

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH GIẢM ĐAU, KHÁNG VIÊM CÁC PHÂN ĐOẠN TÁCH TỪ NỌC RẮN CẠP NONG ĐỒNG TÂM, TỈNH TIỀN GIANG

● TRẦN VŨ THIÊN

TÓM TẮT:

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về thành phần và hoạt tính sinh học của nọc một số loài rắn. Kết quả cho thấy, nọc rắn có nhiều tác dụng dược lý quan trọng, như tác dụng hạ huyết áp, kháng khuẩn, kháng viêm, giảm đau, chống đông máu, và đặc biệt có tác dụng ngăn cản sự phát triển của tế bào ung thư rất hiệu quả. Nọc rắn thuộc họ rắn hổ Elapidae được ghi nhận có tác động kháng viêm, giảm đau tốt nhờ những toxin tác động lên hệ thống thần kinh. Nghiên cứu này cho thấy, nọc thô và các phân đoạn tách ra từ nọc rắn cạp nong Bungarus fasciatus (họ Elapidae) được thu từ trại rắn Đồng Tâm, tỉnh Tiền Giang đều có tác động giảm đau, kháng viêm tốt ở liều 0,34 mg/kg.

Từ khóa: nọc rắn, Bungarus fasciatus, phân đoạn, hoạt tính giảm đau, hoạt tính kháng viêm.

1. Đặt vấn đề

Nọc rắn là một hỗn hợp các thành phần có hoạt tính sinh học cao, hơn 90% thành phần nọc rắn là các protein và polypeptide có tác dụng dược lý quan trọng như ức chế tập kết tiểu cầu, kháng khuẩn, kháng viêm, giảm đau, điều trị thấp khớp,... Đặc biệt trong thành phần của nọc rắn có chứa chất độc tế bào (cytotoxin), đó là một tiềm năng trong việc điều trị các tế bào ung thư rất hiệu quả. Nhiều nghiên cứu cho thấy nọc rắn hổ (Elapidae) có tác dụng giảm đau do một số chất độc thần kinh như neurotoxin và myotoxin [1].

Rắn cạp nong Bungarus fasciatus thuộc họ rắn hổ (Elapidae), nọc rắn cạp nong được biết đến với tác động cực mạnh lên hệ thần kinh, chúng hoạt hóa các thụ thể dẫn truyền tín hiệu thần kinh (nicotinic acetylcholine loại thần kinh - cơ và loại - 7) gây tê liệt cảm giác đau [2]. Bên cạnh đó, nọc cạp nong còn có tác dụng ức chế các yếu tố trung

gian gây viêm như cytokine hoặc prostaglandin [3].

Tại Việt Nam, tác động giảm đau và kháng viêm của nọc rắn cạp nong phân bố ở miền Bắc (Vĩnh Sơn, tỉnh Vĩnh Phúc) đã được khảo sát trước đây [4]. Tiếp theo những nghiên cứu về nọc rắn cạp nong B. fasciatus, bài báo này đã khảo sát hoạt tính giảm đau, kháng viêm về nọc rắn cạp nong B. fasciatus ở miền Nam (trại rắn Đồng Tâm, tỉnh Tiền Giang) để từ đó phân lập và xác định những protein có hoạt tính giảm đau, kháng viêm tốt nhất ứng dụng trong y dược.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Nọc rắn cạp nong (B. fasciatus) được thu từ trại rắn Đồng Tâm, tỉnh Tiền Giang. Nọc rắn được bảo quản ở -20°C cho đến khi tiến hành nghiên cứu.

Động vật thử nghiệm: Chuột nhắt trắng đực giống Swiss albino, khỏe mạnh, không dị tật, từ 4 -

8 tuần tuổi, trọng lượng từ 18 - 25 g được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách các phân đoạn của nọc rắn bằng phương pháp sắc ký trên cột Superdex HR75

Nọc rắn cạp nong (*B. fasciatus*) được phân tách bằng sắc ký lọc gel trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (Agilent HPLC 1050, USA), đầu dò DAD với cột (1 x 30 cm, gel Superdex HR75 của hãng Pharmacia, Thụy Điển). Cột đã được cân bằng trước trong đệm amoni acetat 0,1 M pH 6,2 (Merck, Đức). Lượng nọc chạy mỗi lần 30 mg, tốc độ rửa cột 0,5 ml/phút. Sự có mặt của protein trong các phân đoạn được xác định bằng mật độ quang tại bước sóng 254 nm.

2.2.2. Khảo sát tác động giảm đau ngoại biên

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 lô:

- Lô chứng gồm 8 chuột: tiêm dưới da dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 0,9%).

- Lô đối chứng gồm 8 chuột: uống dung dịch aspirin, liều 50 mg/kg (Aspegic®, Sanofi Synthelabo, Pháp).

- Các lô thử nghiệm (mỗi lô gồm 8 chuột) được tiêm dưới da dung dịch nọc rắn toàn phần và dung dịch các phân đoạn với liều 0,34 mg/kg, tương đương với 1/10 LD₅₀ của nọc rắn cạp nong Đồng Tâm, Tiền Giang.

Sau khi dùng thuốc 30 phút, tất cả các chuột được tiêm phúc mô dung dịch acid acetic 0,7% (10 ml/kg) (Fuangdong Guanghua Chemical Factory, Trung Quốc). Mỗi chuột được đặt vào một bocal riêng, số lần đau quặn của chuột (chuột hóp bụng và đồng thời đuôi ít nhất một chân sau) được quan sát và ghi nhận trong 5 phút ở các thời điểm 5-10 phút, 20-25 phút và 35-40 phút. So sánh số lần đau quặn của chuột giữa các nhóm trong cùng thời điểm. Sự giảm số lần đau quặn của chuột nhóm thử so với nhóm chứng cho thấy tác động giảm đau ngoại biên của chất thử nghiệm.

2.2.3. Khảo sát tác động giảm đau trung ương

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 lô:

- Lô chứng gồm 8 chuột: tiêm dưới da dung dịch muối sinh lý 0,9%.

- Lô đối chứng gồm 8 chuột: tiêm dưới da dung dịch morphin clorhydrat (Công ty Cổ phần Dược phẩm Trung ương 2) liều 5 mg/kg.

- Các lô thử nghiệm (mỗi lô gồm 8 chuột) được tiêm dưới da dung dịch nọc rắn toàn phần và dung dịch các phân đoạn với liều 0,34 mg/kg.

Chuột được cố định vào lồng (tự chế từ ống tiêm nhựa 50 ml đã bị cắt phần đầu tiêm, nhưng vẫn để phần pitông để chuột bám vào) với đuôi được thả tự do ra ngoài. Đuôi chuột được nhúng vào bocal nước nóng duy trì ở nhiệt độ $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ bằng bếp cách thủy Memmert. Thời gian phản ứng, tính từ lúc nhúng đuôi vào nước đến khi chuột giật mạnh đuôi ra khỏi nước, được ghi nhận bằng đồng hồ bấm giây. Chuột được chọn làm thử nghiệm là chuột có thời gian phản ứng không quá 5 giây. Ghi nhận thời gian phản ứng của chuột trước khi cho dùng thuốc và vào các thời điểm 30, 60, 90, 120 phút sau khi dùng thuốc. Tại mỗi thời điểm, thời gian phản ứng được đo 2 lần liên tiếp và ghi nhận thời gian dài hơn. Lau khô đuôi chuột bằng bông gòn sau mỗi lần đo, nếu chuột không phản ứng sau 10 giây thì nhấc chuột ra để tránh bỏng đuôi chuột. So sánh thời gian xuất hiện phản ứng giật mạnh đuôi chuột giữa các nhóm, sự kéo dài thời gian phản ứng của nhóm thử so với nhóm chứng cho thấy tác động giảm đau trung ương của chất thử nghiệm.

2.2.4. Khảo sát tác động kháng viêm

Chuột được gây viêm bằng cách tiêm vào gan bàn chân trái 0,04 ml dung dịch carrageenan 1% (Sigma Aldrich) pha trong dung dịch muối sinh lý. Đo thể tích chân chuột sau khi gây viêm 3 giờ bằng máy đo Plethymometer model 7140, do công ty Ugo Basile sản xuất. Chuột có thể tích chân sưng phù nằm trong khoảng 60 - 100% so với bình thường được đưa vào thử nghiệm và chia ngẫu nhiên vào các lô:

- Lô chứng gồm 8 chuột: tiêm dưới da dung dịch muối sinh lý 0,9%.

- Lô đối chứng gồm 8 chuột: uống dung dịch diclofenac, liều 5 mg/kg (Voltaren®, Novartis).

- Các lô thử nghiệm (mỗi lô gồm 8 chuột): tiêm dưới da các dung dịch nọc rắn cạp nong toàn phần và dung dịch các phân đoạn nọc liều 0,34 mg/kg.

Các bocal đựng chuột đều có vĩ lưới đỡ cách ly nhằm hạn chế gây ra những tổn thương, nhiễm trùng khi chân chuột tiếp xúc với trấu lót ở đáy bocal. Theo dõi thể tích phù chân sau khi dùng thuốc 30 phút mỗi ngày vào một giờ nhất định trong 6 ngày liên tiếp.

2.2.5. Phân tích thống kê kết quả

Các số liệu được trình bày ở dạng số trung bình $\pm$ SEM (standard error of mean - sai số chuẩn của số trung bình). Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phương pháp Kruskal - Wallis sau đó là Mann

- Whitney test với phần mềm Minitab 15.0, $p < 0,05$ được cho là có ý nghĩa thống kê. Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm SigmaPlot 12.0.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách các phân đoạn của nọc rắn bằng phương pháp sắc ký trên cột Superdex HR75

Nọc rắn toàn phần được phân tách bằng sắc ký lọc gel trên cột Superdex HR75. Kết quả cho thấy nọc toàn phần tách ra làm 5 phân đoạn (Bảng 1, Hình 1), trong đó phân đoạn 3 có khối lượng lớn nhất, chiếm 44,3% tổng khối lượng nọc thu được. Tiếp theo là phân đoạn 4 cũng chiếm khối lượng đáng kể trong nọc cạp nong Tiền Giang (30,17%). Các phân đoạn này được thu lại, đông khô và dùng để khảo sát tác động giảm đau, kháng viêm của chúng lên chuột.

Bảng 1. Khối lượng các phân đoạn nọc cạp nong Đồng Tâm, tỉnh Tiền Giang

Phân đoạn	Khối lượng (mg)	Tỉ lệ phần trăm khối lượng từng phân đoạn (%)
1	23,20	4,21
2	81,80	14,84
3	244,20	44,30
4	166,30	30,17
5	35,70	6,48
Tổng khối lượng	551,20	100

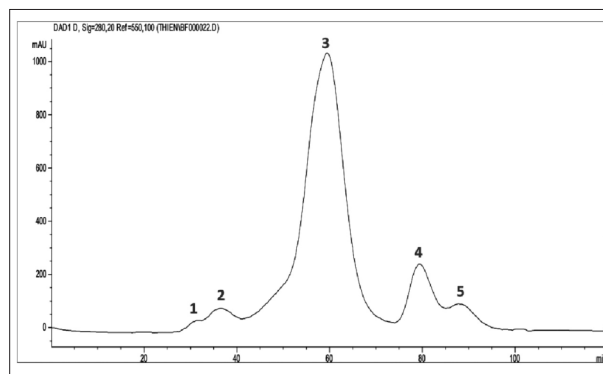
3.2. Tác động giảm đau ngoại biên

Quá trình thử nghiệm cho thấy (Bảng 2, Hình 2):

- Các phân đoạn nọc rắn cạp nong Đồng Tâm liều 0,34 mg/kg đều có tác dụng giảm đau ngoại biên tốt hơn so với nhóm chứng. Đặc biệt, phân đoạn 1 liều 0,34 mg/kg có tác dụng giảm đau ngoại biên tốt nhất, kể đến là phân đoạn 3 và đều mang ý nghĩa thống kê.

- So với nhóm đối chứng: Hoạt tính giảm đau ngoại biên của phân đoạn 1 liều 0,34 mg/kg tốt hơn thuốc đối chứng Aspirin liều 50,0 mg/kg và mang tính thống kê ở tất cả các khoảng thời gian khảo sát. Hoạt tính của phân đoạn 1 là mạnh nhất so với các phân đoạn còn lại, kể sau phân đoạn 1 là phân đoạn 3.

Hình 1: Sắc ký đồ nọc rắn cạp nong Đồng Tâm, tỉnh Tiền Giang



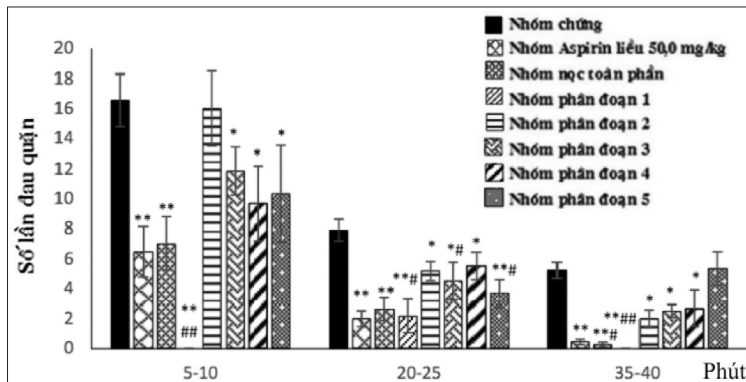
Bảng 2. Số lần đau quận của chuột vào các thời điểm khảo sát ở liều 0,34 mg/kg

Mẫu	Thời gian khảo sát (phút)		
	5 – 10	20 – 25	35 – 40
	Số lần đau quận		
Nhóm chứng (nước muối sinh lý)	16,56 ± 1,76	7,89 ± 0,72	5,22 ± 0,55
Nhóm đối chứng (Aspirin 50,0 mg/kg)	6,44 ± 1,68**	2,00 ± 0,53**	0,44 ± 0,18**
Nọc thô	7,00 ± 1,78**	2,63 ± 0,75**	0,25 ± 0,16**#
Phân đoạn 1	0,00 ± 0,00***##	2,17 ± 1,11**#	0,00 ± 0,00 ***##
Phân đoạn 2	16,00 ± 2,50	5,17 ± 0,65*	2,00 ± 0,58*
Phân đoạn 3	11,83 ± 1,60*	4,50 ± 1,26*#	2,50 ± 0,43*
Phân đoạn 4	9,67 ± 2,51*	5,50 ± 0,92*	2,67 ± 1,20*
Phân đoạn 5	10,33 ± 3,22*	3,67 ± 0,92**#	5,33 ± 1,12

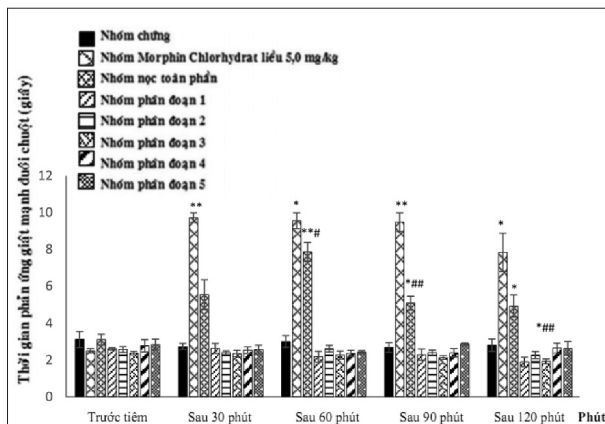
(*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng.
(#) $p < 0,05$, (##) $p < 0,01$ có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng.

Hình 2: Số lần đau quận của các lô chuột ở các thời điểm khảo sát

Hình 2: Số lần đau quặn của các lô chuột ở các thời điểm khảo sát



Hình 3: Thời gian phản ứng giật đuôi chuột (giây) ở các lô vào các thời điểm khảo sát



Bảng 3. Thời gian phản ứng giật mạnh đuôi chuột (giây) ở các thời điểm với liều 0,34 mg/kg

Mẫu	Thời gian khảo sát (phút)				
	Trước tiêm	30	60	90	120
	Thời gian phản ứng giật mạnh đuôi chuột (giây)				
Nhóm chứng (nước muối sinh lý)	3,11 ± 0,29	2,74 ± 0,16	3,01 ± 0,31	2,68 ± 0,27	2,81 ± 0,34
Nhóm đối chứng (Morphin 5,0 mg/kg)	2,50 ± 0,12	9,74 ± 0,26**	9,57 ± 0,43**	9,49 ± 0,51**	7,85 ± 1,04**
Nọc thô	3,11 ± 0,30	5,56 ± 0,80	7,88 ± 0,51**#	5,09 ± 0,38*##	4,94 ± 0,60*
Phân đoạn 1	2,61 ± 0,06	2,63 ± 0,27	2,18 ± 0,29	2,29 ± 0,31	1,90 ± 0,25
Phân đoạn 2	2,57 ± 0,16	2,40 ± 0,10	2,62 ± 0,18	2,40 ± 0,14	2,27 ± 0,19
Phân đoạn 3	2,37 ± 0,09	2,35 ± 0,18	2,27 ± 0,22	2,13 ± 0,10	1,93 ± 0,13*##
Phân đoạn 4	2,77 ± 0,33	2,54 ± 0,18	2,36 ± 0,17	2,39 ± 0,23	2,65 ± 0,27
Phân đoạn 5	2,84 ± 0,29	2,56 ± 0,25	2,43 ± 0,08	2,87 ± 0,07	2,63 ± 0,38

(*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng.

(#) $p < 0,05$, (##) $p < 0,01$ có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng.

Hình 3: Thời gian phản ứng giật đuôi chuột (giây) ở các lô vào các thời điểm khảo sát

3.3. Tác động giảm đau trung ương

Trước thử nghiệm: tiềm thời giật mạnh đuôi của chuột ở tất cả các lô khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Lô morphin liều 5 mg/kg có tác dụng giảm đau, làm tăng thời gian phản ứng giật đuôi có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p < 0,01$) từ 30 phút kéo dài đến 120 phút. Chuột ở các lô nọc toàn phần và các phân đoạn có tiềm thời giật mạnh đuôi khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với lô chứng (Bảng 3, Hình 3). Như vậy, nọc toàn và các phân đoạn ở liều 0,34mg/kg chưa thể

hiện tác động giảm đau trung ương.

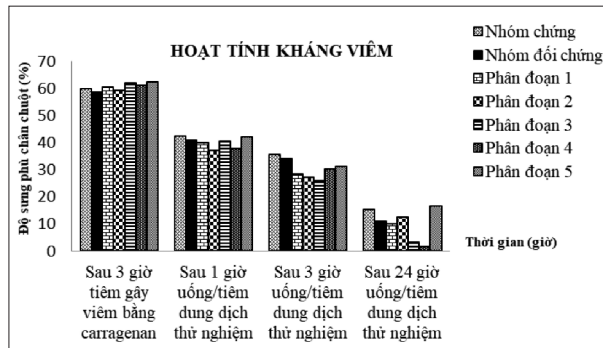
3.4. Tác động kháng viêm

Kết quả khảo sát cho thấy (Bảng 4, Hình 4):

Qua các giai đoạn điều trị bằng các phân đoạn nọc cạp nồng với liều 0,34 mg/kg trên mô hình gây viêm bằng dung dịch carrageenan 1%, kết quả cho thấy các phân đoạn nọc cạp nồng đều có tác dụng làm giảm độ sưng phù chân chuột, trong đó đặc biệt là:

Phân đoạn 4 cho thấy tác dụng kháng viêm tốt nhất trong 5 phân đoạn cùng liều. Độ sưng phù chân chuột giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng qua các khoảng thời gian khảo sát. Đặc biệt, độ sưng phù chân chuột giảm tốt hơn và mang ý nghĩa thống kê so với nhóm thuốc đối chứng

Hình 4: Độ phù chân chuột (%) của lô chứng, đối chứng, nọc toàn phần và các phân đoạn



Bảng 4. Độ sưng phù chân chuột (%) trong các giai đoạn khảo sát kháng viêm

Mẫu	Độ sưng phù chân chuột (%)			
	Sau 3 giờ tiêm gây viêm carragenan	Sau 1 giờ uống/tiêm dung dịch thử nghiệm	Sau 3 giờ uống/tiêm dung dịch thử nghiệm	Sau 24 giờ uống/tiêm dung dịch thử nghiệm
Nhóm chứng (nước muối sinh lý)	59,89 ± 2,36	42,71 ± 3,22	35,68 ± 3,90	15,40 ± 4,08
Nhóm đối chứng (Voltaren 5,0 mg/kg)	58,73 ± 3,88	40,90 ± 3,36	34,27 ± 5,72	11,17 ± 3,70
Phân đoạn 1	60,57 ± 1,36	40,17 ± 4,09	28,59 ± 4,84	10,27 ± 2,69
Phân đoạn 2	59,54 ± 2,02	37,41 ± 3,89	27,35 ± 4,64	12,73 ± 3,30
Phân đoạn 3	62,24 ± 2,10	40,79 ± 6,27	25,99 ± 4,91	3,29 ± 1,40*
Phân đoạn 4	61,41 ± 4,47	37,93 ± 7,42	30,40 ± 6,75	1,60 ± 0,85**#
Phân đoạn 5	62,47 ± 2,29	42,22 ± 5,24	31,21 ± 5,14	16,71 ± 4,16

(*): p -value < 0,05, (**): p -value < 0,01 sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng
 (#): p -value < 0,05, (##): p -value < 0,01 sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng.

Hình 4: Độ phù chân chuột (%) của lô chứng, đối chứng, nọc toàn phần và các phân đoạn

Voltaren liều 5,0 mg/kg sau 24 giờ điều trị.

Phân đoạn 3 có tác dụng kháng viêm rõ rệt sau 24 giờ điều trị.

nhất trong 5 phân đoạn cùng liều và tốt hơn so với thuốc đối chứng Voltaren liều 5,0 mg/kg sau 24 giờ điều trị ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Dufton, M and R Hider (1988). Structure and pharmacology of elapid cytotoxin. *Pharmacology & therapeutics*, 36, 1-40.
2. Susmita Ghosh, Partha Pratim Saha, Subir C Dasgupta et al. (2016). Antinociceptive, anti-inflammatory and antiarthritic activities of Bungarus fasciatus venom in experimental animal models. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54, 569-576.
3. Chunhua Xu, Dongying Ma et al. (2007). A bactericidal homodimeric phospholipases A2 from Bungarus fasciatus venom. *Peptide*, 28, 969-973.

4. Trần Vũ Thiên, Trần Thụy Trúc Vy, Nguyễn Thị Thùy Trang và cộng sự (2017). Tách và khảo sát hoạt tính giảm đau của một số polypeptid từ nọc rắn cạp nong Bungarus fasciatus phân bố ở Vĩnh Phúc. *Tạp chí Hóa học*, 55(5E34), 186-190.

Ngày nhận bài: 5/1/2022

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 22/1/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/2/2022

Thông tin tác giả:

TS. TRẦN VŨ THIÊN

Bộ môn Hóa - Sinh, Trường Đại học Trà Vinh

ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF ISOLATED FRACTIONS FROM BUNGARUS FASCIATUS VENOM DISTRIBUTED AT DONG TAM - TIEN GIANG

● **PhD. TRAN VU THIEN**

Department of Chemistry - Biology
Tra Vinh University

ABSTRACT:

There are many studies on the components and biological activities of the venom of some snake species.

The results show that, snake venom has many important pharmacological effects such as hypotensive, antibacterial, anti-inflammatory, analgesic, anticoagulant, and especially it has the effect of preventing the growth of cancer cells very effectively. The venoms of snakes from Elapidae family have been reported to induce anti - nociception and anti-inflammation through their toxins acting on the nervous system. In this study, it was found that crude venom and fractions isolated from the venom of Bungarus fasciatus (Elapidae) collected from Dong Tam - Tien Giang had good analgesic and anti-inflammatory effects at dose 0,34 mg/kg.

Keywords: snake venom, Bungarus fasciatus, fraction, analgesic effect, anti-inflammatory effect.