

# Peningkatan Radikal Bebas pada Eritrosit yang Terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum*

Susy Tjahjani

Bagian Parasitologi

Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung

## Abstract

Especially in tropical area, there is high *falciparum* malaria morbidity and mortality which is caused by oxidative stress such as cerebral malaria. One of the causes of the oxidative stress is the process happening in the parasitized erythrocytes. Therefore, it is important to study the process that causes the oxidative stress in parasitized erythrocytes. The oxidative stress in non parasitized erythrocytes is caused by hemoglobin auto-oxidation. Reactive oxygen species (ROS) production in the parasite food vacuoles happens because of a producing ROS reaction cascade and the hemoglobin digestion that produces toxic heme which should be biomineralized. Part of this heme escapes from the biomineralization and moves from the parasite food vacuoles into the parasite cytosol which also needs to be detoxified and sequestered by using GSH. Parasite mitochondrial activity produces superoxide anion and hydrogen peroxide, which is then changed to be water and oxygen by thioredoxin consuming enzyme. However, there is no thioredoxin reductase to reduce thioredoxin. Lipoic acid protein ligase (LplA) metabolites ligates lipoic acid to E2-subunit of KADH (mitochondrial  $\alpha$  keto acid dehydrogenase), which then reduces thioredoxin by using NADH. Part of this  $H_2O_2$  also escapes from the detoxification and is exported to the parasite cytosol. The antioxidant system in the parasite cytosol includes superoxide dismutase, glutathione reductase, and thioredoxin reductase. The detoxification of  $H_2O_2$  is carried out by using GST (glutathione S transferase) and 1 cys peroxyredoxin with GSH as cofactor, and by 2 cys peroxyredoxin with thioredoxin as cofactor. *Plasmodium* has neither glutathione peroxydase nor catalase. Part of GSSG as redox product in *Plasmodium* is exported to the erythrocyte cytosol and it causes oxidative stress in this cell. Hence, antioxidant supplementation must be considered in treating malaria especially in serious cases.

**Key word:** oxidative stress, erythrocyte, *Plasmodium falciparum*

## Pendahuluan

Malaria *falciparum* merupakan penyakit yang serius dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi dan banyak terdapat di wilayah tropik termasuk di Indonesia.<sup>1,2,3,4,5,6</sup> Salah satu penyebab tingginya mortalitas tersebut adalah malaria serebral. Kelainan neurologik ini dapat disebabkan antara lain oleh meningkatnya produksi ROS (*reactive oxygen species*) yang disebabkan oleh aktivasi netrofil inang dan degranulasi hemoglobin dalam parasit. Dan menurut Sanjib, ROS yang meningkat ini

mengakibatkan terjadinya peningkatan permeabilitas pembuluh darah akibat kerusakan endotelnya.<sup>7</sup> Dalam keadaan tidak terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum* ini pun sudah didapatkan adanya stres oksidatif dalam eritrosit ini.<sup>8</sup> Stres oksidatif ini dialami baik oleh parasit, yang dalam vakuola makanan maupun mitokondrianya diproduksi ROS, maupun oleh eritrosit yang terinfeksi.<sup>9,10</sup> Untuk itu, kiranya perlu dipelajari semua proses yang dapat menyebabkan stres oksidatif dalam eritrosit yang terinfeksi oleh *P. falciparum*

ini sehingga akan menambah wawasan mengenai patogenesis berbagai malaria berat yang di dalamnya termasuk malaria serebral serta dapat menjadi bahan pertimbangan dalam penanganan malaria.

### Stres oksidatif dalam Eritrosit Normal yang Tidak terinfeksi

Walaupun dalam sel eritrosit ini terdapat sistem antioksidan yang luas yang berguna untuk menetralkan ROS yang berasal dari oto-oksidasi hemoglobin seperti SOD, glutathion peroksidase, dan katalase, dari penelitian terbukti bahwa beberapa dari ROS ini dapat terhindar dari sistem antioksidan dan mampu menghasilkan produk degradasi heme.<sup>11</sup> OksiferroHB akan bereaksi dengan oksigen dan akan menghasilkan methHb serta anion superoksida ( $O_2^-$ ).  $O_2^-$  ini akan diubah oleh SOD (superoksida dismutase) atau secara spontan menjadi Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  ini akan bereaksi dengan  $Fe^{2+}$  menjadi  $Fe^{3+}$  dan radikal hidroksil ( $OH^\bullet$ ) melalui reaksi Fenton.  $O_2^-$  dan  $H_2O_2$  juga merupakan substrat pada reaksi Haber-Weiss yang dikatalisasi oleh ion besi yang juga menghasilkan radikal hidroksil.  $Fe^{2+}$  ini berasal dari perubahan  $Fe^{3+}$  oleh  $O_2^-$ .<sup>11,12,13</sup> Kira-kira 3 % hemoglobin manusia yang berada dalam eritrosit mengalami oto-oksidasi ini setiap harinya.<sup>13</sup>

Dalam mengevaluasi kepentingan degradasi heme dalam sel eritrosit ini, perlu juga mempertimbangkan efek fungsional yang mungkin terjadi terhadap sel eritrosit tersebut yang disebabkan oleh produk degradasi heme ini. Efek ini dapat mempengaruhi komposisi membran yang mempengaruhi deformabilitas sel eritrosit serta kemampuan eritrosit tersebut dalam mentranspor oksigen. Kemudian

dibuktikan juga dalam penelitian bahwa produk degradasi ini berperan dalam pemaparan *antigenic site* membran eritrosit tersebut. Hal inilah yang diperkirakan bertanggung jawab dalam eliminasi sel eritrosit dari sirkulasi darah.<sup>12</sup>

### ROS dan Mekanisme Antioksidan dalam Vakuola Makanan Parasit

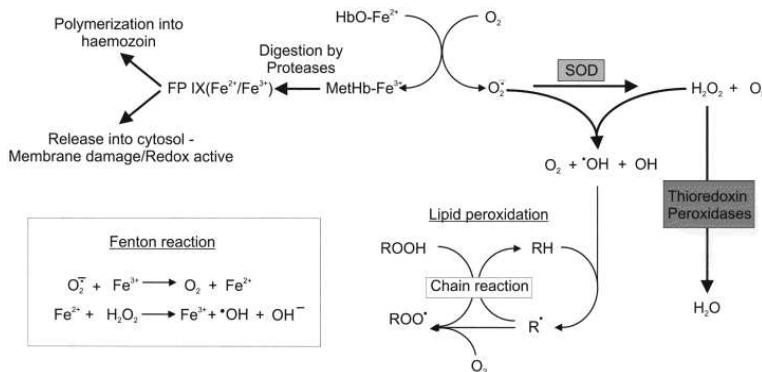
Sumber utama *reactive oxygen species* dalam *P.falciparum* selama kehidupan intra-eritrositik adalah digesti hemoglobin inang dalam vakuola makanan parasit tersebut. Heme bebas (FP IX) dilepaskan dari hemoglobin yang dicernakan dan kebanyakan heme tersebut, yaitu sampai 90 %, dibiomineralisasi menjadi hemozoin. Tetapi sebagian heme bebas, yaitu bisa sampai 50 %, dilepaskan dari vakuola makanan parasit ke dalam sitosol parasit yang di sini heme bebas ini menyebabkan kerusakan membran dan kemudian dapat menyebabkan reaksi redoks yang akan menghasilkan anion superoksida dalam kompartemen parasit. Oleh karena itu heme bebas ini harus didetoksifikasi dengan cara lain.<sup>9</sup> Anion superoksida, dihasilkan oleh oksidasi besi heme dalam hemoglobin yang dipermudah oleh adanya suasana asam dalam vakuola makanan parasit, dapat secara spontan atau didetoksifikasi oleh SOD untuk menghasilkan  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  dapat bereaksi dengan  $Fe^{2+}$  melalui reaksi Fenton dan menghasilkan radikal hidroksil. Radikal ini sangat reaktif dan dapat menyebabkan berbagai proses seperti halnya peroksidasi lipid.  $H_2O_2$  yang dihasilkan melalui reaksi dengan SOD harus didetoksifikasi melalui reduksi menjadi  $H_2O$ . Dalam *P. falciparum* proses ini secara murni dilakukan oleh tioredoksin peroksidase

karena dalam *P. falciparum* tidak didapatkan adanya katalase ataupun glutatation peroksidase. Sebagian  $H_2O_2$  juga lolos dari vakuola makanan parasit dan masuk ke dalam sitosol parasit.<sup>9</sup>

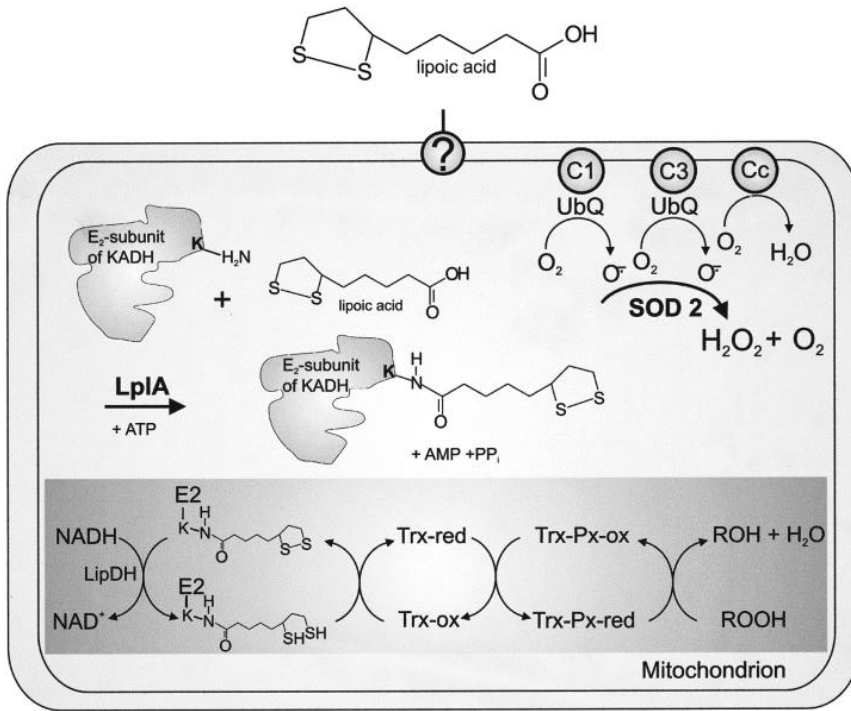
### ROS dan Mekanisme Antioksidan dalam Mitokondria Parasit

Sistem Antioksidan dalam Mitokondria *P. falciparum*. Stadium eritrositer *P. falciparum* memiliki rantai respirasi yang aktif dan kompleks enzim I dan III ( $C_1$  dan  $C_3$ ) mengandung ubiquinon (UbQ) sebagai kofaktor. Seperti diketahui kompleks-kompleks ini akan menghasilkan anion superoksida yang harus didetoksifikasi oleh SOD mitokondria (SOD 2). Selama reaksi ini akan dihasilkan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang perlu direduksi untuk mencegah kerusakan oksidatif pada organelnya. Genom *Plasmodium* mengandung gen yang mengkode protein kedua yang menyerupai tioredoksin (Trx) dan peroksiredoksin mitokondrial yang potensial (Trx-Px) yang bertanggung jawab dalam mereduksi hidrogen peroksida yang diproduksi oleh rantai transpor elektron ini. Akan tetapi oleh karena parasit ini tidak memiliki tioredoksin reduktase mitokondrial, diduga ada mekanisme

alternatif yang dengannya siklus redoks tioredoksin terjadi. Akhir-akhir ini telah dibuktikan bahwa parasit ini memiliki suatu enzim *lipoic acid protein ligase* (LplA) dalam mitokondrianya. Metabolit dari enzim ini diperlukan untuk fungsionalitas kompleks *mitochondrial a ketoacid dehydrogenase* (KADH) dengan cara mentransfer asam lipoat bebas ke *dihydrolipoamide transacylase subunit* (E2-subunit). Lipoamida bebas atau yang terikat pada protein ini yang diperoleh dari sel inang atau yang terbentuk melalui jalur sintesis asam lipoat yang terdapat pada apikoplas parasit, suatu organel plastid Plasmodium yang homolog dengan kloroplas pada tumbuhan, kemudian diambil ke dalam mitokondria melalui mekanisme yang belum jelas dan berpotensi sebagai reduktor bagi tioredoksin yang kemudian akan mereduksi peroksiredoksin mitokondrial sehingga menjamin eliminasi hidrogen peroksida yang efisien (ROOH, termasuk  $H_2O_2$ ) yang terbentuk selama reaksi metabolik dalam mitokondria. Sebagian  $H_2O_2$  yang berasal dari mitokondria ini juga lolos dari proses peroksidasi dan akan masuk ke dalam sitosol parasit.<sup>9</sup>



Gambar 1. ROS dalam Vakuola Makanan Parasit<sup>9</sup>



Gambar 2. Sistem Antioksidan dalam Mitokondria *P. falciparum*<sup>9</sup>

**ROS dan Mekanisme Antioksidan dalam Sitosol Parasit**

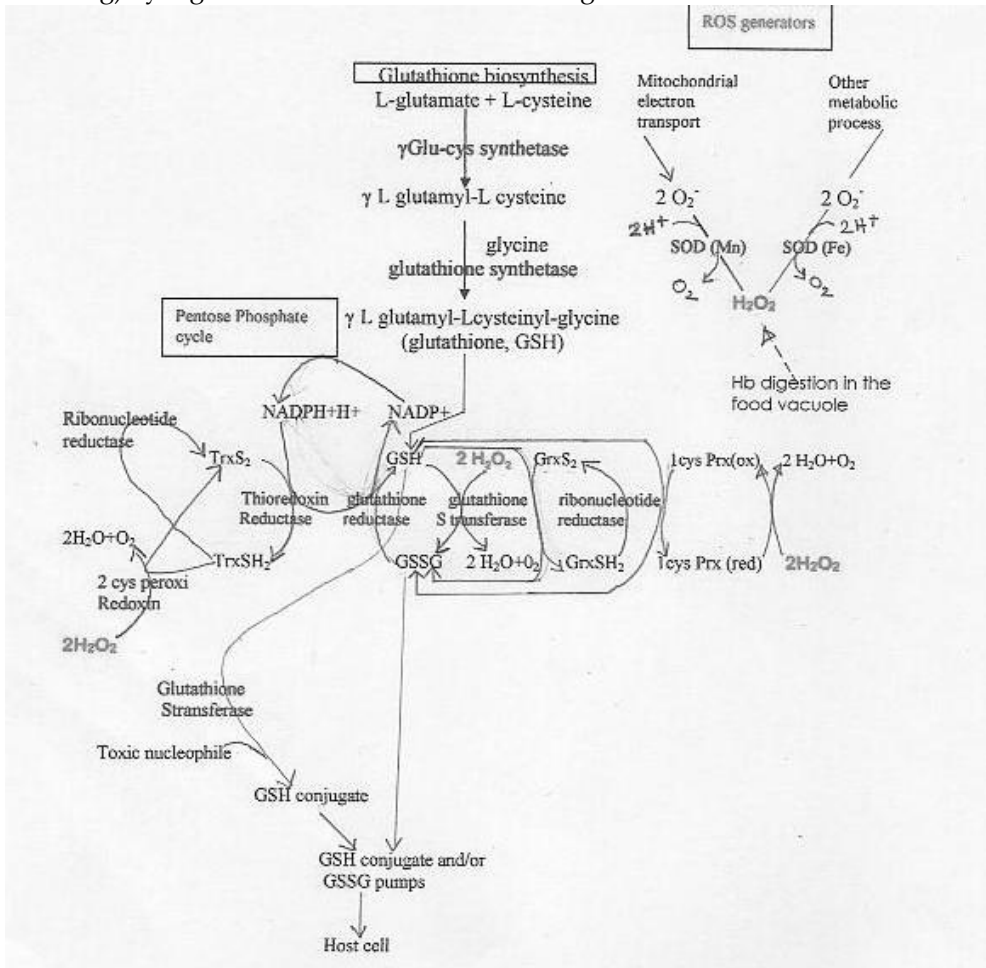
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam sitosol parasit berasal dari berbagai proses dalam parasit, yaitu: dari rantai respirasi mitokondria parasit, proses digesti Hb, dan proses-proses lainnya. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ini akan didetoksifikasi menjadi air + oksigen dengan berbagai cara, yaitu: 1) dengan enzim glutathion S-transferase (GST) yang menggunakan glutathion (GSH) sebagai kofaktor. Dalam proses ini GSH berubah menjadi GSSG, 2) dengan enzim 1 sis peroksiredoksin yang juga menggunakan GSH sebagai kofaktor, 3) dengan enzim 2 sis peroksiredoksin yang menggunakan tioredoksin tereduksi (Trx-SH<sub>2</sub>) sebagai kofaktor.

Dalam proses ini Trx-SH<sub>2</sub> nya teroksidasi menjadi Trx-S<sub>2</sub>. GSSG juga terbentuk sebagai hasil degradasi heme non enzimatis oleh GSH serta sekuestrasi heme oleh GST.<sup>9</sup>

GSSG dan Trx-S<sub>2</sub> ini masing-masing kemudian akan dikembalikan menjadi GSH dan Trx-SH<sub>2</sub> oleh enzim glutathion reduktase (GR) dan tioredoksin reduktase dengan NADPH yang diperoleh dari jalur pentosa fosfat.<sup>9</sup>

GSSG dan Trx-S<sub>2</sub> yang tidak berhasil direduksi kembali akan mengalami efluks dari sitosol parasit ke dalam sel inang sehingga ratio GSH/GSSG serta ratio Trx-SH<sub>2</sub>/ Trx-S<sub>2</sub> menjadi terganggu sehingga sel eritrosit

(sel inang) yang terinfeksi ini akan mengalami stres oksidatif.<sup>9</sup>



Gambar 3. Skema Umum Menggambarkan Berbagai Macam Proses Biokimia Pertahanan Antioksidan dalam Sitosol Parasit.<sup>12</sup>

**Glutathione -dependent detoxification systems in *P. falciparum***

Selain perannya sebagai antioksidan dan donor redoks tiol, glutathione terlibat dalam bermacam-macam reaksi detoksifikasi vital pada *P. falciparum*. Walaupun terjadi biomineralisasi yang efisien dari heme bebas menjadi hemozoin karena pemecahan hemoglobin oleh parasit, sejumlah yang cukup dari FP IX toksik

ini tetap bebas.<sup>14</sup> FP IX ini toksik karena zat ini memiliki aksi seperti detergen yang mempengaruhi integritas membran dan mempunyai kemampuan untuk melakukan reaksi redoks yang menyebabkan timbulnya ROS karena adanya ikatan besi. Oleh karena itu FP IX ini perlu didetoksifikasi atau disekuestrasi untuk mencegah toksisitas terhadap membran dan kematian parasit. Ginsburg dkk telah

menunjukkan bahwa FP IX didegradasi secara non enzimatis oleh GSH dan mekanisme ini dihambat oleh klorokuin. Jadi kekurangan GSH akan mengakibatkan kurang efisiennya detoksifikasi FP IX bebas yang akan mengakibatkan kematian parasit.<sup>15</sup>

### Simpulan

Stres oksidatif dalam eritrosit yang terinfeksi oleh *P. falciparum* yang merupakan salah satu penyebab terjadinya malaria berat misalnya malaria serebral dapat disebabkan oleh proses-proses yang terjadi dalam organel-organel *P. falciparum* berikut ini:

- Proses dalam vakuola makanan parasit:
  - ❖ Terhindarnya heme dari proses polimerisasi oleh parasit sehingga terjadi penumpukan heme bebas yang akan diekspor ke dalam sitosol parasit sehingga diperlukan suatu proses detoksifikasi melalui mekanisme yang belum jelas dengan mengkonsumsi GSH dan akan menyebabkan penumpukan GSSG dalam sitosol parasit serta kemudian GSSG ini akan diekspor ke dalam sitosol eritrosit. Keadaan ini akan menyebabkan terganggunya rasio GSH terhadap GSSG yang akan menyebabkan keadaan stres oksidatif.
  - ❖ Terhindarnya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang berasal dari proses dalam vakuola makanan terhadap proses detoksifikasi oleh tioredoksin peroksidase sehingga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ini akan diekspor ke dalam sitosol parasit yang kemudian akan direduksi dengan

mengkonsumsi GSH/ Trx-SH2 untuk membentuk GSSG/ Trx-S2. GSSG/Trx-S2 ini kemudian akan diekspor ke dalam sitosol eritrosit. Dengan demikian terjadilah penumpukan GSSG/ Trx-S2 dan ketidakseimbangan rasio GSH/ Trx-SH2 terhadap GSSG/Trx-S2 yang menimbulkan stres oksidatif dalam eritrosit tersebut.

- Proses dalam mitokondria parasit:
  - ❖ Terhindarnya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang berasal dari proses dalam mitokondria parasit terhadap proses detoksifikasi oleh tioredoksin peroksidase sehingga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ini akan diekspor ke dalam sitosol parasit yang kemudian akan direduksi dengan mengkonsumsi GSH/ Trx-SH2 untuk membentuk GSSG/ Trx-S2. GSSG/ Trx-S2 ini kemudian akan diekspor ke dalam sitosol eritrosit. Dengan demikian terjadilah pula penumpukan GSSG/ Trx-S2 dan ketidakseimbangan rasio GSH/ Trx-SH2 terhadap GSSG/ Trx-S2 yang menimbulkan pula stres oksidatif dalam eritrosit tersebut.

Selain proses dalam parasit tersebut, proses dalam sitosol eritrosit sendiri sebagai akibat oto-oksidasi Hb akan menghasilkan ROS yang sebagian lolos dari netralisasi oleh sistem antioksidan dalam eritrosit tersebut sehingga akan memperberat keadaan stres oksidatif dalam eritrosit terinfeksi.

### Saran

Pemberian antioksidan perlu dipertimbangkan dalam penanganan malaria terutama pada malaria berat.

#### Daftar Pustaka

1. Trigg PI, and Kondrachine AV. The current global malaria situation. In Sherman IW (ed): Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington, DC: Am Soc Microbiol. 1998; 11-22.
2. Gordi T, Clinical pharmacokinetics of the antimalarial artemisinin based on saliva sampling. Comprehensive Summaries of Uppsalla Dissertations from The Faculty of Pharmacy 250 University of Uppsalla.2001.
3. Seys SA and Bender JB. The changing epidemiology of malaria in Minnesota. Emerging Infectious Disease.2001; 7(6): 993-94.
4. CDC. Malaria facts.[update 2007, cited 2008 July 31] Available from. <http://www.cdc.gov/malaria/facts.htm>
5. Kirk K., Membrane transport in malaria-infected erythrocyte. Physiological Reviews. 2001; 81(2): 495-537.
6. Winstanley PA. Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and the prospects. Parasitol Today.2000; 16:146-53.
7. Mohanty S, Patel DK, Pati SS, dan Mishra SK. Adjuvant therapy in cerebral malaria. Indian J. Med. Res. 2006; 124: 245-60.
8. Postma NA, Mommers EC, Eling WM, Zuidema J. Oxidative stress in malaria; implication for prevention and therapy. Pharm World Sci.1996;18(4):121-9.
9. Müller S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Molecular Microbiology.2004; 53(5): 1291.
10. Stvrtinova V, Jacobovsky J, Hulin I. Pathophysiology principles of diseases. Academic Electronic Press.1995.
11. Nagababu E & Rifkin JM. Heme degradation by reactive oxygen species, forum review. Antioxidants & Redox Signaling. © Mary Ann Liebert, Inc. 2004;6 (6).
12. Bozdech Z & Ginsburg H. Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum* - data mining of the transcriptome. Malaria Journal. 2004;3:23.
13. Murray RK. Red & White Cells. Dalam Murray RK, Granner DK, Mayes PA, & Rodwell VW. Harper's illustrated biochemistry. 21<sup>st</sup> Edition. Mc Graw Hill.2003.
14. Loria P, Miller S, Foley M, and Tilley L. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. Biochem J.1999; 339: 363-70.
15. Atamna H, and Ginsburg H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. J Biol Chem. 1995; 270: 24876-83.

