

Peran Endonuclease-G sebagai Biomarker Penentu Apoptosis Sel Amnion pada Kehamilan dengan Ketuban Pecah Dini

(The Role of Endonuclease-G for Amniotic Cell Apoptosis Biomarker Determination in Pregnancies with Premature Rupture of the Membrane)

Benedictus Triagung Ruddy Prabantoro*, Prajitno Prabowo**, Ni Made Mertaniasih**, Fedik Abdul Rantam***

ABSTRACT

The aim of this study was to identify whether there is an association between endonuclease-G and the apoptosis of amniotic cells in pregnancies with premature rupture of the membranes. Through research study on the amnion cell apoptosis mechanism in pregnancies with premature rupture of the membranes, it is possible to know whether endonuclease-G is the biomarker of amnion cells apoptosis involved. Methods: Analytic observational methods with cross-sectional study have been used in this study design. Sample tissues from the ruptured amniotic membrane of 41 pregnant women with premature rupture of the membranes were taken and processed to be analyzed further; TUNEL methods were used for obtaining the apoptosis index analysis of amnion tissue; Western-Blotting methods were used in both the analysis of endonuclease-G (30 kDa/full length) expression and also the analysis of caspase-3 (35 kDa/full length) expression. Data, consisting age of pregnancies, endonuclease-G, caspase-3 and apoptosis index were analyzed using the chi-square test. The results of the study showed that apoptosis was significantly associated with the high level detection of endonuclease-G ($p = 0.000$) but was not associated with caspase-3 significantly ($p = 0.316$). It was also found that the apoptosis in premature rupture of the membranes in pregnancy is not dependent to the age of pregnancies. Therefore, there is an indication that the occurrence of ptosis is dominant through the caspase-independent pathway (endonuclease-G).

Hence it can be concluded from the results of this study that high level detection of endonuclease-G is a biomarker of apoptosis of amnion cells in pregnancies with premature rupture of the membranes.

Key words: Endonuclease-G, Caspase-independent, PROM/PPROM

PENDAHULUAN

Perubahan patobiologis pada kejadian ketuban pecah dini (*Premature rupture of membrane/PROM*) sampai saat ini masih belum jelas. Beberapa penelitian patogenesis PROM yang telah dilaporkan antara lain menjelaskan proses biokimia, termasuk *extracellular matrix remodeling* lewat perubahan enzimatik (*tissue inhibitor matrix metalloproteinase/TIMP* dan *membrane matrix metalloproteinase /MMP*) pada jaringan selaput ketuban (Gravett et al., 1994; Gomez et al., 1997; Romero et al., 1998; Romero et al., 2002; Xu et al., 2002; Fortunato et al., 2002); dan ada yang melaporkan proses *cell death* (*apoptosis*) pada sel jaringan selaput ketuban melalui

mekanisme aktivasi jalur caspase (Tilly et al., 1991; Otsuki et al., 1994; Paavola et al., 1995; Parry and Strauss, 1998; McLaren et al., 1999; Levy and Nelson, 2000); namun ada pula dugaan bahwa apoptosis yang terjadi tanpa melalui jalur caspase (Menon et al., 2000); dengan demikian apoptosis pada kejadian ketuban pecah dini hingga kini masih belum jelas.

Dari seluruh kehamilan, 5–10% mengalami ketuban pecah dini. Pada persalinan kurang bulan, sepertiga diantaranya mengalami ketuban pecah dini; sedangkan dari kasus ketuban pecah dini, 60% di antaranya terjadi pada kehamilan cukup bulan. Pada kehamilan dengan ketuban pecah dini, sebagian besar kasus ditemukan mulut

* RSK St. Vincentius a Paulo (RKZ Surabaya)

** Fakultas Universitas Airlangga

*** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

rahim yang belum matang, 30–40% mengalami gagal induksi sehingga diperlukan tindakan operasi, sedangkan sebagian lain mengalami hambatan kemajuan persalinan dengan peningkatan resiko infeksi pada ibu dan janin (**Cunningham**, 2001; **Carson de Witt**, 1999). Kejadian *amnionitis* dilaporkan 15–23% pada penderita hamil dengan ketuban pecah dini (**Carson de Witt**, 1999). Komplikasi pada janin akibat kasus ketuban pecah dini tergantung usia kehamilan dan kejadian selama proses persalinan. Komplikasi ketuban pecah dini dapat mengakibatkan infeksi perinatal, kompresi tali pusat, solusio plasenta, serta adanya sindrom *distress* pada napas bayi baru lahir. Akibat lain yang terjadi adalah *enterocolitis necrotizing*, perdarahan intraventrikular, sepsis neonatorum terjadi pada 2–20% dari kasus ketuban pecah dini, serta dapat terjadi kematian sekitar 5% kasus, sedangkan komplikasi jangka panjang dapat memberikan kecacatan (**Miller et al.**, 1990; **Parry and Strauss**, 1998).

Kehamilan normal dengan umur kehamilan 37–42 minggu, dikenal sebagai hamil cukup bulan. Pada hamil cukup bulan, proses persalinan yang terjadi diawali dengan kontraksi otot uterus yang berulang kemudian diikuti dengan penipisan serviks dan keluar cairan lalu diikuti dengan fase dilatasi sebagai persiapan persalinan. Pada fase kritis awal proses persalinan seringkali terjadi selaput ketuban mengalami perobekan (*rupture*) terlebih dahulu sebelum adanya tanda persalinan (*before start of labor*), keseluruhan proses ini dikenal sebagai ketuban pecah dini atau *premature rupture of the membrane (PROM)*. Pada kehamilan cukup bulan, kejadian PROM berkisar 10% (**Carson de Witt**, 1999). Pada kehamilan kurang bulan (*preterm*), yaitu dibawah 37 minggu, dikenal sebagai *Preterm with premature rupture of the membrane (PPROM)* Kejadian PPRM dilaporkan 20% di antara kehamilan preterm (**Carson de Witt**, 1999; **Parry and Strauss**, 1998). Penyebab kasus ketuban pecah dini, PPRM atau PROM hingga kini masih belum jelas. Salah satu faktor resiko yang dapat menyebabkan PROM dan PPRM adalah infeksi bakteri pada traktus genitalis (**Cunningham**, 2001). Salah satu bakteri yang potensial yaitu: *Chlamydia trachomatis*, di mana infeksi bakteri ini pada kehamilan dapat memicu terjadinya abortus spontan, PPRM, PROM dan berat badan lahir rendah (**Korn**, 2000). Angka prevalensi *C. trachomatis* pada kehamilan bervariasi antara 2–35% (**Savoia**, 2004). Pada pemeriksaan prenatal ibu hamil di USA pada 28 negara bagian tahun 2002 didapatkan angka kejadian 10,1% (**Cunningham et al.**, 2005), di Indonesia tahun 1996 didapatkan angka 8,2% dari ibu hamil tanpa

bacterial vaginosis dan 19,5% dengan bacterial vaginosis, (**Joeseof dkk**, 1996).

Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel yang terprogram, melibatkan peran famili enzim protease spesifik yang mengandung sistein dan dikenal sebagai famili caspase (**Kumagai et al.**, 2001), tetapi pada penyakit degeneratif sel saraf dilaporkan adanya apoptosis tanpa melalui aktivitas caspase (**Kumagai et al.**, 2001). Pada keadaan sel yang mengalami infeksi atau stres, biasanya jalur apoptosis klasik atau *caspase dependent pathway* tidak berjalan, oleh karena itu diduga mekanisme apoptosis yang terjadi melalui jalur lain yang disebut *caspase independent pathway* dengan melibatkan anggota famili proapoptosis Bcl-2 yaitu bax (**Numazaki et al.**, 2003; **Burdon et al.**, 2006). Penelitian tentang apoptosis pada sel yang terinfeksi *Chlamydia* serta peranan dari Bax yang utama, antara lain pergerakan Bax dari sitosol menuju mitochondria (**Wolter et al.**, 1997); Apoptosis pada sel epitel dan makrofag (**Ojcius et al.**, 1998); target Bax di mitokondria (**Goping et al.**, 1998); dan peranan famili Bcl-2 pada apoptosis jalur *caspase-independent* karena infeksi *Chlamydia* (**Perfettini et al.**, 2002), menunjukkan adanya peranan protein Bcl-2 di mitokondria yang menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA. Pada kasus PPRM dan PROM dilaporkan terjadinya proses apoptosis yang dipercepat terutama di daerah robekan selaput ketuban pada PPRM dan PROM (**Menon et al.**, 2000). Pada temuan yang telah dilaporkan dapat dinyatakan mekanisme apoptosis pada kejadian ketuban pecah dini tanpa melalui aktivasi caspase masih belum jelas.

Perhatian pada angka kejadian ketuban pecah dini yang tinggi dan biaya yang dibutuhkan untuk perawatan serta morbiditas serta mortalitas neonatal dan perinatal, mendorong penelitian yang bertujuan mempelajari mekanisme terjadinya ketuban pecah dini. Pada laporan **Guimaraes and Linden**, 2004; **Kogel and Prehn**, 2002 dibuktikan bahwa proses apoptosis dapat melalui jalur aktivasi *caspase-dependent* dan *caspase-independent*. Jalur caspase atau jalur klasik, melalui induksi apoptosis dengan terjadinya orkestra serangkaian reaksi yang melibatkan beberapa senyawa caspase dengan eksekutor utama adalah caspase-3, sehingga parameter untuk proses apoptosis jalur *dependent* adalah caspase-3. Sedangkan apoptosis jalur *independent* lewat peningkatan ekspresi protein bax berlanjut dikeluarkan beberapa faktor reaksi enzimatis antara lain AIF/Apoptotic inducing factor, EndoG/Endonuclease-G dan L-Dnase I/Leucocyte Elastase Inhibitor-Dnase II, di mana faktor ini dapat menginduksi apoptosis melalui terjadinya fragmentasi DNA. Keadaan ini menimbulkan

peningkatan ekspresi protein p-53 dengan akibat terjadi peningkatan induksi MMPs, sehingga sintesis matriks selaput ketuban menurun dan mengalami kerapuhan, menyebabkan terjadinya ketuban pecah dini (**Fortunato et al.**, 2000). Parameter yang digunakan untuk mengetahui terjadinya peningkatan apoptosis melalui jalur *caspase-independent* adalah peningkatan endonuclease-G, hal ini disebabkan faktor peningkatan endonuclease-G ini muncul paling awal dan dominan sebagai bentuk respons adanya apoptosis melalui *caspase-independent* (**Zhang et al.**, 2003).

Konsep ilmiah yang diajukan adalah PPRM dan PROM disebabkan terutama oleh infeksi pada traktus genitalis, dapat berupa infeksi bakteri (ekstraselular) atau bakteri obligat intraselular. Infeksi traktus genitalis dapat menyebabkan terjadinya apoptosis sel amnion pada selaput ketuban, di mana infeksi bakteri (ekstraselular) melalui jalur *caspase dependent* dan infeksi bakteri obligat intraselular melalui jalur *caspase independent*, jalur *dependent* dengan parameter caspase-3 dan jalur *independent* dengan parameter endonuclease-G.

Faktor infeksi intraseluler terutama merupakan pencetus percepatan mekanisme apoptosis melalui jalur *caspase-independent* dengan parameter utama endonuclease-G, dengan tingginya kasus infeksi intraseluler asimtomatis diantara ibu hamil atau wanita usia reproduksi, dirumuskan permasalahan apakah endonuclease-G dapat berperan sebagai biomarker penentu pada apoptosis sel amnion untuk prediksi PROM atau PPRM pada ibu hamil.

Tujuan penelitian ini adalah: (1) Membuktikan adanya hubungan antara tingkat deteksi *endonuclease-G (independent pathway)* dengan kejadian apoptosis (indeks apoptosis) pada kehamilan dengan ketuban pecah dini; (2) Membuktikan adanya hubungan antara tingkat deteksi *endonuclease-G* dengan umur kehamilan ketuban pecah dini (PROM/PPROM); (3) Membuktikan adanya hubungan antara tingkat deteksi caspase-3 (*dependent pathway*) dengan kejadian apoptosis (indeks apoptosis) pada kehamilan dengan ketuban pecah dini; (4) Membuktikan adanya hubungan antara tingkat deteksi caspase-3 dengan umur kehamilan ketuban pecah dini (PROM/PPROM).

MATERI DAN METODE

Populasi berasal dari ibu hamil dengan ketuban pecah dini dengan umur kehamilan kurang dari 37 minggu (PPROM) dan kehamilan cukup bulan/lebih dari 37 minggu (PROM) yang datang di Kamar Bersalin BKIA RSK St Vincentius A Paulo Surabaya.

Sampel adalah jaringan amnion yang diambil dari selaput ketuban pada sisi robekan dari ibu bersalin dengan ketuban pecah dini. Pemilihan sampel dilakukan secara: *Consecutive sampling*, dimana sampel diambil dari ibu hamil yang datang di Kamar Bersalin BKIA RSK St Vincentius A Paulo Surabaya dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan dalam penelitian serta bersedia sebagai sampel penelitian dan menanda-tangani informed consent; sampai jumlah sampel yang diperlukan terpenuhi.

Koleksi sampel penderita ibu hamil dengan ketuban pecah dini dengan umur kehamilan kurang dari 37 minggu (PPROM) dan lebih dari 37 minggu (PROM) berasal dari Kamar Bersalin RSK St Vincentius a Paulo Surabaya. Jaringan amnion diambil dari bagian robekan pada selaput ketuban. Jaringan tersebut dimasukan dalam media transport *Phosphate Buffer Saline* (PBS) steril dan dibawa ke Lembaga Penyakit Tropis Unair.

Tahapan penelitian meliputi: (a) Preparasi supernatan homogenat sel / jaringan amnion. Sebagian jaringan amnion hasil koleksi digerus, lalu ditambahkan PBS dengan volume 10 ml, kemudian dilakukan sonikasi (homogenizer) selama 4 × 15 menit, kemudian disentrifus 10.000 rpm selama 15 menit, lalu supernatan diambil untuk kepentingan analisis *endonuclease-G* dan caspase-3; (b) Deteksi dan identifikasi indeks Apoptosis secara histopatologis dengan metode TUNEL; (c) Deteksi ekspresi *endonuclease-G* dengan metode Western Blotting; (d) Deteksi ekspresi caspase-3 dengan metode Western Blotting.

Data yang diperoleh meliputi umur kehamilan, tingkat deteksi *endonuclease-G*, *caspase-3* dan indeks apoptosis (histopatologis dari jaringan amnion). Analisis hubungan antara variabel tersebut menggunakan uji *chi-square* (data nonparametrik) dan uji T (data parametrik) (**Steel dan Torrie**, 1980).

HASIL DAN DISKUSI

Menurut **Creasy** yang dikutip oleh **Abadi** (1999) menyebutkan bahwa secara garis besar persalinan kurang bulan dapat dibagi menjadi dua kelompok yakni pertama kelompok persalinan kurang bulan yang terjadi secara spontan dan seringkali disertai dengan pecah ketuban sebelum waktunya. Kelompok ini meliputi 79–80% dari semua kejadian persalinan kurang bulan. Adapun kelompok kedua merupakan kelompok persalinan kurang bulan yang disertai dengan kelainan pada alat reproduksi misalnya kelainan bentuk rahim, tumor dan kelainan yang merupakan penyulit kehamilan yakni perdarahan pada kehamilan,

hidroamnion, kehamilan ganda atau penyakit ibu yang menyertai kehamilan seperti hipertensi dalam kehamilan, diabetes melitus dengan kehamilan yang sering kali harus dilakukan pengakhiran kehamilan sebelum waktunya oleh karena bahaya yang mengancam bayi, ibu atau keduanya.

Berdasarkan data ibu hamil yang masuk Kamar Bersalin RS – St Vincentius a Paulo Surabaya selama periode pengumpulan sampel yaitu 4 bulan dengan distribusi menurut umur kehamilan dan cara persalinan (lihat Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah persalinan, umur kehamilan dan cara persalinan selama bulan September sampai dengan Desember 2006

Bulan	Jumlah Per-salinan	Umur Kehamilan		Cara Persalinan		
		Aterm	Preterm	Sectio caesarea	Ekstraksi vaccum	Spontan
September	137	129	8	9	2	126
Oktober	160	146	14	16	4	140
Nopember	160	142	18	12	3	145
Desember	130	120	10	9	2	119
TOTAL	587	537	50	46	11	530

Sampel penelitian diambil dari kamar bersalin BKIA – RSK St Vincentius a Paulo Surabaya selama bulan September 2006 sampai dengan Desember 2006, di mana total jumlah persalinan adalah 587 kasus dengan 537 persalinan (91,48%) dengan kehamilan cukup bulan atau *aterm* dan 50 persalinan (8,52%) dengan kehamilan kurang bulan atau *preterm*. Dari cara persalinan didapatkan 46 persalinan dengan *sectioesarea*, 11 persalinan dengan ekstraksi vakum dan 530 persalinan secara spontan. Secara persentase jumlah operasi *sectioesarea* di BKIA – RSK St Vincentius a Paulo Surabaya: 8,68%, lebih sedikit dari angka *Sectioesarea* di Indonesia: 20–25% (2008), USA (2006): 23,6%, hal ini karena Kasus-kasus yang ditangani di Kamar Bersalin BKIA – RSK St Vincentius a Paulo umumnya merupakan kasus-kasus yang melakukan perawatan antenatal kehamilan di Poli BKIA sendiri, sangat sedikit yang merupakan kasus rujukan dari bidan luar.

Sampel jaringan amnion diambil dari selaput ketuban ibu hamil dengan ketuban pecah dini yang bersalin di Kamar Bersalin BKIA – RSK St Vincentius a Paulo Surabaya mulai bulan September 2006, jumlah sampel diambil sampai terpenuhinya jumlah sampel (*Consecutive sampling*), sehingga pengumpulan sampel sampai bulan Desember 2006. Didapatkan jumlah total: 587 persalinan, dengan persentase PROM: 30/587 (5,1%) dan PPRM: 11/587

Tabel 2. Jumlah kasus kehamilan ketuban pecah dini dan variabel yang terkait selama bulan September sampai dengan Desember 2006

Varibel		PROM	PPROM
Jumlah Kasus		30	11
Proses Inpartu	Induksi	24	10
	Inpartu	6	1
	Spontan		
Cara Persalinan	Spontan	29	11
	Sectioesarea	1	0
Lama keluar air ketuban	< 12 jam	9	2
	> 12 jam	21	9
Status kehamilan	Primigravida	23	3
	Multigravida	7	8

(1,8%). Dari 41 ibu hamil dengan ketuban pecah dini mulai bulan September sampai bulan Desember 2006, didapatkan beberapa variabel seperti tabel 2. Dari 587 persalinan yang terjadi di BKIA RSK St Vincentius a Paulo Surabaya selama bulan September sampai dengan Desember 2006, 30 kasus kehamilan dengan PROM dan 11 kasus kehamilan dengan PPRM. Dilihat dari cara persalinan dan proses inpartu yang dikaitkan dengan kehamilan ketuban pecah dini (PROM atau cukup bulan) hanya satu persalinan dengan operasi *sectioesarea*, 29 persalinan spontan, enam kasus inpartu spontan, 24 kasus dilakukan induksi. Adapun bila dikaitkan dengan ketuban pecah dini (PPROM atau kurang bulan) didapatkan 10 induksi persalinan, satu inpartu spontan, 11 persalinan spontan dan tidak ada yang dilakukan *sectioesarea*. Dilihat dari lama keluar air ketuban dikaitkan dengan PROM, sembilan kasus kurang dari 12 jam dan 21 kasus lebih dari 12 jam, bila dikaitkan dengan PPRM terlihat dua kasus kurang dari 12 jam dan sembilan kasus lebih dari 12 jam. Dilihat dari status kehamilan dikaitkan dengan PROM, 23 kasus pada primigravida dan tujuh kasus multigravida, sedang dikaitkan dengan PPRM didapatkan tiga kasus primigravida dan delapan kasus multigravida.

Pada tabel 3 terlihat bahwa berdasarkan uji *Fisher's Exact test* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang sangat bermakna antara *endonuclease-G* dengan kejadian apoptosis pada sampel kehamilan dengan ketuban pecah dini ($p < 0,01$). Hal ini disebabkan *endonuclease-G* positif hanya ditemukan pada apoptosis sel amnion yang positif (68,29%) sedangkan pada apoptosis sel amnion yang negatif tidak ditemukan ekspresi *endonuclease-G* (0%). Adapun pada *endonuclease-G* negatif akan tetapi ditemukan apoptosis sel amnion yang positif (17,07%) dan apoptosis sel amnion yang negatif (14,63%). Adapun pada tabel 4 terlihat bahwa

berdasarkan T-tes menunjukkan bahwa ada perbedaan yang sangat bermakna antara *endonuclease-G* dan indeks apoptosis pada sampel kehamilan dengan ketuban pecah dini ($p \leq 0,01$). Hal ini disebabkan nilai indeks apoptosis sel amnion pada *endonuclease-G* positif ($0,16 \pm 0,05$) lebih tinggi secara bermakna terhadap indeks apoptosis sel amnion pada *endonuclease-G* negatif ($0,10 \pm 0,04$).

Tabel 3. Hubungan *endonuclease-G* dengan kejadian apoptosis

Jenis Marker	Apoptosis		
	Negatif (-)	Positif (+)	Total
Endonuclease-G (-)	7 (17,07)	6 (14,63%)	13 (31,71%)
Endonuclease-G (+)	0 (0,0%)	28 (68,29%)	28 (68,29%)
Total	7 (17,07%)	34 (82,93%)	41 (100%)

Fisher's Exact test; $p = 0,000$; $p < 0,01$

Tabel 4. Hubungan *endonuclease-G* dengan indeks apoptosis

Jenis Marker	Indeks Apoptosis
Endonuclease-G negatif (-)	0,10a $\pm$ 0,04
Endonuclease-G positif (+)	0,16b $\pm$ 0,05

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata dengan $p \leq 0,01$ (T-test).

Parameter yang digunakan untuk mengetahui terjadinya peningkatan apoptosis melalui jalur *caspase-independent* adalah *endonuclease-G*, hal ini disebabkan faktor *endonuclease-G* ini muncul paling awal dan dominan sebagai bentuk respons adanya apoptosis melalui *caspase-independent* (Zhang et al., 2003).

Tabel 3 dan tabel 4 memperlihatkan bahwa apoptosis yang terjadi pada ketuban pecah dini berhubungan secara bermakna dengan tingkat deteksi *endonuclease-G*. Hal ini sesuai dengan Menon et al (2000) yang mengatakan bahwa adanya jalur *caspase-independent* yang terlibat di dalam apoptosis terutama pada kasus kehamilan dengan ketuban pecah dini. Bahkan Van Loo et al (2001) telah membuktikan bahwa meskipun apoptosis merupakan suatu proses fragmentasi DNA inti yang terkait dengan *caspase-3-dependent-DNase* (CAD/*caspase activated DNase*), ternyata fragmentasi DNA inti juga dapat terjadi secara terpisah tidak terkait dengan CAD yaitu melalui pelepasan *endonuclease-G* dari mitokondria. Di mana dengan *western blotting* menunjukkan protein *endonuclease-G* memiliki berat molekul 30 kDa. (Widlak et al., 2001), dengan pengenceran 1/500 (0,5–4 $\mu\text{g/ml}$).

Adapun jalur non caspase, umumnya terjadi pada keadaan tertentu misalnya keadaan patologi dimana terjadi hambatan pengeluaran senyawa caspase, dimana pada keadaan ini akan terjadi peningkatan *Bax* yaitu protein dari anggota famili Bcl-2 serta dihasilkan senyawa lain yang dapat menginduksi apoptosis seperti *apoptotic inducing factor (AIF)*, *endonuclease-G (Endo-G)* dan *Leucocyte elastase inhibitor (LEI)-Dnase II (L-Dnase II)* (Guimaraes and Linden, 2004; Kogel and Prehn, 2002).

Mekanisme kerja dari *endonuclease-G* memperlihatkan bahwa pada saat aktivasi apoptosis, *endonuclease-G* dilepas dari ruang intermembran mitokondria menuju inti sel untuk menginduksi fragmentasi DNA (Li et al., 2001). Di mana *endonuclease-G* akan membelah kromosomal DNA pada jalur *caspase-independent* (Li et al., 2001). Studi genetik menunjukkan bahwa mutasi *endonuclease-G* pada *C. elegans* menghasilkan penurunan degradasi DNA dan penghambatan proses apoptosis in vivo (Li et al., 2001). Dari hasil studi biokimiawi dan genetik tersebut menunjukkan bahwa *endonuclease-G* terlibat dalam fragmentasi DNA melalui jalur mitokondria, karena *endonuclease-G* terletak didalam mitokondria sehingga bila terjadi kerusakan mitokondria akan menyebabkan *endonuclease-G* keluar ke arah nukleus, terjadilah fragmentasi DNA dan proses apoptosis.

Pada tabel 5 terlihat bahwa berdasarkan uji Fisher's Exact test menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara *endonuclease-G* dengan umur kehamilan pada ketuban pecah dini pada kehamilan pada sampel kehamilan dengan ketuban pecah dini ($p > 0,05$). Hal ini disebabkan *endonuclease-G* positif ditemukan baik pada PROM (43,90%) maupun PPRM (24,39%) demikian pula meskipun pada *endonuclease-G* negatif akan tetapi ditemukan baik pada PROM (29,2%) dan PPRM (2,44%).

Tabel 5. Hubungan *endonuclease-G* dengan umur kehamilan ketuban pecah dini

Jenis Marker	Umur kehamilan ketuban pecah dini		
	PROM	PPROM	Total
Endonuclease-G (-)	12 (29,27%)	1 (2,44%)	13 (31,71%)
Endonuclease-G (+)	18 (43,90%)	10 (24,39%)	28 (68,29%)
Total	30 (73,17%)	11 (26,83%)	41 (100%)

Fisher's Exact test; $p = 0,127$; $p > 0,05$

Patobiologi dari kehamilan dengan ketuban pecah dini masih belum banyak diketahui. Banyak faktor dan jalur yang dapat menyebabkan degradasi dari matriks selaput

membran ekstrasellular antara lain: 1) jumlah kolagen diselaput membran ekstrasellular; 2) keseimbangan antara degradasi dan aktifitas perbaikan dari komponen matriks; 3) Enzim spesifik yang berfungsi sebagai pengendali dan pengatur aktifitas biofisik matriks membran ekstrasellular; 4) Infeksi terkait dengan keseimbangan enzim yang dihasilkan pada selaput membran ekstrasellular. 5) Aktivitas adanya peningkatan apoptosis pada daerah robekan selaput amnion (**Menon et al.**, 2000).

Penelitian lain melaporkan pada keadaan sel mengalami infeksi atau stres, biasanya apoptosis jalur *caspase-dependent* tidak berjalan. Sehingga timbul dugaan adanya apoptosis dipercepat pada kehamilan dengan ketuban pecah dini tanpa melalui jalur caspase, diduga jalur lain yang disebut dengan jalur *caspase independent* melibatkan anggota famili proapoptosis yaitu Bcl-2 yaitu bax (**Numazaki et al.**, 2003).

Pada penelitian ini menggunakan sampel selaput ketuban dari kehamilan ketuban pecah dini baik kehamilan cukup bulan (*term*) dan kurang bulan (*preterm*). Dari tabel 5 memperlihatkan bahwa endonuclease-G tidak berhubungan dengan umur kehamilan pada kehamilan dengan ketuban pecah dini (PROM/PPROM), ini menunjukkan bahwa apoptosis melalui jalur *caspase independent* (*endonuclease-G*) dapat terjadi pada kehamilan ketuban pecah dini pada umur kehamilan kapanpun tergantung dari faktor penyebab (**Parry and Strauss**, 1998).

Pada *tabel 6* terlihat bahwa berdasarkan uji *Fisher's Exact test* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara caspase-3 dengan kejadian apoptosis pada sampel kehamilan dengan ketuban pecah dini ($p > 0,05$). Hal ini disebabkan caspase-3 positif ditemukan baik pada apoptosis sel amnion yang positif (80,49%) maupun apoptosis sel amnion yang negatif (14,63%) demikian pula meskipun pada caspase-3 negatif akan tetapi ditemukan apoptosis sel amnion yang positif (2,44%) dan apoptosis sel amnion yang negatif (2,44%). Pada *tabel 7* terlihat bahwa berdasarkan T-tes menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara caspase-3 dan indeks apoptosis pada sampel kehamilan dengan ketuban pecah dini ($p > 0,05$). Hal ini disebabkan antara nilai indeks apoptosis sel amnion pada caspase-3 positif ($0,14 \pm 0,05$) dan indeks apoptosis sel amnion pada caspase-3 negatif ($0,11 \pm 0,04$) secara statistik adalah sama.

Tabel 6. Hubungan caspase-3 dengan kejadian apoptosis

Jenis Marker	Apoptosis		
	Negatif (-)	Positif (+)	Total
Caspase-3 (-)	1 (2,44%)	1 (2,44%)	2 (4,88%)
Caspase-3 (+)	6 (14,63%)	33 (80,49%)	39 (95,12%)
Total	7 (17,07%)	34 (82,93%)	41 (100%)

Fisher's Exact tes; $p = 0,316$; $p > 0,05$

Tabel 7. Hubungan caspase-3 dengan indeks apoptosis

Jenis Marker	Indeks Apoptosis
Caspase-3 negatif (-)	$0,11^a \pm 0,04$
Caspase-3 positif (+)	$0,14^a \pm 0,05$

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata dengan $p \geq 0,05$ (T-test).

Menurut **Kim et al** (2001) bahwa plasenta pada manusia merupakan organ penting untuk pemeliharaan kehamilan, baik berkaitan dengan hubungan fungsional maupun mekanik antara ibu dan janin. Dari awal kehamilan, plasenta itu sendiri tumbuh dan matang sampai akhir kehamilan. Seperti selama kehamilan berlangsung, vili dan lapisan dari plasenta menunjukkan bukti terjadi pematangan dan diferensiasi trophoblasts, dan menurun secara bertahap setelah 34–36 minggu kehamilan. Menimbang bahwa kematian sel terprogram atau apoptosis merupakan salah satu proses penting selama perkembangan janin, maka proses apoptosis diduga juga memegang peranan penting terhadap proses pematangan dan perkembangan dari plasenta termasuk terkait dengan proses penuaan dari plasenta dan penyebab kompleksitas kasus kehamilan lain. (**Straszewski-Chavez et al.**, 2005).

Berbagai jenis zat penting, termasuk beberapa jenis produk onkogen yang diketahui memiliki fungsi fisiologis dalam plasenta (**Kim et al.**, 2001). Antara lain, Bcl-2 merupakan suatu protoonkogen pada kromosom 18 yang mampu memperpanjang kelangsungan hidup jenis sel tertentu melalui penghambatan kematian sel terprogram (apoptosis) yang diikuti oleh **Kim et al** (2001) menggambarkan bahwa ekspresi Bcl-2 kuat dalam trophoblasts plasenta dan menduga bahwa Bcl-2 dapat bertindak sebagai perantara terhadap mekanisme umpan balik endokrin serta memainkan peranan dalam mempertahankan

jaringan janin dari kematian yang disebabkan oleh sistem kekebalan tubuh ibu. Baru-baru ini telah dilaporkan bahwa pada kehamilan manusia baik yang normal dan abnormal dapat mengalami apoptosis. **Thief et al** yang dikutip oleh **Kim et al** (2001) melaporkan *DNA ladder* pada plasenta, demikian juga **Smith et al** yang dikutip oleh **Kim et al** (2001), telah mampu mengidentifikasi sel-sel apoptosis dalam plasenta manusia dengan metode TUNEL. Adapun **Lea et al** yang dikutip oleh **Kim et al** (2001) menjelaskan lebih baik menggunakan *bcl-2 immunostaining* di *syncytiotrophoblast* pada kehamilan normal dibandingkan pada aborsi yang berulang atau sporadis.

Menurut (**Guimaraes and Linden, 2004; Kogel and Prehn, 2002**) bahwa proses apoptosis dapat melalui jalur aktivasi *caspase-dependent* dan *caspase-independent*. Jalur caspase atau jalur klasik, melalui induksi apoptosis dengan terjadinya orkestra yang melibatkan beberapa senyawa caspase dengan eksekutor utama adalah caspase-3. Bahkan **Mu et al** (2003) telah menunjukkan terjadinya apoptosis pada plasenta dikaitkan dengan peningkatan ekspresi protein caspase-3, di mana dengan metode *western blotting* menunjukkan berat molekul 17-20 kDa sedangkan untuk apoptosis digunakan metode TUNEL. Adapun pada jalur non caspase maka proses apoptosis melalui jalur pengaktifan *apoptotic inducing factor (AIF)*, *endonuclease-G (Endo-G)* dan *Leucocyte elastase inhibitor (LEI)-Dnase II (L-Dnase II)*. Walaupun demikian pada beberapa kasus tertentu seperti infeksi *C. trachomatis* maka jalur *caspase-independent* lebih dominan dibandingkan dengan jalur *caspase-dependent* sedangkan pada keadaan fisiologis maka jalur *caspase-dependent* merupakan jalur yang utama terjadinya apoptosis (**Numazaki et al., 2003**).

Data penelitian (lihat *tabel 6* dan *tabel 7*) ternyata memperlihatkan bahwa apoptosis yang terjadi pada ketuban pecah dini tidak berhubungan bermakna dengan caspase-3 ($p \geq 0,05$). Hal ini menunjukkan kehamilan dengan ketuban pecah dini merupakan suatu keadaan yang patologis dan bukan fisiologis, keadaan patologis yang dapat menyebabkan terjadinya ketuban pecah dini seperti infeksi bakteri traktus genitalis, infeksi ini dipercaya merupakan penyebab utama kejadian ketuban pecah dini. (**Carson de Witt, 1999; Cunningham et al., 2005**). Beberapa organisme yang umum terdapat sebagai flora vagina seperti kelompok *B-streptococci*, *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis* serta beberapa mikroorganisme lain yang mengakibatkan vaginosis, akan melepaskan enzim protease yang dapat mendegradasi *collagen* sehingga selaput ketuban menjadi rapuh. Secara in vitro, proses proteolisis dari

matriks selaput ketuban dapat dihambat dengan pemberian antibiotika (**Parry and Strauss, 1998**).

Pencegahan dapat dilakukan dengan mengawasi dan menghindari faktor-faktor yang dapat menimbulkan kasus PROM, antara lain merokok atau infeksi dan memberikan antibiotika profilaksis pada kasus dengan resiko tinggi. (**Carson de Witt, 1999; Kenyon et al., 2001; Rastogi et al., 2003**).

Pada *tabel 8* terlihat bahwa berdasarkan uji *Fisher's Exact test* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara caspase-3 dengan umur kehamilan pada ketuban pecah dini pada sampel kehamilan dengan ketuban pecah dini ($p > 0,05$). Hal ini disebabkan caspase-3 positif ditemukan baik pada PROM (68,29%) maupun PPRM (26,83%) demikian pula meskipun pada caspase-3 negatif akan tetapi ditemukan PROM (4,88%) sedangkan PPRM (0%).

Penelitian yang telah ada menunjukkan bahwa salah satu penyebab kehamilan dengan ketuban pecah dini adalah terjadinya proses apoptosis dipercepat pada daerah robekan selaput ketuban, di mana proses apoptosis yang terjadi melalui mekanisme aktivasi jalur caspase dengan eksekutor caspase-3 (**Parry and Strauss, 1998; McLaren et al., 1999; Levy and Nelson, 2000**).

Dari *tabel 8* memperlihatkan bahwa caspase-3 tidak berhubungan dengan umur kehamilan pada kehamilan dengan ketuban pecah dini (tidak tergantung dari umur kehamilan, PROM/PPROM), ini menunjukkan bahwa apoptosis melalui jalur *caspase dependent (caspase-3)* dapat terjadi pada kehamilan ketuban pecah dini pada umur kehamilan kapanpun tergantung dari faktor penyebab (**Parry and Strauss, 1998**).

Tabel 8. Hubungan caspase-3 dengan umur kehamilan ketuban pecah dini

Jenis Marker	Umur Kehamilan Ketuban Pecah Dini		
	PROM	PPROM	Total
Caspase-3 (-)	2 (4,88%)	0 (0%)	2 (4,88%)
Caspase-3 (+)	28 (68,29%)	11 (26,83%)	39 (95,12%)
Total	30 (73,17%)	11 (26,83%)	41 (100%)

Fisher's Exact test; $p = 1,000$; $p > 0,05$

Selaput ketuban memegang peranan penting untuk mempertahankan kehamilan, adanya gangguan pada keseimbangan antara kematian sel dan sel yang bertahan hidup akan menimbulkan gangguan pada fungsi dari selaput ketuban, dan adanya infeksi dan peradangan menyebabkan gangguan keseimbangan ini (**Murtha et al., 2002**). Penyebab

terbanyak terjadinya ketuban pecah dini pada kehamilan baik PROM maupun PPRM adalah infeksi traktus genitalis, dapat berupa infeksi bakteri atau virus (**Cunningham**, 2001). Adanya infeksi akan meningkatkan apoptosis sel amnion pada selaput ketuban sehingga terjadi peningkatan ekspresi dari protein bax dan protein p-53 (pro apoptosis) dan penurunan ekspresi dari protein bcl-2 (antiapoptosis), yang menyebabkan induksi MMPs sehingga sintesis matriks selaput ketuban menurun dan terjadi penurunan elastisitas selaput ketuban, di mana hal ini menyebabkan kerusakan selaput ketuban dan terjadilah ketuban pecah dini (**Fortunato et al.**, 2001).

Proses apoptosis dipercepat pada terjadinya robekan selaput ketuban pada kehamilan dengan ketuban pecah dini baik melalui jalur *caspase-dependent* dan *caspase-independent*, dapat dilihat untuk jalur *caspase-dependent* dengan memeriksa eksekutor utama apoptosis yaitu caspase-3 dan jalur *caspase independent* dengan parameter *endonuclease-G*, hal ini disebabkan faktor *endonuclease-G* ini muncul paling awal dan dominan sebagai bentuk respons adanya apoptosis melalui *caspase-independent* (**Zhang et al.**, 2003). Penelitian ini mencoba mengungkap patogenesis ketuban pecah dini dengan memeriksa parameter *endonuclease-G* dan caspase-3.

Terdapat laporan pada sel yang terinfeksi *Chlamydia* mampu menghambat proses apoptosis di mana terjadi penghambatan pada aktivitas jalur *caspase-3* dan *mitochondrial cytochrome c*. Tujuan dari penghambatan ini untuk memungkinkan *Chlamydia* sebagai obligat intraseluler dapat berkembang (**Fan et al.**, 1998). Mekanisme yang diduga dapat menghambat proses apoptosis jalur caspase pada infeksi *Chlamydia* antara lain: (a) *Chlamydia* mampu menghambat faktor proapoptosis yang menuju mitokondria; (b) *Chlamydia* mampu meningkatkan *Bcl-2* pada mitokondria yang mampu menghambat pengeluaran *cytochrome* dan aktivasi caspase-3; (c) *Chlamydia* mampu menghasilkan beberapa faktor antiapoptosis yang memungkinkan *Chlamydia* berkembang tetapi tidak mempengaruhi sintesis protein dari sel *host* (**Fan et al.**, 1998; **Fischer et al.**, 2000). Penghambatan apoptosis ini terjadi pada fase *Reticulate Body* (RB) dari infeksi *Chlamydia*, sedangkan pada fase *Elementary Body* (EB) akan terjadi kerusakan mitokondria dan terjadi apoptosis melalui jalur *endonuclease-G* (**Fan et al.**, 1998).

Dari data penelitian (lihat tabel 3 dan 4) ternyata memperlihatkan bahwa apoptosis yang terjadi pada ketuban pecah dini berhubungan secara bermakna dengan ekspresi *endonuclease-G* tapi tidak berhubungan bermakna dengan caspase-3 ($p \geq 0,05$) (lihat tabel 6 dan 7). Oleh karena itu

dari penelitian ini didapatkan bahwa *endonuclease-G* dapat digunakan sebagai biomarker penentu terjadinya proses apoptosis dipercepat pada kehamilan dengan ketuban pecah dini.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan apoptosis sel amnion pada ibu hamil yang menyebabkan terjadinya ketuban pecah dini kemungkinan besar disebabkan oleh adanya infeksi dan berhubungan dengan *endonuclease-G* karena adanya hambatan pada jalur *caspase dependent*. Di mana infeksi yang menyebabkan hal ini berkaitan dengan infeksi kuman-kuman obligat intraseluler, karena kuman-kuman obligat intraseluler tersebut merupakan infeksi dengan kemampuan merusak mitokondria. Di antara kuman-kuman tersebut yang paling penting adalah *Chlamydia trachomatis*. Hal ini dapat dipakai sebagai dasar kebijakan untuk perawatan dan tindakan pencegahan PROM dan PPRM, dengan memberikan terapi antibiotika pencegahan untuk kasus-kasus resiko tinggi terjadinya ketuban pecah dini. Terapi antibiotika yang diberikan adalah antibiotika profilaksis untuk kuman-kuman obligat intraseluler (**Korn**, 2000; **Cunningham et al.**, 2005).

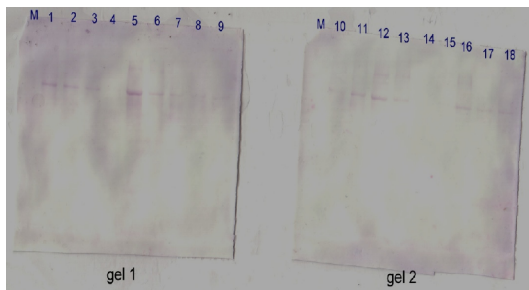
Salah satu bakteri obligat intraseluler yang potensial yaitu *Chlamydia trachomatis*, di mana angka prevalensi *C. trachomatis* pada kehamilan bervariasi antara 2–35% (**Savoia**, 2004); pada pemeriksaan prenatal ibu hamil di USA pada 28 negara bagian tahun 2002 didapatkan angka kejadian 10,1% (**Cunningham et al.**, 2005); di Indonesia tahun 1996 didapatkan angka 8,2% dari ibu hamil tanpa bacterial vaginosis dan 19,5% dengan bacterial vaginosis, (**Joesoef et al.**, 1996).

Pada penelitian **Prabantoro** pada bulan September 2006 sampai dengan bulan Desember 2006, diteliti infeksi *Chlamydia trachomatis* pada spesimen jaringan amnion diantara ibu hamil dengan PROM/PPROM dan tanpa keluhan/gejala infeksi *Chlamydia*, menggunakan teknik amplifikasi DNA (AMPLICOR *Chlamydia*, Roche) ternyata tidak dapat dideteksi *Chlamydia trachomatis*.

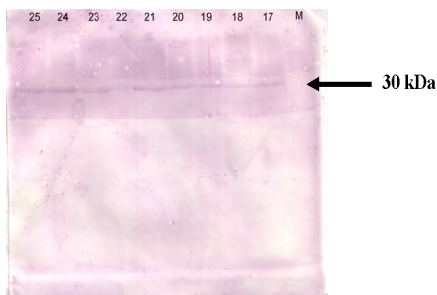
Kemungkinan di antara kasus kehamilan dengan PROM/PPROM pada penelitian ini terjadi infeksi asimtomatis karena pada anamnesis historis pernah ada keluhan nyeri atau panas daerah perkemihan dan Infeksi *Chlamydia* pada wanita sering asimtomatis (**Joesoef et al.**, 1996). Selain itu sampel spesimen jaringan amnion kemungkinan memerlukan teknik khusus dalam hal *processing* spesimen untuk isolasi DNA *Chlamydia trachomatis*.

Dengan demikian deteksi *Endonuclease-G* sebagai alat diagnostik dapat berperan pada diagnosis dini adanya infeksi terutama intraseluler yang cenderung mengakibatkan PROM/PPROM; sehingga dapat dikaji selanjutnya untuk

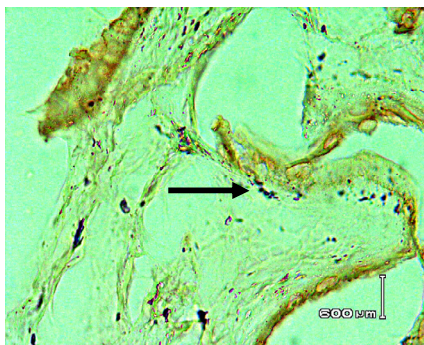
dasar menetapkan prosedur standar pencegahan dan perawatan PROM/PPROM seperti pemberian antimikroba terhadap *Chlamydia trachomatis* dan antimikroba lain terhadap bakteri ekstraselular yang berkaitan dengan PROM/PPROM.



Gambar 1. Analisis protein, deteksi caspase-3 dengan metode *Western Blotting* pada sampel supernatan homogenat sel / jaringan amnion dari kehamilan dengan ketuban pecah dini (M: marker; Lajur 1 – 18 : sampel).



Gambar 2. Analisis protein, deteksi endonuclease-G dengan metode *Western Blotting* pada sampel supernatan homogenat sel / jaringan amnion dari kehamilan dengan ketuban pecah dini (M: marker; Lajur 17–25: sampel).



Gambar 3. Analisis indeks apoptosis dengan metode *TUNEL- Assay* (tanda panah menunjukkan apoptosis sel amnion pada jaringan amnion dari ibu hamil dengan ketuban pecah dini)

SIMPULAN

1. Ada hubungan antara tingkat deteksi *endonuclease-G (independent pathway)* dengan kejadian apoptosis pada kehamilan ketuban pecah dini. Sehingga deteksi *endonuclease-G* (tingkat deteksi dengan konsentrasi tinggi) dapat digunakan sebagai kandidat biomarker kejadian apoptosis sel amnion pada kehamilan dengan ketuban pecah dini.
2. Tidak ada hubungan antara tingkat deteksi *endonuclease-G (independent pathway)* dengan jenis kehamilan ketuban pecah dini (PROM dan PPRM).
3. Tidak ada hubungan antara tingkat deteksi caspase-3 (*dependent pathway*) dengan kejadian apoptosis pada kehamilan ketuban pecah dini.
4. Tidak ada hubungan antara tingkat deteksi caspase-3 (*dependent pathway*) dengan jenis kehamilan ketuban pecah dini (PROM dan PPRM).

SARAN

1. Deteksi peningkatan *endonuclease-G* dapat dipertimbangkan sebagai kandidat diagnosis dini untuk kecenderungan terjadinya PROM/PPROM, sehingga berguna sebagai dasar kebijakan perawatan dan tindakan pencegahan PROM/PPROM dengan memberikan antibiotika profilaksis golongan kuman obligat intraselular pada ibu hamil resiko tinggi terjadinya PROM/PPROM.
2. Penelitian eksperimental infeksi intraselular maupun ekstraselular untuk menentukan peran deteksi biomarker *Endonuclease-G* atau yang lain untuk penentu apoptosis, sehingga dapat menetapkan prosedur pencegahan dan penanganan ibu hamil dengan resiko tinggi PROM/PPROM.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadi A**, 1999. Radang selaput ketuban dan plasenta serta interleukin-6 dalam air ketuban sebagai faktor penentu terjadinya persalinan pada persalinan kurang bulan membakat. Disertasi. Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran-Universitas Airlangga.
- Burdon C, Mann C, Cindrova-Davies T, Ferguson-Smith AC, Burton GJ**, 2006. Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the murine placenta. *J. Placenta* 28: 724–733.
- Carson-DeWitt R**, 1999. Premature rupture of membranes. *Gale Encyclopedia of Medicine*. Gale research. 1–4.

- Cunningham FG**, 2001. Preterm birth. In: William Obstetrics Text Book. 21st. Ed. McGraw-Hill Medical Publishing Company. 689–725.
- Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap III L, Wenstrom KD**, 2005. Sexually transmitted diseases. In: Williams Obstetrics. 22nd Ed. McGraw-Hill Medical Publishing Company. 1301–1325.
- Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM**, 1998. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected Cells: Blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. 1998. J. Exp. Med. 187. 487–496.
- Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, Hacker G**, 2000. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. J. Exp. Med. 200; 7: 905–916.
- Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ**, 2000. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. American. J Obstetrics & Gynecology. 182: 1468–76.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B**, 2001. Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: Therapeutic implication in preterm rupture of membranes. Obstet & Gynecol. 98: 284–288.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ**, 2002. Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. American. J Obstetrics & Gynecology. 187: 1159–1162.
- Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C**, 1997. Pathogenesis of PTL and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. Infect. Dis. Clin.North. Am. 11. 135–176.
- Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GG**, 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. J. Cell. Biol. 143. 207–215.
- Guimaraes CA and Linden, R**. 2004. Programmed cell death. Apoptosis and alternative death styles. FEBS. 271. 1638–1650.
- Gravett MG, Witkins SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ**, 1994. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkey. American. J Obstetrics & Gynecology. 171. 1660–1667.
- Joesoef MR, Wiknyosastro G, Norojono W, Sumampouw H, Linnan MJ, Hansell SE**, 1996. Coinfection with chlamydia and gonorrhoea among pregnant women with bacterial vaginosis. Int J STD AIDS 1996; 7: 61–64.
- Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W**, 2001. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomized trial. The Lancet. 357: 979–88.
- Kim YB, Kim JK, Hong SH, Won CH, Kee SJ, Hong CS, Ji IW, Jeong EH, Kim HS**, 2001. Programmed cell death in Placenta. Chungbuk Med. J. 11(2): 105–116.
- Kogel D and Prehn JHM**, 2002. Caspase-independent cell death mechanism in caspases – their role in cell death and cell survival (Malek Los and Henning Walczak eds). Landes series: Molecular Biology Intelligence Unit 24. Plenum Publishers, New York.
- Korn AP**, 2000. Chlamydia trachomatis infections in pregnancy. Contemporary ob/gyn. 4. 65–75.
- Kumagai K, Otsuki Y, Ito Y, Shibata MA, Abe H, Ueki M**, 2001. Implantation and Pregnancy: Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. Mol. Human Reprod. 7. 681–689.
- Levy R and Nelson DM**, 2000. To be, or not to, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. Placenta. 21. 1–13.
- Li LY, Luo X, Wang X**, 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 412: 95 – 99.
- McLaren J, Taylor DJ, Bell SC**, 1999. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. Hum. Reprod. 14. 2895–2900.
- Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ**, 2000. Activation of apoptosis in PROM : Caspase independent ? J. Obstet Gynecol. 240–244.
- Miller JM Jr, Kho MS, Brown HL, Gabert HA**, 1990. Clinical chorioamnionitis is not predicted by an ultrasonic biophysical profile in patients with premature rupture of membranes. J. Obstet Gynecol. 76. 1051.
- Modena AB, Kaihura C, Fieni S**, 2004. Prelabour rupture of the membranes: recent evidence. Acta Biomedica Ateneo Parmense. 75; Suppl. 1: 5–10.
- Mu J, Kanzaki T, Si X, Tomimatsu T, Fukuda H, Shioji M, Murata Y, Sugimoto Y, Ichikawa A**

2003. Apoptosis and related proteins in placenta of intrauterine fetal death in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Biol of Reprod.* 68; 1968–1974.
- Murtha AP, Auten R, Herbert NP**, 2002. Apoptosis in the chorion laeve of term patients with histologic chorioamnionitis. *Infect. Dis. Obstet & Gynecol* 2002; 10: 93–96.
- Numasaki K, Asanuma H, Niida Y**, 2003. Chlamydia trachomatis infection in early neonatal period. *BMC Infect. Dis.* 3(1): 2.
- Ojcius DM, Souque P, Perfettini JL, Varsat AD**, 1998. Apoptosis of epithelial cells and macrophage due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J. Immunol.* 161, 4220–4226.
- Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O**, 1994. Cyclic Bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet.* 344. 28–29.
- Paavola LG, Furth EE, Delgado V**, 1995. Striking changes in the structure and organization of rat fetal membranes precede parturition. *Biol. Reprod.* 53. 321–328.
- Parry S and Strauss JF**, 1998. Premature rupture of fetal membranes. *New England J. Med.* 338. 663–670.
- Peltier MR**, 2003. Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 1: 122.
- Perfettini JL, Reed JC, Israel N, Martinou JC, Varsat AD, Ojcius DM**, 2002. Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during *Chlamydia* infection. *Infection and immunity.* 70. 55–61.
- Rastogi S, Das B, Salhan S, Mittal A**, 2003. Effect of treatment for *Chlamydia trachomatis* during pregnancy. *International Journal of Gynecol and Obstetrics.* 80: 129–137.
- Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Edwin SS**, 1998. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am. J. Obstet Gynecol.* 179. 183–193.
- Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon BH, Edwin S, Mazor M, Maymon E, Berry S**, 2002. Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *American J. of Obstetric and Gynecol.* 187; 5: 1125–1130.
- Savoia MC**, 2004. Bacterial, fungal and parasitic disease. In : *Medical Complications during Pregnancy* (Burrow GN, Duffy TP, Copel JA, eds.). 6th ed. The Curtis Center, Philadelphia: 305–345.
- Straszewski-Chavez S, Abrahams VM, Mor G**, 2005. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocrine Reviews* 26: 877–897.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AI**, 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 129. 2799–2801.
- Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert W, Vandenabeele P**, 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell death and differentiation.* 8: 1136–1142.
- Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT**, 2001. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* 276: 48404–48409.
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ**, 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.* 139. 1281–1292.
- Xu P, Alafaidy N, Challies JRG**, 2002. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 87. 1352–1361.
- Zhang JH, Dong M, Li L, Fan YX, Pathre P, Dong J**, 2003. Endonuclease-G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *The National Academy of Sciences of the USA.* Vol. 100, 26: 15782–15787.