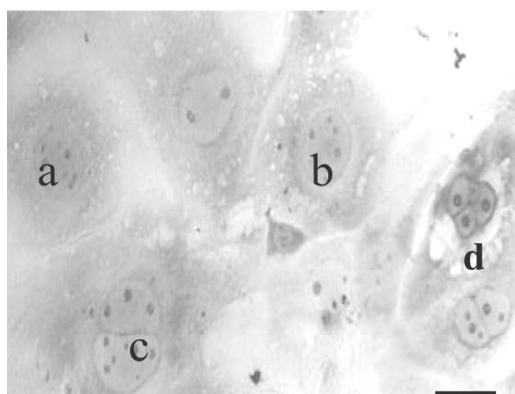
Keterangan: *Superscript* berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ )

### Diferensiasi Sel-sel Trofoblas

Setelah blastosis *hatching* dari zona pelusida, sel trofoblas akan menempel dan melekat pada dinding endometrium dan perlekatan tersebut menjadi stabil dan kuat. Sel trofoblas akan invasi kedalam dinding endometrium dan mengalami diferensiasi menjadi *cytotrophoblast* dan *syncytiotrophoblast* yang merupakan bagian penyusun plasenta<sup>6,19</sup>.

Dalam medium kultur *in vitro*, sel-sel trofoblas mengalami diferensiasi setelah 24 jam

blastosis mengalami perlekatan. Hasil pengamatan morfologi didapatkan adanya berbagai variasi bentuk-bentuk sel trofoblas yaitu sel dengan satu nukleus yang menyerupai *cytotrophoblast*, sel dengan dua sampai tiga nukleus yang menyerupai *syncytiotrophoblast* dan didalamnya terdapat nukleolus yang banyak. Selain itu terdapat sel dengan satu nukleus yang besar. Sel ini menyerupai *trophoblast giant cell* (TGC) (Gambar 2).



**Gambar 2. Morfologi sel-sel trofoblas yang telah mengalami diferensiasi. (a) Cytotrophoblasts, (b) Trophoblast Giant Cell (TGC), (c) Syncytiotrophoblasts, (d) Spongiotrophoblasts. Pewarnaan Giemsa. Bar:  $50\mu\text{m}$ .**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kemampuan diferensiasi antara blastosis yang *hatching* (24 dan 48 jam) dengan blastosis yang gagal *hatching*. Pada blastosis yang gagal *hatching* terdapat dalam jumlah kecil sel-sel trofoblas yang mengalami diferensiasi menjadi *cytotrophoblast* dan *syncytiotrophoblast*, namun secara morfologi menunjukkan kualitas yang buruk yang ditandainya dengan banyaknya vakuola pada sitoplasma yang mengindikasikan sel mengalami lisis atau apoptosis.

Diferensiasi sel-sel trofoblas penting dalam mempertahankan kebuntingan. Secara *in vivo cytotrophoblast* akan berproliferasi dan invasi ke dalam endometrium untuk membentuk *anchoring villi* dan selanjutnya berdiferensiasi membentuk *syncytiotrophoblast*. *Syncytiotrophoblast* berfungsi sebagai tempat pertukaran nutrisi dari maternal ke fetus, metabolisme dan sintesis hormon steroid dan peptida yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan fetus, seperti *human chorionic gonadotrophin* (hCG).

Diferensiasi *trophoblast giant cell* (TGC) penting dalam menghasilkan metalloproteinase dan mensintesis beberapa kelompok plasental prolactin termasuk plasental lactogen (PL)-I, PL-II dan proliferasi. PL-I dan PL-II penting dalam mempertahankan korpus letum selama kebuntingan dan menstimulasi produksi progesteron yang penting untuk perkembangan kelenjar susu dan laktasi<sup>19,20</sup>.

Sel TGC melakukan proses endoreduplikasi, seperti melanjutkan sintesis DNA tanpa pembelahan sel (endoreduplikasi). Sel *spongiotrofoblas* juga terlibat dalam aktivitas endokrin.

### Identifikasi Aktivitas NADH- Tetrazolium Reductase

Blastosis yang mengalami *hatching* ditandai dengan terjadinya penipisan zona pelusida dan terjadi peningkatan jumlah blastomer serta besarnya blastosul blastosis, sehingga dapat memperbesar tekanan dari dalam zona pelusida. Akibatnya elastisitas zona pelusida mulai berkurang dan menipis. Dengan demikian *hatching* memerlukan tekanan yang besar dan membutuhkan energi yang tinggi. Kebutuhan energi yang tinggi dalam melakukan *hatching* dan implantasi sangat berhubungan erat dengan kondisi mitokondria sebagai pabrik penghasil energi dalam sel.

Hasil identifikasi terhadap aktivitas enzim NADH-TR pada sel-sel trofoblas menunjukkan perbedaan intensitas warna yang nyata antara blastosis yang *hatching* 24 dan 48 jam dengan blastosis gagal *hatching* (Tabel 2)(Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas NADH pada sel-sel trofoblast blastosis yang mampu *hatching* dalam waktu 24 dan 48 jam secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan blastosis gagal *hatching*.

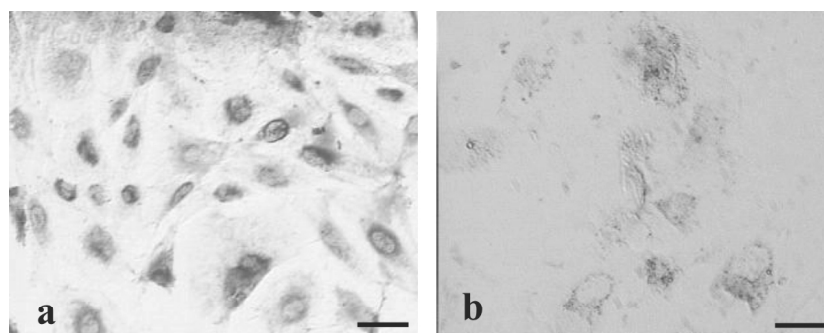
Tabel 2 Hasil pewarnaan histokimia terhadap aktivitas NADH-TR

Waktu <i>hatching</i>	Jumlah blastosis	Intensitas warna biru (Skor)				Rata-rata skor
		3	2	1	0	
24 jam	15	15	0	0	0	3.0 <sup>a</sup>
48 jam	6	6	0	0	0	3.0 <sup>a</sup>
Gagal	12	0	0	1	11	0.08 <sup>b</sup>

Ket: 3: Biru tua, 2: Biru, 1: Biru muda, 0: tidak berwarna biru. Huruf superscript berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ )

Keberadaan enzim NADH-dehidrogenase dapat dijadikan sebagai indikator dalam menentukan sedikit atau banyaknya energi yang akan dihasilkan. Enzim NADH- dehidrogenase merupakan enzim yang berperan penting dalam sistem transpor elektron pada kompleks I di mitokondria. Adanya gangguan mitokondria pada komponen kunci rantai transpor elektron seperti NADH-dehidrogenase pada

kompleks I dapat mengakibatkan terganggu atau tidak terbentuknya elektron sehingga ATP tidak dihasilkan dengan efisien dan dapat mengganggu fisiologis sel. Terganggunya fisiologis sel dapat mengakibatkan sel mengalami nekrosis atau apoptosis sehingga sel tidak dapat tumbuh dan berdiferensiasi ke proses selanjutnya.



**Gambar 3** Aktivitas NADH-tetrazolium reductase pada monolayer sel-sel trofoblas berdasarkan intensitas warna. (A) Blastosis 24 jam *hatching* dengan intensitas biru tua (tampak berwarna gelap), (B) Blastosis gagal *hatching* dengan tidak menghasilkan warna biru (tampak terang). Pewarnaan histokimia. Bar: 50µm.

Kemampuan pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel trofoblas berkorelasi positif dengan kandungan energi yang dihasilkan oleh mitokondria. Berdasarkan hasil pengukuran terhadap diameter pertumbuhan dan kemampuan diferensiasi sel-sel trofoblas pada blastosis yang *hatching* 24 dan 48 jam menunjukkan angka rata-rata yang tinggi dibandingkan dengan blastosis yang gagal *hatching*. Demikian pula dengan aktivitas NADH-dehidrogenase pada blastosis yang *hatching* 24 dan 48 jam menunjukkan aktivitas yang tinggi dibandingkan dengan blastosis yang gagal *hatching*. Ini berarti blastosis yang mampu *hatching* dalam waktu 24 dan 48 jam memiliki kualitas yang baik. Sebaliknya blastosis yang gagal *hatching* memiliki kualitas sel yang tidak bagus sehingga pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel trofoblas tidak bagus.

Kemampuan sel untuk melakukan aktivitas metabolisme sangat tergantung dari kondisi organel khususnya mitokondria. Kerusakan atau disfungsi pada mitokondria akan mengganggu aktivitas metabolisme khususnya dalam memproduksi energi yang dibutuhkan untuk proses pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel trofoblas. Kurangnya produksi energi pada awal implantasi dapat menghambat proliferasi dan diferensiasi *cytotrophoblast* dan *syncytiotrophoblast*.

## KESIMPULAN

Blastosis yang *hatching* dalam waktu 24 dan 48 jam menunjukkan kemampuan pertumbuhan dan diferensiasi sel trofoblas, serta aktivitas NADH-dehidrogenase yang tinggi, sebaliknya blastosis yang gagal *hatching* pertumbuhan, diferensiasi dan aktivitas NADH-dehidrogenase sel trofoblas rendah. Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa kegagalan *hatching* pada blastosis berkaitan

erat dengan rendahnya aktivitas NADH-dehidrogenase yang mengakibatkan rendahnya kemampuan pertumbuhan (proliferasi) dan diferensiasi sel-sel trofoblas sehingga menimbulkan kegagalan implantasi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Fong CY *et al.* Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocysts: zona-free blastocyst transfer and rescue of blastocysts with hatching difficulties. *Hum Reprod* 2001;16(3): 540-546.
2. Norwitz E.R, Chust, J.S, Fisher J.F. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001;345(19).
3. Hredzak *et al.* Influence of slow-rate freezing and vitrification on mouse embryos. *Acta Vet* 2005;74:23-27.
4. Dey SK *et al.* Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews* 2004;25(3): 341-373.
5. Tsuzuki, Y, Hisanaga M, Ashizawa K, Fujihara N. The effect of dimethyl – sulfoxide and sucrose as a cryoprotectant on the adenosine triphosphate and ultrastructure of bovine oocytes mature in vitro. *J.Anim. Sci.* 2001;14 (10): 1353-1359.
6. Horse KR *et al.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface *J. Clin. Invest.* 2004;114:744-754.
7. Tamassia *et al.* In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogrup. *Biol Reprod* 2004;71:697-704.
8. John JC. The trasmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. *Theriogenology* 2002;57:109-123.
9. Blerkom JV. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ion regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;128: 269-280.

10. Acton BM, Jurisicova A, Jurisica I, Casper R.F. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod* 2004;10 (1) : 23-32.
11. Trimachi R J *et al.* Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2000;62: 1866-1874.
12. Ludwig TE, Squirrell JM, Palmenberg AC, Bavister BD. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 2001;65: 1648–1654.
13. Klobuear NK dan Gorup M. Histochemical investigations of NADPH-and NADH-tetrazolium reductase Activity in the Liver of Selenium and Copper Treated Carp (*Cyprinus carpio*L.). *Veterinarski Arhiv* 2004;74 (5): 331-340
14. Brookes PS *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287: C817-C833.
15. Dimauro S, Schon Erick A. Mitochondrial respiratory-chain disease. *The N Engl J Med* 2003;348 (26): 2656-2668.
16. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994.
17. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York USA. Pergamon Press. 1990.
18. Malik S, Sudoyo H, Marzuki S. Microphotometric analysis of NADH-tetrazolium reductase deficiency in fibroblast of patients with leber hereditary optic neuropathy. *J Inherit Metab Dis*. 2000;23:730-744.
19. Hashash AHK EI dan Kimber SJ. Trophoblast differentiation in vitro: establishment and Characterisation of a Serum-Free Culture Model for Murine Secondary Trophoblast Giant Cells. *Reproduction* 2004;128:53-71
20. Nadra K *et al.* Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$ . *Molecular and Cellular Biol*. 2006;26:3266-3281.