
Pemberian Citicoline pada Tikus Cedera Saraf Mentalis: Ekspresi Gen SIRT1 Ganglion Trigeminal

(The Administration of Citicoline on Rat Model with Mental Nerve Crush Injury: Gene Expression of Trigeminal Ganglion SIRT1)

David Pakaya, InicheTinta, Elfiana Ibrahim, Imtihanah Amri

Fakultas Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia, 94118

Article Info:

Received: 12 Desember 2017
in revised form: 12 Januari 2018
Accepted: 30 Maret 2018
Available Online: 30 Maret 2018

Keywords:

Citicoline,
SIRT1,
Peripheral nerves injury,
nerve regeneration

Corresponding Author:

David Pakaya
Fakultas Kedokteran,
Universitas Tadulako
Palu, 94118
Indonesia
Mobile : 081356377422
Email: davidpakaya@gmail.com

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries lead to a decrease in the number of neurons in the sensory ganglion. Citicoline administration has been reported to be able to improve the functional motoric conditions and prevent neuropathy in model of peripheral nerve injury. In sensory ganglion, the increasing of regeneration is associated with SIRT1 which promotes neuronal survival. This study aimed to examine the hypothesis that citicoline administration induces SIRT1 gene expression in acute phase of rat model of mental nerve injury. After anesthetized, right mental nerve is crushed with non-serrated clamp for 30 seconds. The rats were divided into 3 groups, sham-operated, control saline and citicoline group. Citicoline is given on i.p. 50 mg/kg BW/day for 7 days. The rats are sacrificed at day 1, 3 and 7 after injury (3 rats per group), the right trigeminal ganglion were dissected out and undergo RNA extraction, reverse transcriptasePCR and qPCR for SIRT1 gene expression. The results showed there was increase level of SIRT1 7 days after a mental nerve injury given daily doses of citicoline i.p therapy. In conclusion, citicoline administration immediately after injury increased SIRT1 level 7 days after injury.

Copyright © 2017 JFG-UNTAD

This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

How to cite (APA 6th Style):

Pakaya, D. et al (2018). Pemberian Citicoline pada Tikus Cedera Saraf Mentalis: Ekspresi Gen SIRT1 Ganglion Trigeminal. *Jurnal Farmasi Galenika : Galenika Journal of Pharmacy*, 4(1), 68-72. doi:10.22487/j24428744.2017.v4.i1.10005

ABSTRAK

Cedera saraf perifer menyebabkan jumlah neuron menurun di ganglion sensorik, sehingga regenerasinya tidak baik. Pemberian Citicoline telah dilaporkan dapat memperbaiki kondisi fungsi motorik dan mencegah nyeri neuropati pada model tikus cedera saraf perifer. Pada ganglion sensorik, peningkatan regenerasi terkait dengan SIRT1 yang mendorong kelangsungan hidup neuron. Penelitian ini bertujuan untuk menguji hipotesis bahwa pemberian citicoline meningkatkan ekspresi gen SIRT1 fase akut pada model tikus cedera saraf mentalis. Setelah dianestesi, saraf mentalis kanan dijepit dengan klem tanpa gerigi selama 30 detik. Tikus-tikus dibagi menjadi 3 kelompok, kelompok operasi sham, kelompok cedera dan kelompok citicoline. Citicoline diberikan secara i.p. 50 mg/kg BB/hari selama 7 hari. Tikus dinekropsi pada hari ke-1, 3 dan 7 setelah cedera. Pada hari ke-1,3,7 (3 tikus per kelompok), ganglion trigeminal kanan dipotong dan diekstraksi RNA, reverse transcriptase PCR dan qPCR untuk melihat ekspresi gen SIRT1. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan ekspresi SIRT1 hari ke-7 setelah cedera saraf mentalis tikus yang diberikan terapi citicoline i.p. Sebagai kesimpulan, pemberian citicolin segera setelah cedera saraf mentalis meningkatkan ekspresi SIRT1 pada hari ke-7.

Kata Kunci : Citicoline, SIRT1, cedera saraf perifer, regenerasi saraf

PENDAHULUAN

Neuron yang mengalami cedera dalam system saraf perifer, mampu secara spontan beregenerasi (Lu *et al*, 2014). Namun, setelah cedera saraf perifer, sekitar 10-30% neuron di ganglion sensorik cenderung mengalami apoptosis. Proporsi kematian neuronal bervariasi pada model cedera yang berbeda dan dalam jangka waktu yang berbeda (Groves *et al*, 1999; Tandrup *et al*, 2000; McKay Hart *et al*, 2002; Burland *et al*, 2014.). Sirtuin1 (SIRT1; *silent information regulator 1*) merupakan enzim *histone deacetylase* (HDAC) kelas III yang berperan dalam deasetilasi substrat. Deasetilasi oleh SIRT1 ini akan mengaktifkan gen-gen antiapoptosis. Penghambatan apoptosis ini berefek penting dalam neuroproteksi, sehingga dapat meningkatkan *survival neuron* dan fungsi motoris (Hurtado *et al*, 2013).

Neuron sensorik membutuhkan faktor neurotropik seperti *nerve growth factor* (NGF), untuk kelangsungan hidup (Atlasi *et al*, 2009; Xiao, 2009). Setelah mengalami cedera saraf perifer, terjadi peningkatan faktor neurotropik tapi dengan respon lambat (Wan *et al*, 2010; Saleh *et al*, 2013; Xu *et al*, 2013) mulai hari ke-7 setelah cedera (Grumbles *et al*, 2009; Ziv-Polat *et al*, 2014).

Cytidine-5'-diphosphocholine adalah endogen yang terbentuk selama sintesis phosphatidylcholine. Pemberian cytidine-5'-diphosphocholine yang berasal dari luar, (citicoline) dilaporkan dapat menginduksi sintesis fosfolipid dan menjaga integritas membran (Parisi, 2008). Pada praktek klinis, citicoline digunakan untuk menginduksi regenerasi saraf di berbagai gangguan

system saraf pusat seperti stroke iskemik, gangguan kognitif dan glaukoma (Levin & Peeples, 2008; Milani, 2013). Pada model tikus cedera saraf perifer, pemberian citicoline telah terbukti memiliki potensi dalam meningkatkan fungsi motorik (Ozay *et al*, 2001; Aslan *et al*, 2011) serta mencegah nyeri neuropatik pascacedera (Emril *et al*, 2015) dengan dosis yang sesuai (Kaplan *et al*, 2013). Namun, apakah citicoline berpengaruh dalam mendorong ekspresi SIRT1 untuk mencegah kematian neuron di ganglion sensorik belum diketahui.

METODE

Hewan model

Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan Berat badan (BB) $\pm$ 250-300 gram, berusia 12 minggu. Tikus dianestesi dengan campuran ketamin-HCL dan ml Xylazin dalam 1 ml saline, secara intramuskuler. Daerah sub mandibular kanan dan saraf mentalis kanan dibersihkan dengan etanol 70%, dilakukan insisi, saraf mentalis kanan dikeluarkan dari foramen mandibularis, saraf mentalis dijepit dengan menggunakan klem tanpa gerigi berukuran 4 mm selama 30 detik. Tikus dibagi menjadi kelompok operasi sham, kelompok cedera dan kelompok citicoline (Dexa Medica) 50 mg/100 gr BB secara i.p setiap hari. Tikus-tikus di nekropsi pada hari ke-1,3 dan 7 setelah cedera (3 tikus per kelompok).

Analisis ekspresi gen SIRT1

Tikus dinekropsi pada hari ke-1, 3 dan 7 yang sebelumnya dianestesi dengan ketamin i.m. Ganglion trigeminal kanan diambil untuk ekstraksi

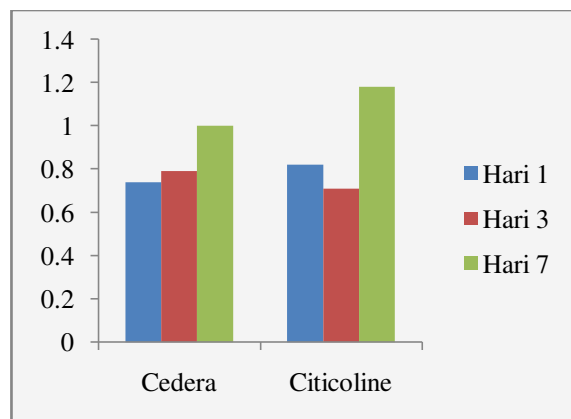
RNA menggunakan RN easy minikit (Qiagen, 74104). Konsentrasi RNA diukur dengan menggunakan spektrophotometri dan integritas RNA diperiksa menggunakan gel agarosa 2%. Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan 2µg sampel RNA dan *Transcriptor First Strand* cDNA sintesis (Roche, 04379012001). Mesin PCR diatur pada suhu 25°C selama 10 menit; 55°C selama 30 menit; 85°C selama 5 menit. cDNA disimpan dalam -20°C atau langsung digunakan untuk analisis ekspresi gen. Primer untuk qPCR dirancang menggunakan *Primer Blast application* di NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), pada panjang basa 100-250 dan *surpass exon* mencakup intron untuk mencegah amplifikasi DNA yang tidak spesifik. Ekspresi gen SIRT1 dianalisis menggunakan cDNA Template 3 µl, *Light Cycler FS DNA Master PLUS SYBR Green* (Roche, 03515869001) di *Light Cycler Carousel* (Roche) pada suhu 95°C selama 10 detik; 60° C selama 5 detik; 72°C selama 5 detik dilakukan dalam 45 siklus. Data diperoleh sebagai nilai *Crossing point* (Cp). Ekspresi gen relatif dianalisis dengan menggunakan referensi gen (GAPDH) berdasarkan persamaan

$$2^{-(Cp \text{ target gene} - Cp \text{ reference gene})},$$

dan dianalisis secara kualitatif

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian citicolin secara i.p. segera setelah terjadi cedera saraf mentalis menghasilkan adanya peningkatan ekspresi SIRT1 (1.18) pada hari ke-7.



Gambar 1. Ekspresi mRNA SIRT1 pada ganglion trigeminal kanan ipsilateral setelah cedera saraf mentalis. Didapatkan peningkatan ekspresi SIRT1 (1.18) setelah pemberian citicoline setiap hari selama 7 hari.

Setelah terjadi cedera saraf, sel saraf berespon dengan menghasilkan sinyal cedera berupa MAPK dan Sirtuin1 (SIRT1) (Abe dan Cavalli, 2008). Penghambatan jalur SIRT1 ini akan meningkatkan caspase 3 pada jalur apoptosis. Sirtinol merupakan inhibitor SIRT1 yang spesifik, sehingga fungsi deasetilasi yang dapat mengaktifkan gen-gen anti apoptosis terhambat. Pemberian citicoline membantu menghambat peran sirtinol tersebut. Citicoline mampu meningkatkan ekspresi SIRT1 dan sel-sel mononuclear pada model tikus stroke (Hurtado *et al*, 2013).

Cedera kompresi pada akson saraf mentalis akan menyebabkan kerusakan selubung myelin yang didasari oleh proses degenerasi Wallerian pada bagian distal dari segmen cedera, demielinisasi segmental dan degenerasi aksonal yang menyebabkan disintegritas membrane saraf (Osbourne, 2007; Truini *et al*, 2015). Mekanisme tersebut dapat menginduksi apoptosis neuron ganglion (Truini *et al*, 2015).

Proses degenerasi Wallerian ini membutuhkan komponen protein dan lipid termasuk kolin dan kolesterol. Pemberian citicoline ini akan membantu proses regenerasi tersebut. Metabolit kolin dan sitidin yang berasal dari citicoline, merupakan substrat yang penting untuk sintesis fosfatidilkolin yang membantu perbaikan membrane dan perbaikan neuron. Kolin diperlukan utamanya dalam pertumbuhan neurit distal. Citicoline membantu mencegah terjadinya apoptosis akson pascacedera. Selain itu, dapat mencegah terjadinya destruksi akson dan myelin melalui peningkatan fosfolipid serta mencegah respon peradangan (Emril *et al*, 2015). Efeknya dapat mencegah terjadinya nyeri neuropati dan perbaikan fungsi motorik setelah cedera.

KESIMPULAN

Pemberian citicolin segera setelah cedera saraf mentalis dapat meningkatkan ekspresi SIRT1 pada hari ke-7.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada dr. RinaSusilowati, Ph.D dan Inna Armadhari, M.Sc, Apt. Departemen Histologi dan Biologi Sel FK UGM.

DAFTAR PUSTAKA

Abe, N., & Cavalli, V. (2008). Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurobiol*, 18(3): 276–283.

- Aslan, E., Kocaeli, H., Bekar, A., Tolunay, S., Ulus, I. (2011). CDP-choline and its endogenous metabolites, cytidine and choline, promote the nerve regeneration and improve the functional recovery of injured rat sciatic nerves. *Neurol. Res.* 33: 766-73.
- Atlasi, M.A., Mehdizadeh, M., Bahadori, M.H., Joghataei, M.T. (2009). Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat. *Iran Biomed J.* 13:65-72.
- Burland, M., Paris, L., Quintana, P., Bec, J.M., Diouloufet, L., Sar, C. et al. (2014). Neurite growth acceleration of adult dorsal root ganglion neurons illuminated by low-level light emitting diode light at 645 nm. *J Biophotonics.* 9999:9999.
- Emril, D.R., Syafruddin, Wibowo, S., Meliala, L., Susilowati, R. (2015). Cytidine 5'-Diphosphocoline Administration Prevent Peripheral Neuropathic Pain after Rat Sciatic Nerve Crush Injury. *J. Pain Res.* 9:287-91
- Groves, M.J., An, S.F., Giometto, B., Scaravilli, F. (1999). Inhibition of sensory neuron apoptosis and prevention of loss by NT-3 administration following axotomy. *Exp. Neurol.* 155: 284-94.
- Grumbles, R.M., Sesodia, S., Wood, P.M., Thomas, C.K. (2009). Neurotrophic factors improve motoneuron survival and function of muscle reinnervated by embryonic neurons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68:736-46.
- Kaplan, T., Kafa, I.M., Cansev, M., Bekar, A., Karli, N., Taskapilioglu, M.O., Kanar, F. (2014). Investigation of the Dose-Dependency of Citicoline Effects on Nerve Regeneration and Functional Recovery in a Rat Model of Sciatic Nerve Injury. *Turkish Neurosurgery.* 24; 62-54.
- Levin, L.A., & Peeples, P. (2008). History of Neuroprotection and Rationale as a Therapy for Glaucoma. *Am J Manag Care,* 14:S11-4.
- McKay Hart, T., Brannstrom, M., Wiberg, G., Terenghi. (2002). Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. *Exp. Brain Res.* 142: 308-18.
- Milani, M. (2013) Citicoline as coadjuvant treatment of cognitive impairment in chronic degenerative Central Nervous System diseases and in ischemic stroke: A review of available data. *Online J Med MedSci Res.* 18-13.
- Osbourne, A. (2007). Peripheral Nerve Injury and Repair. *TSMJ.* 8:29-33.
- Ozay, R., Bekar, A., Kocaeli, H., Karli, N., Filiz, G., Ulus, H. (2001). Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surgical neurology.* 68:615-22.
- Parisi, V., Coppola, G., Centofanti, M., Oddone, F., Angrisani, A.M., Ziccardi, L., Ricci, B., Quaranta, L., Manni, G. (2008). Evidence of the neuroprotective role of citicoline in glaucoma patients. *Prog Brain Res.* 173:541-54.
- Saleh, A., Roy Chowdhury, S.K., Smith, D.R., Balakrishnan, S., Tessler, L., Martens, C. et al. (2013). Ciliary neurotrophic factor activates NF-kappa B to enhance mitochondrial bioenergetics and prevent neuropathy in sensory neurons of streptozotocin-induced diabetic rodents. *Neuropharmacology.* 65:65-73.
- Tandrup, T., Woolf, C.J., Coggeshall, R.E. (2000). Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.* 422: 172-80.
- Truini, A., Haanpaa, M., Provitera, V., Biasiotta, A., Stancanelli, A., Caporaso, G. et al. (2015). Differential myelinated and unmyelinated sensory and autonomic skin nerve fiber involvement in patients with ophthalmic postherpetic neuralgia. *Front. Neuroanat.* 9:105.
- Wan, L., Xia, R., Ding, W. (2010). Short-term low-frequency electrical stimulation enhanced remyelination of injured peripheral nerves by inducing the promyelination effect of brain-derived neurotrophic factor on Schwann cell polarization. *J Neurosci Res.* 88: 2578-87.
- Xiao, J., Wong, A.W., Willingham, M.M., Kaasinen, S.K., Hendry, I.A., Howitt, J. et al. (2009). BDNF exerts contrasting effects on peripheral myelination of NGF-dependent and BDNF-dependent DRG neurons. *J Neurosci.* 29:4016-22.
- Xu, P., Rosen, K.M., Hedstrom, K., Rey, O., Guha, S., Hart, C., Corfas, G. (2013). Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in Schwann cells through purinergic signaling and the PKC-PKD pathway. *Glia.* 61:1029-40.
- Lu, Y., Belin, S., He, Z., (2014). Signaling regulations of neuronal regenerative ability, *Curr. Opin. Neurobiol.* 27: 135-142.

- Ziv-Polat, O., Shahar, A., Levy, I., Skaat, H., Neuman, S., Fregnan, F. et al. (2014). The role of neurotrophic factors conjugated to iron oxide nanoparticles in peripheral nerve regeneration: *in vitro* studies. *Biomed Res Int.* 26780
- Hurtado, O., Hernandez-Jimenez, M., Zarruk, J.G., Cuartero, M.I., Ballesteros, I., Camarero, G. et al. (2013). Citicoline (CDP-Choline) increase Sirtuin expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *J. Neurochem.* 126:819-26.