

PERKEMBANGAN KOLONI PRIMER *EMBRYONIC STEM CELL* (ESC) MENCIT PASCA VITRIFIKASI *INNER CELL MASS* (ICM)

Ratih Rinendyaputri*¹ dan Arief Boediono²

¹Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI

* Email: ratih79@yahoo.com.,

²Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

DEVELOPMENT OF PRIMARY MURINE EMBRYONIC STEM CELL (ESC) COLONIES POST-VITRIFIED INNER CELL MASS (ICM)

Abstract

Application or the basic research of the stem cells is continously conducted to explore their potential, particularly the use of stem cells in health. Cryopreservation technology is needed to maintain availability of stem cell. This study was aimed to observe the development of murine embryonic stem cell (ESC) primary colonies post-vitrified inner cell mass (ICM). Inner cell mass (ICM) was derived from blastocysts of murine embryos of female Swiss webster mice using pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) and human chorionic gonadotropin (hCG). Inner Cell Mass (ICM) was isolated from blastocysts by immunosurgery. Inner Cell Mass (ICM) were divided into two groups: the control and vitrified ICM. Both groups were cultured and observed on the ICM attachment (attachment rate/AR), the primary formation of ESC colonies (primary colony/PC) and diameter of primary colony ESC which grouped into small, medium and large. The results showed that AR and medium diameter's group of primary colony ESC were lower ($p < 0.05$) in vitrified ICM than control ICM. However the percentage of PC and diameter of primary colonies ESC in small and large groups were not different compared with control ($p > 0.05$). This study shows that vitrification for cryopreserving ICM can be used as an alternative source of ESC.

Key words: blastocyst, inner cell mass, ICM, vitrification

Abstrak

Aplikasi maupun penelitian dasar untuk menggali potensi sel punca khususnya pemanfaatan sel punca di bidang kesehatan terus dilakukan. Teknologi kriopreservasi dibutuhkan untuk menjaga ketersediaan sel punca. Penelitian ini bertujuan mengamati perkembangan koloni primer embryonic stem cell (ESC) mencit pasca vitrifikasi inner cell mass (ICM). Inner Cell Mass (ICM) diperoleh dari embrio blastosis mencit betina Swis webster menggunakan pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) dan human chorionic gonadotropin (hCG). ICM diisolasi dari embrio blastosis menggunakan metode immunosurgery. ICM yang diperoleh dibagi menjadi dua kelompok yaitu ICM kontrol dan ICM vitrifikasi. Kedua kelompok dikultur serta dilakukan pengamatan terhadap tingkat perlekatan (attachment rate/AR) ICM, tingkat pembentukan koloni primer ESC (primary colony/PC) dan diameter koloni primer ESC yang dikategorikan menjadi 3 kelompok yaitu kecil, sedang dan besar. Hasil menunjukkan bahwa ICM vitrifikasi mempunyai persentase AR dan diameter koloni primer ESC pada kelompok sedang lebih

Submit : 30-01-2013 Review : 08-02-2013 Review : 11-03-2013 revisi : 26-03-2013

rendah ($p < 0,05$) terhadap ICM kontrol. Namun persentase PC serta diameter koloni primer ESC kelompok kecil dan besar pada ICM vitrifikasi tidak menunjukkan perbedaan ($P > 0,05$) terhadap kontrol. Penelitian ini menunjukkan bahwa vitrifikasi dapat digunakan untuk kriopreservasi ICM sebagai sumber ESC.

Kata kunci : blastosis, inner cell mass, ESC, vitrifikasi

PENDAHULUAN

Embryonic Stem Cell (ESC) merupakan sumber sel punca (*stem cell*) yang bersifat pluripotensi. Hal ini merupakan potensi sangat besar untuk dapat dimanfaatkan pada terapi sel dan sel diagnostik untuk skrining toksisitas obat.¹ Penelitian untuk menggali potensi sel punca di berbagai sentra mengenai aplikasi dan penelitian dasar sel punca terus dilakukan. Peningkatan teknologi dalam penanganan dan manipulasi sel punca khususnya simpan beku sel punca (*stem cell banking*) perlu diimbangi²

Masalah utama pada proses simpan beku (kriopreservasi) sel adalah terbentuknya kristal es (*ice crystal*) intraseluler. Hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Usaha untuk mencegah kerusakan sel dilakukan dengan pengembangan metode vitrifikasi. Metode vitrifikasi adalah metode penyimpanan sel dengan mengeluarkan sebagian besar air yang terkandung di dalam sitoplasma sel sehingga tidak terbentuk kristal es. Metode ini lebih mudah, efisien dan sederhana karena tidak menggunakan alat yang mahal, tetapi tingginya konsentrasi krioprotektan yang digunakan dapat bersifat toksik terhadap sel.³

Beberapa peneliti telah melakukan metode vitrifikasi pada kriopreservasi beberapa tipe sel seperti *ESC line* dan embrio. Reubinoff dkk **Error! Bookmark not defined.** pertama kali melaporkan vitrifikasi pada *human ESC line* dan *ESC line* primata oleh Fujiokai⁴, sedangkan pada embrio manusia dilaporkan Vanderzwalmen⁵ dan sel telur

mencit oleh Pedro.⁶ Krio-preservasi ICM dari blastosis mencit dengan metode vitrifikasi pertama kali berhasil dilakukan oleh Desai⁷ namun pengaruh vitri-fikasi ICM terhadap perkembangan koloni primer ESC belum dilaporkan.

Keberhasilan penyimpanan metode vitrifikasi berbeda-beda pada tiap jenis sel. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui perkembangan koloni primer ESC pasca kriopreservasi ICM menggunakan metode vitrifikasi dengan melakukan pengamatan terhadap tingkat perlekatan ICM (*attachment rate/AR*), pembentukan koloni primer (*primary colony/PC*) ESC serta mengukur diameter koloni primer ESC.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan – Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dari bulan Maret 2010 - Desember 2011.

Persiapan

Superovulasi dan Produksi Blastosis

Untuk produksi blastosis digunakan mencit betina dan jantan strain *Swiss webster* berumur tujuh minggu dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Sinkronisasi dan superovulasi dilakukan pada 15 ekor mencit betina. Terhadap mencit betina yang menunjukkan adanya *vagina plug* dilakukan euthanasia menggunakan eter

empat hari kemudian.⁸ Terhadap mencit yang sudah mati dilakukan pembedahan pada bagian *abdomen* dan isolasi uterus. Uterus yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam medium *modified phosphate buffer saline* (mPBS). Koleksi blastosis dilakukan dengan membilas bagian dalam uterus, menggunakan *syringe* 1 cc 27 G dengan medium mPBS di bawah mikroskop stereo.

Isolasi ICM dengan teknik *immunosurgery*

Embrio tahap blastosis dimasukkan ke dalam larutan pronase 0,25% untuk menghilangkan *zona pellucida*, yang selanjutnya dipaparkan dalam *rabbit antimouse serum* selama 60 menit dan *complement* dari *guinea pig* selama 30 menit pada suhu kamar untuk melisis sel-sel trofoblasnya.⁸ Hasil adalah ICM yang terbebas dari trofoblas.

Perlakuan

Metode vitrifikasi dan *warming*

Vitrifikasi dan *warming* ICM dilakukan sesuai Boediono⁹ pada vitrifikasi embrio, dengan modifikasi konsentrasi krioprotektan *etilen glikol* (EG) dan *dimethyl sulphoxide* (DMSO) pada medium vitrifikasi dari 20% menjadi 15%.

ICM yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam medium ekuilibrisasi yang terdiri dari mPBS 20% FBS dan EG 10% selama 10 menit, selanjutnya dipindahkan ke medium vitrifikasi selama < 60 detik. Medium vitrifikasi terdiri dari mPBS 20% FBS, 0,5 M sukrosa, EG 15% dan DMSO 15%. ICM diletakkan pada ujung runcing *straw* dan dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi nitrogen cair.

Warming dilakukan dengan cara memasukkan ujung *straw* yang berisi ICM ke dalam larutan mPBS 20% FBS dengan 0,5 M, 0,25 M dan 0,125 M sukrosa. ICM kemudian dicuci ke dalam medium kultur dan selanjutnya dikultur dalam medium kultur.

Kultur ICM setelah Vitrifikasi

Sejumlah 140 ICM dibagi menjadi 70 ICM sebagai kontrol dan 70 ICM divitrifikasi, kemudian keseluruhan ICM dikultur dalam cawan dengan dasar gelatin dan medium dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37 °C. Penggantian medium kultur ICM dilakukan setiap dua hari.

Pengamatan untuk mendapatkan tingkat perlekatan ICM (*attachment rate/AR*) dilakukan pada hari pertama dan kedua kultur. AR adalah jumlah ICM yang melekat pada cawan dibagi jumlah ICM yang dikultur. Pengamatan untuk mendapatkan tingkat pembentukan koloni primer ESC (*primary colony/PC*) dilakukan setelah tujuh hari kultur. PC adalah jumlah ICM yang berkembang menjadi koloni primer ESC dibagi jumlah ICM yang melekat pada cawan.

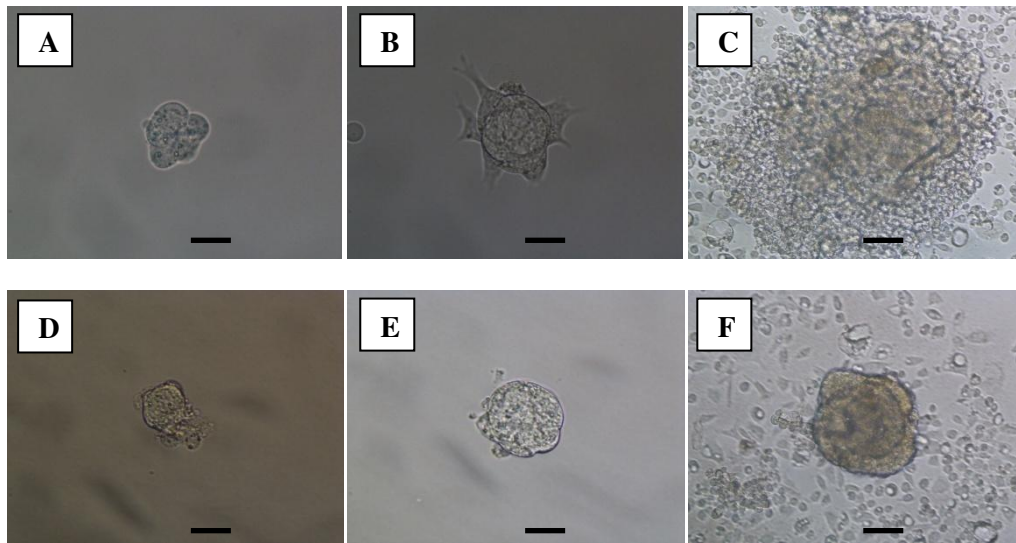
Koloni primer ESC pada hari ke 7 kultur diukur diameter koloninya menggunakan mikrometer pada lensa okuler mikroskop *inverted*. Diameter koloni ESC dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kecil (50-100 µm), sedang (120-160 µm) dan besar (> 180 µm) pada kedua kelompok sesuai yang dilakukan Desai.⁷ Komposisi medium kultur yang digunakan sama dengan komposisi yang digunakan oleh Matahine.⁸

Analisa Data

Data yang dihasilkan dalam penelitian ini (data AR, PC dan diameter koloni primer ESC) diolah dengan SPSS 15 dan dianalisa menggunakan *Chi-square*. Batas kepercayaan adalah 0,05.

HASIL

Inner Cell Mass (ICM) kontrol dan vitrifikasi (Gambar 1. A dan D) dari embrio blastosis mampu melekat pada cawan petri yang telah dilapisi dengan gelatin 0,1% pada hari ke 1-2 (Gambar 1. B dan E). Pada hari ke 7 ICM yang telah melekat sebagian besar



Gambar 1. Profil ICM kontrol (A-C) dan paska vitrifikasi (D-F) serta perkembangannya menjadi koloni primer ESC dalam kultur *in vitro*. A dan D. ICM 3 jam kultur, B dan E. ICM 2 hari kultur, C dan F. koloni primer ESC hari ke 7 kultur. Bar: 50μm.

mampu berkembang menjadi koloni primer ESC. Koloni primer ESC yang terbentuk pada kontrol maupun vitrifikasi menunjukkan morfologi yang bulat kompak dengan batas pinggir yang jelas (Gambar 1. C dan F). Secara morfologi koloni primer ESC setelah kultur hari ke 7 tidak menunjukkan diferensiasi spontan pada ICM kontrol maupun vitrifikasi.

Tabel 1. Persentase *Attachment Rate* (AR) dan *Primary Colony* (PC) pada Kelompok Kontrol dan Vitrifikasi

Aspek	% nilai rerata $\pm$ SD	
	Kontrol (n=70)	Vitri- fikasi (n=70)
<i>Attachment rate</i> (AR)	55 (78,57 $\pm$ 7,50)	45 (64,29 $\pm$ 10,10)*
<i>Primary colony</i> (PC)	32 (71,00 $\pm$ 10,48)	23 (67,50 $\pm$ 15,44)

* Menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$)

Pada kondisi kultur *in vitro* ditunjukkan bahwa tingkat perlekatan ICM (*attachment rate*/AR) kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan tingkat perlekatan ICM (AR) vitrifikasi ($p < 0,05$). Namun ICM kontrol dan vitrifikasi dapat berkembang menjadi koloni primer ESC dan hal ini ditunjukkan dengan tingginya tingkat pembentukan koloni primer ESC pada kedua kelompok (Tabel 1).

Pada ICM kontrol dan vitrifikasi setelah mengalami kultur secara *in vitro* selama 7 hari ditunjukkan bahwa diameter koloni primer ESC pada kedua kelompok rata-rata dapat mencapai $> 180 \mu\text{m}$. Namun sebagian besar diameter koloni primer ESC pada kelompok kontrol dapat mencapai 120-160 μm .

PEMBAHASAN

***Attachment rate* (AR) dan *primary colony* (PC) dari *Inner cell mass* (ICM) pasca vitrifikasi**

Penelitian ini menunjukkan bahwa ICM sebagai sumber ESC memiliki tingkat

perlekatan ICM (*attachment rate*/AR) di cawan yang telah dilapisi gelatin mencapai 55% pada hari ke 1 sampai dengan ke 2 kultur (Gambar 1, Tabel 1). Namun hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh Tanaka¹⁰ dan Matahine.⁸ Tanaka menyatakan bahwa isolasi ICM dari embrio tahap blastosis dapat mencapai AR 100%, sedangkan Matahine⁸ melaporkan bahwa AR ICM mencapai lebih dari 79,63%.

Rendahnya AR ICM pada penelitian ini baik pada ICM kontrol maupun ICM vitrifikasi dapat disebabkan oleh kualitas embrio. Kualitas embrio dapat dipengaruhi oleh kualitas kematangan sel telur atau kerusakan embrio yang terjadi saat poses *handling* pencucian atau pada saat penghilangan zona pelusida sehingga mempengaruhi tingkat AR ICM. **Error! Bookmark not defined.**

Tabel 2. Diameter Koloni Primer ESC pada kelompok kontrol dan vitrifikasi hari ke 7 kultur

Ukuran Diameter koloni	% nilai rerata $\pm$ SD	
	Kontrol (n=32)	Vitri-fikasi (n=23)
Kecil (50-100 μ m)	9 (28,13 $\pm$ 4,52)	10 (43,48 $\pm$ 0,00)
Sedang (120-160 μ m)	14 (43,75 $\pm$ 13,8)	8 (34,78 $\pm$ 6,02)*
Besar (> 180 μ m)	9 (28,13 $\pm$ 10,54)	5 (21,74 $\pm$ 10,10)

* menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$)

Pada ICM vitrifikasi ditunjukkan AR yang lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Desai dkk⁷ yang mencapai 95%. Meskipun AR pada ICM vitrifikasi lebih rendah dibandingkan ICM kontrol ($p < 0,05$), namun ICM kontrol dan ICM vitrifikasi yang telah melekat pada cawan mampu berkembang menjadi koloni primer ESC ($p > 0,05$, Tabel 1). Rendahnya AR dan PC pada ICM kontrol dan ICM vitrifikasi dapat

disebabkan oleh faktor internal yaitu kualitas embrio dan faktor lingkungan seperti proses kriopreservasi dan kondisi kultur. Menurut El-Danasouri and Selman² ketrampilan dalam *handling* sel berpengaruh terhadap keberhasilan vitrifikasi. Selain itu rendahnya AR ICM pada ICM vitrifikasi dapat disebabkan karena kerusakan struktur protein ekstraseluler atau molekul adhesi (*extraseluler matrix*/ECM) pada ICM seperti *gap junction*, *integrin*, *chaderin*, *catenins* dan *matrix metalloproteinases* (MMps).^{11, 12} Sub koloni ESC merupakan *social cell* sehingga dalam perkembangannya dibutuhkan interaksi antar sel maupun sel dengan lingkungan, yang dapat menyebabkan kerusakan DNA, organel intraseluler serta rusaknya ECM pada ICM pasca vitrifikasi yang dapat menurunkan AR dan PC.¹³

Kerusakan tersebut dapat terjadi karena kejutan dingin atau osmotik serta toksisitas krioprotektan. Untuk menghindari kejutan osmotik ditambahkan sukrosa dengan molaritas tinggi dan konsentrasi bertahap sehingga krioprotektan intraseluler dapat secara cepat keluar sel dan digantikan oleh air.¹⁰ Modifikasi waktu pemaparan, jenis dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan usaha meningkatkan pendinginan dan menghindari terjadinya kejutan osmotik. Kecepatan pendinginan dapat berdampak pada kecepatan pembekuan, dan mengurangi toksisitas krioprotektan. Krioprotektan dapat bersifat toksik terhadap sel jika sel mengalami dehidrasi yang cukup berat.¹⁴ Menurut Djuwantono¹⁵ penggunaan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi pada saat proses simpan beku dapat menyebabkan denaturasi pada protein-protein di permukaan membran sel, sehingga konsentrasi, jenis krioprotektan serta lama pemaparan pada krioprotektan merupakan hal yang penting untuk tetap menjaga kualitas sel.

Untuk mengurangi efek toksik dari penggunaan krioprotektan, maka dilakukan

beberapa teknik pada saat melakukan vitrifikasi khususnya pada vitrifikasi ICM. Salah satu teknik yang telah digunakan dalam vitrifikasi embrio dan ICM adalah dengan mengurangi volume krioprotektan dan meningkatkan viskositas pada medium vitrifikasi sehingga proses pendinginan berjalan dengan cepat.³ Selain itu penggunaan wadah dalam proses vitrifikasi dapat mempercepat proses pendinginan saat ICM masuk ke dalam nitrogen cair. Dalam penelitian ini proses vitrifikasi ICM dilakukan dengan menggunakan *hemi-straw* yang merupakan salah satu wadah dengan sistem terbuka dan belum pernah dilakukan sebelumnya. *Hemi-straw* dilaporkan efektif pada vitrifikasi embrio blastosis manusia oleh Vanderzwalmen⁵. Penggunaan wadah dengan sistem terbuka dapat meningkatkan kecepatan pendinginan karena saat vitrifikasi, ICM dan medium vitrifikasi dalam wadah dapat langsung kontak dengan nitrogen cair (N₂). Pada vitrifikasi ICM maupun suspensi ESC yang dilakukan oleh Desai⁷ dan Reubinoff² pada kedua sistem baik terbuka (*open pulled straw*/OPS) maupun tertutup (*high security vitrification*/HSV) mempunyai efektifitas yang sama.

Diameter koloni primer *Embryonic stem cell* (ESC) dari *Inner cell mass* (ICM) pasca Vitrifikasi

Secara morfologi perkembangan ICM yang telah melekat dan berkembang menjadi koloni primer ESC tidak menunjukkan adanya koloni yang berdiferensiasi spontan setelah kultur 7 hari secara *in vitro* (Gambar 1). Peningkatan diameter koloni primer ESC dapat menjadi salah satu parameter adanya pertumbuhan koloni primer ESC. Pertumbuhan koloni primer ESC dalam penelitian ini rata-rata diameter koloni ESC dapat mencapai ukuran yang besar (> 180 µm) pada kedua kelompok (Tabel 2), hal ini menunjukkan bahwa sistem vitrifikasi ICM serta sistem kultur mendukung untuk per-

tumbuhan koloni primer ESC. Kondisi kultur khususnya medium kultur ICM yang optimum dapat menentukan perkembangan ICM menjadi koloni primer ESC sampai pada pembentukan *ESC line* serta tetap menjaga pluripotensi koloni ESC. Penggunaan *feeder layer*, *conditioned medium*, penambahan serum dan beberapa faktor pertumbuhan (*growth factor*) merupakan beberapa usaha yang dilakukan untuk mengoptimalkan kondisi kultur *in vitro* dalam memproduksi ESC.

Kultur *in vitro* dalam memproduksi ESC dalam penelitian tidak menggunakan *feeder layer* namun menggunakan gelatin pada dasar cawan dan menambahkan serum serta *leukimia inhibitory factor* (LIF) sebagai *growth factor*. Penambahan beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan dalam kondisi *feeder-free* dapat mendukung perkembangan koloni ESC, sedangkan sebagai matriks ekstraseluler dapat digantikan dengan penggunaan gelatin, matrigel atau laminin. Menurut Yang dkk¹⁶ penggunaan gelatin dapat mendukung perkembangan koloni ESC manusia. Penambahan *growth factor* yang sesuai pada medium kultur sehingga kondisi kultur optimal tidak hanya dapat menjaga pertumbuhan dan pluripotensi ESC tetapi juga akan menurunkan kondisi basal apoptosis seperti protein pro apoptotik.¹⁷

Pada ESC mencit LIF merupakan sitokin anggota interleukin 6 (IL-6) yang akan mengaktifasi *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3) sebagai faktor transkripsi dari gen yang berperan dalam proliferasi dan pluripotensi.¹⁸ Penambahan LIF efektif memelihara koloni ESC mencit tetap berproliferasi dan tidak berdiferensiasi dalam kondisi tanpa *feeder layer*, namun selain melalui jalur LIF/STAT3 sifat pluripotensi pada ESC mencit dipelihara juga oleh gen *octamer binding protein3/4* (Oct3/4), Nanog dan Sox2.¹⁸ Secara morfologi diferensiasi koloni ESC ditunjukkan

dengan adanya sel-sel fibroblas di sekeliling koloni, *cobblestone-cell like* atau *embryoid body* (EB).⁷

KESIMPULAN

Vitrifikasi ICM mengurangi tingkat perlekatan ICM namun tidak mempengaruhi perkembangan ICM menjadi koloni primer ESC dan tidak mempengaruhi diameter koloni primer ESC.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Prof. Arief Boediono, Ph. D, Dr. Thomas Mata Hine dari FKH IPB dan Dr. rer. nat. Asmarinah dari Biologi FK UI atas masukan dan nasehat selama melakukan penelitian. Teman-teman di laboratorium stem cell PBTDK Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbankes, Kementerian Kesehatan yang telah membantu berjalannya penelitian, saya ucapkan terimakasih.

DAFTAR RUJUKAN

1. Wobus AW and Loser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cell in toxicology research. Arch Toxicol 2011;85:79-117.
2. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G and Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cell by the open pulled straw vitrification method. Human Reproduction 2001; 16(10): 2187-94.
3. El-Danasaouri I and Selman H. Vitrification versus conventional cryopreservation technique. Middle East Fertility Soc Journal. 2005;10(3): 205-6.
4. Fujioka T, Yasuchika K, Nakamura Y, Nakatsuji N and Suemori H. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cell. Int J Dev Biol. 2004; 48:1149-54.
5. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaer V, Bollen N, van Rooseendaal E, et al. Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: application of assisted hatching after thawing. Hum Reprod. 2003;18(7):1504-11.
6. Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida N, Valdeez DM, Tanaka M, et al. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stage of five cryoprotectants. J Reprod Dev. 2005; 51:235-46.
7. Desai N, Xu J, Tsulata T, Lawson JS, Hafez AF, Goldfarb J, et al. Vitrification of mouse embryo-derived ICM cells: a tool for preserving embryonic stem cell potential? J. Assist. Reprod. Genet. 2010. DOI 10.1007/s10815-010-9500-x.
8. Matahine T, Supriatna I, Sajuthi D dan Boediono A. Produksi embryonic stem cells dari Inner cell Mass (ICM) blastosis yang diisolasi dengan metode enzimatik dan immunosurgery. Jurnal Veteriner. 2008;9(1):13-19.
9. Boediono A. Kriopreservasi Embrio. Surabaya. Konas II PERMI & Temu Ilmiah II FER, 3-5 Februari. 2005.
10. Tanaka N, Takeuchi T, Neri Q V, Sills ES and Palermo GD. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cell in a serum/cell free culture system: application and preliminary results in a murine model. Journal of Translational Medicine. 2006;4(20):1-16.
11. Terry C, Hughes RD, Mitry RR and Dhawan A. Cryopreservation- induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. Cell Transplant. 2007;16(6):639-47.
12. Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cell. Biotechnology and Bioengineering. 2004;88(3):299-312.
13. Ichikawa H, Nakata N, Abo Y, Shirasawa S, Yokoyama T, Yoshie Y, et al. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cell. Cryobiology. 2012; 64:12-22.
14. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. Transfusion. 2007;47:935-45.
15. Djuwantono T, Wirakusumah FF, Achmad TH, Sandra F, Halim D dan Faried Ahmad. Comparison of Cryopreservation Methods: Slow-Cooling Vs. Rapid-Cooling Based on Cell Viability, Oxidative Stress, Apoptosis, and CD34+ Enumeration of Human Umbilical Cord

- Blood Mononucleated Cells. BMC Research Notes. 2011; 4:371.
16. Yang L, Sheng LC, Li W, Ying L, XiaoNing MU, Yue MA, et al. Maintenance of human embryonic stem cell on gelatin. Chinese Sci. Bull. 2009; 54: 4214-20.
 17. Lane M, Maybach JM and Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Human Reproduction. 2002;17(10):2686–93.
 18. Trouillas1 M, Saucourt C, Guillotin B, Gauthereau X, Ding L, Buchholz F, et al. Three LIF dependent signatures and gene clusters with at ypical expression profiles identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. BMC Genomic.s 2009; 10: 73.