

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



LÝ HẢI TRIỀU

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG VÀ CƠ CHẾ
HẠ GLUCOSE HUYẾT CỦA HẠT CHUỐI
CÔ ĐƠN (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman)
TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

LÝ HẢI TRIỀU

**NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG VÀ CƠ CHẾ
HẠ GLUCOSE HUYẾT CỦA HẠT CHUỐI
CÔ ĐƠN (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman)
TRÊN THỰC NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LÝ - DƯỢC LÂM SÀNG

MÃ SỐ: 972.02.05

Người hướng dẫn khoa học: TS. Lê Văn Minh

PGS. TS. Nguyễn Thị Thu Hương

HÀ NỘI, NĂM 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Lý Hải Triều, nghiên cứu sinh chuyên ngành Dược lý-Dược lâm sàng của Viện Dược liệu, xin cam đoan:

1. Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Lê Văn Minh và PGS.TS. Nguyễn Thị Thu Hương.
 2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
 3. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là chính xác, trung thực và khách quan.
- Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước Pháp luật về những cam kết này.

Tác giả luận án

NCS. Lý Hải Triều

LỜI CẢM ƠN

Bằng tất cả tấm lòng mình, tôi xin chân thành gửi lời cảm ơn...

Con cảm ơn và biết ơn gia đình đã tạo động lực và là hậu phương vững chắc để con theo đuổi đam mê của mình.

Em xin gửi lời tri ân sâu sắc đến TS. Lê Văn Minh, Giám đốc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh và PGS. TS Nguyễn Thị Thu Hương, Trưởng bộ môn Dược lý-Dược lâm sàng, Khoa Dược, Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng, là những người thầy đã tạo điều kiện cho em có được môi trường làm việc tốt, tận tâm hướng dẫn, truyền đạt kinh nghiệm, dành nhiều thời gian và công sức hỗ trợ để em hoàn thành tốt luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban giám đốc Viện Dược liệu và Ban giám đốc Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện để tôi có thể học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến các đồng nghiệp tại Phòng Dược lý-Sinh hóa, Hóa-Chế phẩm, Tài nguyên và Phát triển Dược liệu, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh luôn tạo điều kiện và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến ThS. Lâm Bích Thảo, ThS. Lê Đức Thanh, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh, nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Đỗ Thị Hồng Tươi, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, nhóm nghiên cứu của GS. Keon Wook Kang và GS. Won Keun Oh, Đại học Quốc gia Seoul, Hàn Quốc đã hỗ trợ và tạo điều kiện cho tôi thực hiện một số thí nghiệm.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Phòng Khoa học và Đào tạo, cùng các phòng ban có liên quan của Viện Dược liệu; Phòng Đào tạo Đại học và Sau Đại học, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Tôi cũng xin cảm ơn một phần nguồn kinh phí từ đề tài Khoa học và Công nghệ cấp tỉnh Ninh Thuận “Nghiên cứu nhân giống và phát triển các sản phẩm từ hạt Chuối cô đơn tỉnh Ninh Thuận” của chủ nhiệm đề tài: ThS. Lý Hải Triều.

Qua thời gian học tập và thực hiện luận án đã để lại trong tôi rất nhiều cảm xúc, khoảng thời gian này mặc dù tôi rất áp lực, mệt mỏi nhưng với sự quyết tâm và nỗ lực của bản thân, tôi cũng đã hoàn thành quá trình học tập và luận án, tôi không chỉ có thêm nhiều kiến thức mà còn những kinh nghiệm sống quý báu.

Nghiên cứu sinh – Lý Hải Triều

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Tổng quan về chi <i>Ensete</i>	3
1.1.1. Phân loại khoa học, phân bố và đặc điểm thực vật.....	3
1.1.2. Công dụng và bộ phận dùng	5
1.1.3. Thành phần hóa học	5
1.1.4. Tác dụng sinh học	7
1.2. Tổng quan về bệnh đái tháo đường tuýp 2	11
1.2.1. Khái niệm và phân loại bệnh đái tháo đường	11
1.2.2. Cơ chế bệnh sinh của bệnh đái tháo đường tuýp 2	11
1.3. Đích tác dụng của các thuốc điều trị đái tháo đường	18
1.3.1. Giảm hoặc chậm hấp thu glucid	18
1.3.2. Tăng tiết insulin của tế bào β tụy.....	20
1.3.3. Giảm đề kháng insulin	22
1.3.4. Một số mục tiêu tác động khác	24
1.4. Một số mô hình thực nghiệm trong nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết	25
1.4.1. Một số mô hình thực nghiệm <i>in vitro</i> và <i>ex vivo</i>	25
1.4.2. Một số mô hình thực nghiệm <i>in vivo</i>	28
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.1. Nguyên vật liệu	37
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	37
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu	38
2.2. Nội dung nghiên cứu	42
2.3. Phương pháp nghiên cứu	43

2.3.1.	Thực nghiệm dung nạp glucose đường uống.....	43
2.3.2.	Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol trên chuột nhắt trắng gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin	45
2.3.3.	Thực nghiệm ức chế α -amylase <i>in vitro</i>	53
2.3.4.	Thực nghiệm ức chế α -glucosidase <i>in vitro</i>	54
2.3.5.	Thực nghiệm ức chế hấp thu glucose tại ruột non <i>ex vivo</i>	56
2.3.6.	Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin và bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy trên mô hình tiểu đảo tụy <i>in vitro</i>	59
2.3.7.	Thực nghiệm ức chế PTP1B <i>in vitro</i>	66
2.3.8.	Xử lý số liệu.....	67
2.4.	Địa điểm nghiên cứu	67
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU		68
3.1.	Tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm	68
3.1.1.	Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột bình thường	68
3.1.2.	Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin.....	69
3.1.3.	Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin	71
3.1.4.	Tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin	73
3.2.	Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm	81
3.2.1.	Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn	81

3.2.2. Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của một số hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn	99
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	106
4.1. Tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm	106
4.1.1. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống.....	106
4.1.2. Mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ và tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn	108
4.1.3. Tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận trong tình trạng tăng glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn	112
4.2. Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm	116
4.2.1. Tác dụng làm giảm hay chậm hấp thu glucid của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn.....	117
4.2.2. Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn.....	121
4.2.3. Tác dụng bảo vệ tế bào β tụy của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn	127
4.2.4. Tác dụng làm tăng độ nhạy cảm với insulin của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn.....	135
4.3. Bàn luận chung về tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn	140
4.4. Đóng góp mới của luận án.....	144
KẾT LUẬN	145
KIẾN NGHỊ.....	147
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIỀN SĨ DƯỢC HỌC	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Giải nghĩa
1	ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	Muối diammoni 2,2'-Azino-bis(acid 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic)
2	AC	Adenylate cyclase	Adenylat cyclase
3	ACC	Acetyl-CoA carboxylase	Acetyl-CoA carboxylase
4	ADP	Adenosine diphosphate	Adenosin diphosphat
5	AGEs	Advanced glycation end-products	Các sản phẩm glycat hóa bền vững
6	AKT	Serine/threonine-protein kinase	Serin/threonin-protein kinase
7	ALP	Alkaline phosphatase	Alkaline phosphatase
8	ALT	Alanine transaminase	Alanin transaminase
9	AMPK	AMP-activated protein kinase	Kinase protein được hoạt hóa bởi AMP
10	AST	Aspartate transaminase	Aspartat transaminase
11	ATP	Adenosine triphosphate	Adenosin triphosphat
12	AUC	Area under curve	Diện tích dưới đường cong
13	Bax	Bcl-2-associated X protein	Protein X liên kết với Bcl-2
14	Bcl-2	B-cell lymphoma-2	U lympho tế bào B-2
15	BSA	Bovine serum albumin	Albumin huyết thanh bò
16	BUN	Blood urea nitrogen	Lượng nitơ ure trong máu
17	cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyclic adenosin monophosphat
18	CAT	Catalase	Catalase
19	CD	Conjugated dienes	Các dien liên hợp
20	DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxid
21	DNSA	3,5-dinitrosalicylic acid	Acid 3,5-dinitrosalicylic

22	DPP-4	Dipeptidyl peptidase 4	Dipeptidyl peptidase 4
23	DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
24	ĐTĐ	Diabetes mellitus	Đái tháo đường
25	EC ₅₀	Half maximal effective concentration	Nồng độ hiệu quả tối đa một nửa
26	ER	Endoplasmic reticulum	Mạng lưới nội chất nhám
27	ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Kinase được quy định bởi tín hiệu ngoài bào
28	FFA	Free fatty acid	Acid béo tự do
29	FRAP	Ferric reducing antioxidant power	Năng lực chống oxy hóa khử sắt
30	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase
31	GFAT	Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase	Glutamin fructose-6-phosphat amidotransferase
32	GGT	Gamma-glutamyltransferase	Gamma-glutamyltransferase
33	GIP	Glucose-dependent insulintropic peptide	Peptid hướng insulin phụ thuộc glucose
34	GLP-1	Glucagon like peptide 1	Peptid 1 giống glucagon
35	GLUT	Glucose transporter	Chất vận chuyển glucose
36	GLUT	Glucose transporter	Chất vận chuyển glucose
37	GPx	Glutathione peroxidase	Glutathion peroxidase
38	GR	Glutathione reductase	Glutathion reductase
39	GSH	Glutathione	Glutathion
40	GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion	Tiết insulin được kích thích bởi glucose
41	GSK-3	Glycogen synthase kinase-3	Glycogen synthase kinase-3

42	H&E	Hematoxylin & Eosin	Hematoxylin & Eosin
43	HOMA- β	Homeostasis model assessment of β -cell function	Đánh giá mô hình cân bằng nội môi của chức năng tế bào β
44	HP	Hydroperoxide	Hydroperoxid
45	i.p.	Intraperitoneal	Phúc mạc
46	i.v.	Intravenous	Tĩnh mạch
47	IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối đa một nửa
48	IKK β	I κ B kinase β	I κ B kinase β
49	IL-	Interleukin-	Interleukin-
50	IR	Insulin receptor	Thụ thể insulin
51	IRS-1	Insulin receptor substrate-1	Cơ chất thụ thể insulin-1
52	JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
53	K _{ATP}	ATP-sensitive potassium channel	Kênh kali nhạy cảm ATP
54	MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Kinase protein được hoạt hóa bởi mitogen
55	MDA	Malondialdehyde	Malondialdehyd
56	MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
57	NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nicotinamid adenin dinucleotid
58	NF- κ B	Nuclear factor κ B	Nhân tố phiên mã κ B
59	NO	Nitric oxide	Oxid nitric
60	OGTT	Oral glucose tolerance test	Thử nghiệm dung nạp glucose đường uống
61	p.o.	Per os, by way of mouth	Bằng đường miệng
62	P _{app}	Apparent permeability	Tính thấm biểu kiến

63	PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase	Poly (ADP-ribose) polymerase
64	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	Phosphoinositid 3-kinase
65	PKA	Protein kinase A	Protein kinase A
66	PKC	Protein kinase C	Protein kinase C
67	<i>p</i> NPG	<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranosid
68	<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate	<i>p</i> -nitrophenyl phosphat
69	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	Thụ thể hoạt hóa yếu tố tăng sinh peroxisom
70	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Phosphatase and tensin homolog
71	PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B	Protein tyrosin phosphatase 1B
72	ROS	Reactive oxygen species	Các gốc oxy hoạt động
73	RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
74	s.c.	Subcutaneous	Dưới da
75	SGLT	Sodium/glucose cotransporter	Chất đồng vận chuyển natri/glucose
76	SHIP2	Src Homology 2 (SH2) domain containing inositol 5-phosphatase-2	Miền tương đồng Src 2 (SH2) chứa inositol 5-phosphatase-2
77	SIRT-1	Surtuin-1	Surtuin-1
78	SOD	Superoxide dismutase	Superoxid dismutase
79	STZ	Streptozotocin	Streptozotocin
80	TCA	Tricarboxylic acid	Acid tricarboxylic
81	TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha	Yếu tố hoại tử khối u alpha
82	VEGF	Vascular endothelial growth factor	Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của các loài chi <i>Ensete</i>	5
Bảng 1.2. Ưu điểm và hạn chế của một số loại mô hình ĐTĐ.....	34
Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu	38
Bảng 3.1. Tác dụng của cao chiết ethanol trên glucose huyết bằng thực nghiệm OGTT trên chuột bình thường.....	68
Bảng 3.2. Tác dụng của cao chiết ethanol sau 7 ngày uống trên khả năng dung nạp glucose của chuột tăng glucose huyết bởi STZ	71
Bảng 3.3. Tác dụng ức chế α -amylase của cao chiết ethanol.....	81
Bảng 3.4. Tác dụng ức chế α -glucosidase của cao chiết ethanol	81
Bảng 3.5. Tác dụng ức chế α -glucosidase của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn	100
Bảng 3.6. Tác dụng ức chế PTP1B của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn	105

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh cây chuối cô đơn (<i>Ensete glaucum</i> (Roxb.) Cheesman).....	4
Hình 1.2. Cơ chế phân tử có thể gây ra biến chứng ĐTĐ	13
Hình 1.3. Sự tăng ROS và suy giảm GSH do sự kết hợp của glucose và FFA	16
Hình 1.4. Sự vận chuyển glucose sau ăn ở tế bào ruột người khỏe mạnh và béo phì/ĐTĐ	19
Hình 1.5. Điều hoà tiết insulin ở tế bào β tụy.....	20
Hình 1.6. Tác dụng hoạt hóa AMPK của metformin	23
Hình 1.7. Cơ chế gây ĐTĐ của STZ	29
Hình 1.8. Sự hình thành ROS thông qua chu trình oxy hóa khử alloxan.....	31
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	42
Hình 2.2. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột bình thường	44
Hình 2.3. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol trên mô hình chuột nhất gây tăng glucose huyết bởi STZ	46
Hình 2.4. Phản ứng tạo phức giữa MDA và TBA.....	48
Hình 2.5. Sơ đồ định lượng MDA	49
Hình 2.6. Phản ứng tạo phức giữa GSH và DTNB	50
Hình 2.7. Sơ đồ định lượng GSH	50
Hình 2.8. Phản ứng tạo màu giữa đường và DNSA	53
Hình 2.9. Sơ đồ thử nghiệm ức chế α -amylase	53
Hình 2.10. Phản ứng thủy phân PNPG bởi α -glucosidase	54
Hình 2.11. Sơ đồ thử nghiệm ức chế α -glucosidase.....	55
Hình 2.12. Hình ảnh trong quá trình thí nghiệm	58
Hình 2.13. Phản ứng tạo tinh thể formazan.....	62
Hình 2.14. Sơ đồ thử nghiệm MTT	62
Hình 2.15. Sơ đồ thử nghiệm GSIS.....	64
Hình 2.16. Sơ đồ thử nghiệm đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tiết insulin trên mô hình gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ	65
Hình 2.17. Phản ứng khử nhóm phosphat của pNPP bởi phosphatase	66

Hình 2.18. Quy trình thử nghiệm ức chế PTP1B	67
Hình 3.1. AUC nồng độ glucose trong máu sau 120 phút của chuột bình thường uống cao chiết ethanol trong thực nghiệm OGTT	69
Hình 3.2. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ.....	70
Hình 3.3. AUC nồng độ glucose trong máu sau 120 phút của các lô chuột trong thực nghiệm OGTT trên mô hình chuột tăng glucose huyết bởi STZ.....	72
Hình 3.4. Tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ thông qua đánh giá các chỉ số enzym gan.....	73
Hình 3.5. Hình ảnh vi thể đại diện mô học gan vùng khoảng cửa sau 7 ngày điều trị với cao chiết ethanol trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ (H&E, 200×).....	75
Hình 3.6. Tác động của cao chiết ethanol trên các chỉ số MDA, GSH, TNF- α và IL-6 trong dịch đồng thể gan sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ	76
Hình 3.7. Tác dụng cải thiện tổn thương thận của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ thông qua đánh giá chỉ số creatinin và BUN	77
Hình 3.8. Hình ảnh vi thể đại diện mô học vùng vỏ thận sau 7 ngày điều trị với cao chiết hạt chuối cô đơn trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ (H&E, 200×)	79
Hình 3.9. Tác động của cao chiết ethanol trên các chỉ số MDA, GSH, TNF- α và IL-6 trong dịch đồng thể thận sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ	80
Hình 3.10. Tác dụng ức chế hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập <i>ex vivo</i> của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn	82
Hình 3.11. Tác dụng làm tăng tiết insulin của cao chiết ethanol trong thử nghiệm kích thích tế bào β tiểu đảo tụy bằng glucose.....	84
Hình 3.12. Tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin của cao chiết ethanol trong thực nghiệm gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ.....	85
Hình 3.13. Tác dụng cải thiện nồng độ insulin huyết và chức năng tế bào β của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ	86
Hình 3.14. Tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy của cao chiết ethanol trong thực nghiệm gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ.....	87

Hình 3.15. Tác động của cao chiết ethanol lên sự biểu hiện của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu apoptosis trong thực nghiệm gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ	88
Hình 3.16. Tác dụng cải thiện cấu trúc đảo tụy của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ.....	90
Hình 3.17. Tác động của cao chiết ethanol lên mức độ biểu hiện tương đối của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu apoptosis ở mô tụy chuột tăng glucose huyết bởi STZ sau 7 ngày điều trị	92
Hình 3.18. Tác động của cao chiết ethanol lên mức độ biểu hiện tương đối của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu MAPK và NF- κ B ở mô tụy chuột tăng glucose huyết bởi STZ sau 7 ngày điều trị	94
Hình 3.19. Tác dụng cải thiện tổn thương oxy hóa tế bào tụy của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ	96
Hình 3.20. Tác dụng cải thiện tổn thương tụy do viêm của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ	97
Hình 3.21. Tác dụng ức chế PTP1B <i>in vitro</i> của cao chiết ethanol.....	98
Hình 3.22. Tác động của cao chiết ethanol lên sự biểu hiện của p-AMPK ở mô gan chuột tăng glucose huyết bởi STZ sau 7 ngày điều trị	99
Hình 3.23. Tác dụng làm tăng tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn trong thử nghiệm kích thích tế bào β tiểu đảo tụy bằng glucose.....	101
Hình 3.24. Tác dụng kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn trong thực nghiệm gây tổn thương đảo tụy bằng STZ	103
Hình 3.25. Tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn trong thực nghiệm gây tổn thương đảo tụy bằng STZ	104
Hình 4.1. Minh họa cơ chế giải phóng insulin của afzelechin và coniferaldehyd thông qua việc ức chế kênh K_{ATP}	126
Hình 4.2. Cơ chế đề xuất tác dụng bảo vệ tế bào β tụy do STZ và/hoặc tăng glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn	133
Hình 4.3. Cơ chế đề xuất liên quan đến tác dụng làm tăng nhạy cảm với insulin của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn.....	139
Hình 4.4. Tổng hợp các cơ chế tác động góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn (<i>Ensete glaucum</i> (Roxb.) Cheesman)	140

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một bệnh rối loạn chuyển hóa đặc trưng bởi tình trạng tăng glucose huyết mạn tính với nhiều biến chứng nguy hiểm. Trong đó, bệnh ĐTĐ tuýp 2 chiếm hơn 90% số người mắc bệnh ĐTĐ, đang có xu hướng trẻ hoá và tỷ lệ mắc bệnh ngày càng tăng trên toàn thế giới và tại Việt Nam. Theo báo cáo của Liên đoàn ĐTĐ thế giới (IDF), số người mắc bệnh ĐTĐ ở độ tuổi từ 20 đến 79 vào năm 2021 khoảng 537 triệu người và dự đoán sẽ tăng lên 783 triệu người vào năm 2045, có khoảng 541 triệu người suy giảm khả năng dung nạp glucose (tiền ĐTĐ) vào năm 2021 [1]. Mặc dù liệu pháp insulin và/hoặc thuốc điều trị ĐTĐ đường uống được sử dụng đơn trị hay phối hợp mang lại những hiệu quả nhất định cho bệnh nhân ĐTĐ nhưng vẫn có một số hạn chế như tác dụng phụ, rào cản trong sử dụng insulin và sự tuân thủ điều trị khi phối hợp nhiều thuốc. Do đó, nghiên cứu các liệu pháp mới bổ sung hay thay thế giúp kiểm soát nồng độ glucose huyết và ngăn ngừa hiệu quả tiến triển các biến chứng đang rất được quan tâm. Trong đó, dược liệu là một đối tượng tiềm năng có thể tạo ra đa tác động giúp kiểm soát nồng độ glucose huyết như kích thích tổng hợp và tiết insulin, bảo vệ tụy; cải thiện độ nhạy với insulin; ức chế hấp thu carbohydrat ở ruột,... và các tác động bảo vệ các cơ quan như gan, thận, thần kinh, tim mạch,... do sự tồn tại đa dạng các hợp chất chuyển hóa thứ cấp [2]. Chính vì vậy, dược liệu trở thành đối tượng ngày càng được chú ý với đặc điểm nổi bật là ngăn chặn chuyển từ giai đoạn tiền ĐTĐ thành ĐTĐ và ngăn ngừa sự tiến triển của các biến chứng.

Chuối cô đơn có tên khoa học là *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman, phân bố phổ biến ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới châu Á và châu Phi. Ở Việt Nam, chuối cô đơn phân bố ở nhiều nơi nhưng được phát hiện nhiều ở tỉnh Ninh Thuận và được đưa vào danh mục dược liệu được tập trung phát triển của tỉnh. Chuối cô đơn là một loài chuối đặc biệt, có hạt lớn, bụi chuối chỉ có một cây duy nhất, không đẻ thêm nhánh, sinh sản bằng hạt và sau khi quả chín vàng thì cây tự héo rũ dần rồi chết đi. Do đó, người dân thường dùng quả hay hạt chuối vì cho rằng các chất dinh dưỡng và hoạt chất tập trung nhiều. Theo kinh nghiệm dân gian, quả hay hạt chuối cô đơn được ngâm với rượu hoặc sắc với nước, uống chữa sỏi tiết niệu, sỏi thận, sỏi bàng quang, đái tháo đường, đau nhức xương khớp, tiểu gắt,

phù nề, dị ứng da, táo bón, mụn nhọt [3],[4]. Tuy nhiên, chưa có bằng chứng khoa học của những tác dụng này. Báo cáo trước đây (2022) cho thấy chưa có thông tin về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của loài *E. glaucum* [5]. Kết quả khảo sát ban đầu của nhóm nghiên cứu cho thấy một số cao chiết từ vỏ quả, thịt quả và hạt chuối cô đơn đều có chứa polyphenol và flavonoid; trong đó, cao chiết ethanol được chiết bằng phương pháp chiết nóng từ hạt chuối cô đơn thu tại Ninh Thuận có hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng cao hơn các cao chiết từ các bộ phận còn lại. Cao chiết từ các bộ phận này cũng có tác dụng kháng oxy hóa và ức chế α -glucosidase; trong đó, cao chiết ethanol được chiết bằng phương pháp chiết nóng từ hạt chuối cô đơn được thu tại Ninh Thuận vẫn là cao chiết có các tác dụng này cao hơn cao chiết từ hạt, vỏ quả và thịt quả được thu tại Bình Phước [6-8]. Bên cạnh đó, công bố trước đây cũng cho thấy cao chiết từ hạt của một loài cùng chi là *E. superbum* có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt [9]. Tất cả những điều này cho thấy tiềm năng làm giảm hoặc chậm hấp thu glucid trên đường tiêu hóa của hạt *Ensete* nói chung và hạt *E. glaucum* nói riêng. Chính vì vậy, luận án tiếp cận nghiên cứu tác dụng dược lý của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn thu tại Ninh Thuận được chiết bằng phương pháp chiết nóng theo hướng hạ glucose huyết trong hỗ trợ điều trị ĐTĐ. Các kết quả nghiên cứu của đề tài không chỉ cung cấp bằng chứng khoa học của việc sử dụng hạt chuối cô đơn trong chữa ĐTĐ theo kinh nghiệm dân gian mà còn là cơ sở để định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai.

Đề tài luận án “**Nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman) trên thực nghiệm**” được thực hiện với 2 mục tiêu sau:

1. Đánh giá tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm.
2. Xác định cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về chi *Ensete*

1.1.1. Phân loại khoa học, phân bố và đặc điểm thực vật

Phân loại khoa học: Giới: Thực vật (Plantae) – Ngành: Thực vật hạt kín (Angiosperms) – Lớp: Thực vật một lá mầm (Monocots) – Bộ: Gừng (Zingiberales) – Họ: Chuối (Musaceae) – Chi: *Ensete* [3],[10].

Hiện nay, có 3 chi bao gồm *Ensete* (bảy loài), *Musa* (Khoảng 70 loài) và *Musella* (Một loài) thuộc họ Chuối (Musaceae) trong bộ Zingiberales [3],[10].

Phân bố: *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman (Chuối tuyết, chuối cô đơn, chuối mô côi, chuối chân voi, chuối hoa sen): Ấn Độ, Trung Quốc (Vân Nam), Miến Điện, Thái Lan, Lào, Việt Nam, Philippin, Papua New Guinea và quần đảo Solomon. *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman (Chuối đá, chuối vách đá): Ấn Độ, Thái Lan, Việt Nam. *Ensete lecongkietii* Luu, N.L.Vu & Q.D.Nguyen (Chuối chân voi): Việt Nam, Thái Lan. *Ensete homblei* (Bequaert ex De Wild.) Cheesman: Congo, Zambia. *Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman (Chuối Abyssinian, chuối giả): Vùng Trung, Đông và Nam Phi, Ethiopia,... *Ensete livingstonianum* (J.Kirk) Cheesman: Angola, Trung Phi, Nigeria,... *Ensete perrieri* (Claverie) Cheesman (Chuối Madagascar): Madagascar [3],[10].

Đặc điểm thực vật: *Ensete* thường to hơn chuối nhà (*Musa*), chiều cao khoảng 12 m (chuối nhà khoảng 3-5 m) và đường kính hơn 1 m. Thân củ khi trưởng thành dài khoảng 1,8 m và chu vi 2,5 m. Ở chuối nhà, các chồi mới được tạo ra từ các chồi có sẵn trong thân/thân rễ, trong khi ở *Ensete*, các chồi được tạo ra sau khi làm tổn thương mô phân sinh và thân thật xuất hiện qua bẹ lá sau khi trưởng thành và vào cuối vòng đời (2-12 năm), đỉnh thân tạo ra nhiều hoa, quả và hạt. Quá trình trưởng thành của chuối trông diễn ra vào khoảng 9-14 tháng, sau đó là sự hình thành thân thật, nhiều hoa và quả không có hạt. Tuy nhiên, *Ensete* ra hoa sau 2-12 năm sinh trưởng, quả có kích thước nhỏ, có hạt và hiếm khi ăn được. Thời gian thu hoạch của các loài *Ensete* là khác nhau và trong khoảng từ 2-12 năm. Thông thường, *Ensete* được nhân giống bằng hạt nhưng cũng được nhân giống thực vật thông qua chồi non. *Ensete* là cây lưỡng bội có số nhiễm sắc thể $2n=2x=18$ trong khi chuối *Musa* là cây tam bội, có $2n=3x=33$ [10],[11].

Tại Việt Nam, chi *Ensete* có 3 loài bao gồm *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman, *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman và *Ensete leconkietii* Luu, N.L.Vu & Q.D.Nguyen [3]. Trong đó, loài *E. glaucum* được quan tâm phát triển, đặc biệt ở tỉnh Ninh Thuận.



Hình 1.1. Hình ảnh cây chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman)

a. Toàn cây; b: cụm hoa; c: buồng quả; d: hạt. Hình ảnh được chụp bởi nhóm nghiên cứu

Chuối cô đơn có thân giả hình nón, thân giả trưởng thành cao khoảng 1-1,5 m. Chu vi gốc khoảng 0,8-1,5 m, bẹ lá xanh mướt bao bọc bên ngoài, không bị khô, sần sùi. Lá phát triển đến giữa hoặc rũ xuống; sắp xếp thành chùm tận cùng ở đỉnh của thân giả. Lá có màu xanh lục hoặc xanh lục hơi vàng; diện tích lá khoảng $150-210 \times 40-60$ cm; gốc lá đối xứng, hình mác, đỉnh nhọn. Cuống lá dài khoảng 35-65 cm, màu xanh lục hoặc vàng lục. Cụm hoa rũ xuống, chiều dài khoảng 35-90 cm, màu xanh lục, có vân và hình vòng cung. Lá bắc bao quanh (khoảng 5-7); hình trứng hoặc tròn; dai, dài khoảng $25-40 \times 14-19$ cm; phía trục màu xanh lục nhạt, mặt dưới màu xanh lục. Khoảng 13-22 hoa trên một lá bắc xếp thành hai hàng, dài 6,8-7,5 cm. Chùm quả nhỏ gọn, có 5-14 nải và 13-22 quả mỗi nải, xếp thành hai hàng, gần như vuông góc với cuống. Quả thẳng, hơi gồ lên, cùi xanh, hơi sần sùi, khi chín có màu vàng, quả dài khoảng 7,4-8,2 cm. Quả có nhiều hạt, khoảng 7-21 hạt trên một quả. Mỗi hạt có kích thước khoảng $1-1,3 \times 0,8-1,2$ cm; tròn đều hoặc không đều; màu đen ngoại trừ vùng rón và bề mặt nhẵn [12].

1.1.2. Công dụng và bộ phận dùng

Trong y học dân gian ở Châu Á và Châu Phi, sử dụng các bộ phận khác nhau của một số loài trong chi *Ensete* để chữa một số chứng khác nhau ở người và vật nuôi, đặc biệt là gia súc [3]. Loài *E. glaucum* được sử dụng chữa các bệnh đường hô hấp (hen suyễn, khô khè) (thân giả, lá), bệnh đường tiêu hóa (loét dạ dày, kiết lỵ, tiêu chảy, táo bón) (hoa, toàn cây), bệnh đường tiết niệu (sỏi thận, sỏi tiết niệu, khó tiểu), đái tháo đường, đau nhức xương khớp (hạt) [3],[4]. Loài *E. superbum* được sử dụng tương tự loài *E. glaucum* bên cạnh giúp nâng tử cung, ngừa thai, dễ sinh nở, sản xuất tinh dịch, giảm suy nhược, bệnh bạch cầu (rễ, lá, hạt, thân, hoa, quả) [3],[13],[14]. Loài *E. ventricosum* được sử dụng chữa gãy xương, chữa vết thương, vết loét, bệnh về gan, sỏi thận, đau dạ dày, đau bụng kinh, kích thích tiết sữa, kích thích chuyển dạ, giúp thả nhau thai (toàn cây, lá, quả) [3],[15],[16]. Loài *E. livingstonianum* được sử dụng chữa đau dạ dày, tiêu chảy, kiết lỵ, viêm phổi, thương hàn, sỏi thận và rối loạn gan (toàn cây) [17],[18]. Trong khi đó, công dụng dân gian của loài *E. lecongkietii*, *E. homblei* và *E. perrieri* chưa rõ ràng.

1.1.3. Thành phần hóa học

Một số thành phần hóa học của chi *Ensete* được trình bày trong bảng 2.1. Công bố trước đây (2022) cho thấy *E. glaucum* là loài chưa có thông tin về thành phần hóa học [5]. *E. superbum* là loài được nghiên cứu về thành phần hóa học tương đối nhiều hơn so với các loài khác trong chi *Ensete*. Các công bố về thành phần hóa học của các loài bao gồm *E. lecongkietii*, *E. homblei* và *E. perrieri* chưa được tìm thấy.

Bảng 1.1. Thành phần hóa học của các loài chi *Ensete*

STT	Loài	Bộ phận	Thành phần hóa học	Tài liệu tham khảo
1	<i>E. glaucum</i>	Hạt	Polyphenol, flavonoid, saponin, tannin	[6],[7]
		Vỏ quả	Flavonoid, terpenoid, acid amin	[7]
		Thịt quả	Flavonoid, tannin, saponin, acid amin	[7]

STT	Loài	Bộ phận	Thành phần hóa học	Tài liệu tham khảo
		Thân	Polyphenol, flavonoid, alkaloid, acid amin, glycosid tim, đường khử, tinh bột, saponin, tannin, terpenoid, chất béo	[19],[20]
2	<i>E. superbum</i>	Hạt	Phenol, alkaloid, glycosid, steroid và đường	[21]
			Eugenol, acid <i>n</i> -hexadecanoic, 9-eicosyn, acid 3-decanynoic, 1-tetradecyn, 7-methyl-Z-tetradecen-1-ol acetat, 1-hexadecyn, Z-(13,14-epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetat, acid octadecanoic, tridecanedial, acid cis-13-eicosenoic	[22]
			Phenolic: Acid gallic, acid caffeic, acid ferulic	
			Flavonoid: Rutin, quercetin.	
			4-(4-hydroxy-3-methyl-hex-5-enyl)-chroman-2,7-diol	[23]
			Acid phytic, pelargonidin (Anthocyanidin)	[24]
		Thân	Alkaloid, sterol, tannin, flavonoid, protein và đường	[25]
			Alkaloid β -carbolin	[24]
		Lá	Alkaloid, saponin, tannin, phenol, glycosid	[26]
		Rễ	Alkaloid, saponin, tannin, glycosid, acid amin	[26]
			2-hydroxy-9-phenylphenalenon, 2-hydroxy-9-(4-hydroxyphenyl)-phenalen-1-on, 8-hydroxy-7-methoxy-6-phenylphenalen-1-on	[24]
		Củ	Alkaloid, saponin, tannin, phenol, flavonoid, glycosid, steroid, acid amin	[26]
		Lá bắc	Delphinidin-3- rutinosid, cyanidin-3- rutinosid (Anthocyanidin)	[24]
3	<i>E. lecongkietii</i>	Chưa tìm thấy thông tin		

STT	Loài	Bộ phận	Thành phần hóa học	Tài liệu tham khảo
4	<i>E. homblei</i>	Chưa tìm thấy thông tin		
5	<i>E. ventricosum</i>	Củ	Alkaloid, flavonoid, steroid, quinon, saponin, tannin, glycosid	[27],[28]
		Thân rễ, rễ	Phenylphenalenon	[29]
6	<i>E. livingstonianum</i>	Thân rễ	Alkaloid, acid carboxylic, flavonoid, phenolic, đường khử, tannin, terpernoid	[30]
		Hạt	Alkaloid, flavonoid, phenol, steroid, tannin	[18]
7	<i>E. perrieri</i>	Chưa tìm thấy thông tin		

1.1.4. Tác dụng sinh học

Mặc dù các loài *Ensete* được sử dụng trong dân gian để hỗ trợ chữa một số bệnh khác nhau nhưng chưa có nhiều bằng chứng khoa học chứng minh. Công bố trước đây (2022) cũng cho thấy *E. glaucum* là loài chưa có thông tin về tác dụng sinh học [5]. *E. superbum* là loài được nghiên cứu về tác dụng sinh học tương đối nhiều hơn so với các loài khác trong chi *Ensete*. Các công bố về tác dụng sinh học của các loài *E. lecongkietii*, *E. homblei* và *E. perrieri* chưa được tìm thấy.

1.1.4.1. Các tác dụng liên quan đến đái tháo đường

Tác dụng hạ glucose huyết và cải thiện rối loạn chức năng thận:

Cao chiết ethanol từ hạt loài *E. superbum* có tác dụng cải thiện rối loạn chức năng thận trên mô hình chuột gây ĐTĐ bằng streptozotocin (STZ) liều 40 mg/kg. Cao chiết liều 400 mg/kg sau 60 ngày uống làm giảm đáng kể tổn thương thận, nồng độ glucose, HbA1c, urea, BUN (blood urea nitrogen), creatinin, acid uric, tăng đáng kể protein tổng số và albumin trong máu so với lô bệnh lý. Cao chiết có tác dụng điều chỉnh các chỉ dấu chống stress oxy hóa trong dịch đồng thể mô thận như tăng SOD, CAT, GPx, GR và GSH; giảm MDA, HP (Hydroperoxid) và CD (conjugated dienes) [31].

Tác dụng ức chế enzym tiêu hóa carbohydrat và kháng oxy hóa:

Cao chiết ethanol 70% bằng phương pháp ngâm dầm của hạt, thịt quả và vỏ quả loài *E. glaucum* có tác dụng ức chế α -glucosidase với IC₅₀ tương ứng là 5,71, 110,33 và 91,23

$\mu\text{g/ml}$; các cao chiết có hoạt tính kháng oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} tương ứng là 9,55, >100, >100 $\mu\text{g/ml}$; các cao chiết thể hiện tổng năng lực khử với giá trị EC_{50} tương ứng là 0,86; 1,81 và 1,75 mg/ml [8].

Cao chiết ethanol 70% từ phần thân dưới của cây *E. glaucum* bằng phương pháp chiết siêu âm có hoạt tính kháng oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH với IC_{50} là 420,6 $\mu\text{g/ml}$, ức chế α -amylase và α -glucosidase với IC_{50} tương ứng là 16,42 và 91,90 $\mu\text{g/ml}$ [20].

Các cao chiết hạt *E. glaucum* có hoạt tính ức chế xanthin oxidase và kháng oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH, ABTS và tổng năng lực khử. Trong đó, cao chiết ethanol 96% chiết nóng có hoạt tính ức chế xanthin oxidase, DPPH, ABTS và tổng năng lực khử với $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}$ tương ứng là 76,41; 8,64; 10,47 và 27,03 $\mu\text{g/ml}$ [6].

Các cao chiết methanol, ethanol, nước acid từ lá bắc, vỏ quả, hạt và hoa loài *E. superbum* có hoạt tính kháng oxy hóa với cao chiết nước lá bắc có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (IC_{50} là 21,97 $\mu\text{g/ml}$), khả năng hấp thu gốc oxy (207,97 μM đương lượng trolox TE/g) và hoạt tính chống oxy hóa (67,02 μM đương lượng quercetin QE/g) trên tế bào Caco2 tốt hơn [32].

Cao chiết methanol từ hạt *E. superbum* có hoạt tính bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC_{50} là $6,2 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$, tổng năng lực khử của cao chiết tương đương rutin. Cao chiết có hoạt tính ức chế α -glucosidase rất mạnh với giá trị IC_{50} là $1,8 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$. Cao chiết có khả năng bảo vệ tế bào β người $1.4\text{E}7$ khi tế bào tiếp xúc với H_2O_2 ở nồng độ 5 mmol/l [9].

Quả *E. superbum* được xử lý hấp quả và chiết bằng acetone 70% có hoạt tính kháng oxy hóa tăng thông qua thử nghiệm DPPH, ABTS và FRAP, tăng khả năng bắt gốc tự do anion superoxid, gốc tự do hydroxy và hoạt tính peroxid hóa acid β -caroten linoleic [33].

1.1.4.2. Một số tác dụng khác

Tác dụng kháng ung thư đại trực tràng và kháng viêm đại tràng:

Cao chiết nước acid (HCl 0,1%) từ vỏ quả chín loài *E. superbum* có tác dụng kháng ung thư đại trực tràng thông qua khả năng gây độc tế bào HCT-15 và Caco2, kháng viêm (IC_{50} là 0,49 $\mu\text{g/ml}$), chống đột biến. Rutin, acid syringic và apigenin trong cao vỏ quả là những hợp chất có tác dụng gây chết tế bào thông qua đo điện thế màng ty thể, nhuộm màu kép (acridin cam/ethidium bromid), phân mảnh DNA và stress oxy hóa (ROS) [34].

Phân đoạn 1,4-dioxan từ cao chiết nước acid vỏ quả loài *E. superbum* được bổ sung vào nước cam (liều 500 mg/kg) giúp cải thiện tình trạng viêm đại tràng trên mô hình chuột gây viêm loét đại tràng bằng acid 2,4,6-trinitrobenzensulfonic đưa vào lòng đại tràng bằng đường hậu môn. Tác dụng của phân đoạn được thể hiện chủ yếu thông qua cơ chế điều chỉnh stress oxy hóa (tăng SOD, CAT, GPx, GR, GSH và giảm MDA) và các thông số viêm (giảm NF- κ B p65, TNF- α , IL-6 và IL-1 β) trong mô đại tràng [35].

Tác dụng kháng sỏi tiết niệu:

Cao chiết chloroform từ thân giả có tác dụng chống sỏi tiết niệu trên mô hình chuột cống gây sỏi niệu bằng ethylen glycol 0,75%. Sau 28 ngày uống, cao chiết liều 200 và 400 mg/kg làm giảm đáng kể nồng độ calci, creatinin, acid uric trong máu và nước tiểu cũng như cải thiện tổn thương mô thận so với lô chứng bệnh lý [36].

Cao chiết nước từ hạt có tác dụng ức chế sự kết tập và phát triển của tinh thể calci hydro phosphat dihydrat *in vitro*, cho thấy hạt có tiềm năng ngăn ngừa sỏi tiết niệu [37].

Tác dụng ngừa thai:

Cao chiết ethanol từ hạt *E. superbum* ở nồng độ 100 mg/ml gây ra sự bất động hoàn toàn tinh trùng người và tiêu diệt 100% tinh trùng *in vitro* cho thấy cao chiết như một biện pháp tránh thai âm đạo hiệu quả [38].

Hoạt tính ngừa thai của hợp chất 4-(4-hydroxy-3-methyl-hex-5-enyl)-chroman-2,7-diol từ hạt *E. superbum* được chứng minh thông qua việc ức chế rụng trứng ở mô hình chuột chưa trưởng thành được tiêm gonadotropin vào ngày rụng trứng với các tác động như làm giảm nồng độ estrogen và progesteron buồng trứng, giảm nồng độ TNF- α , VEGF, IL-6 và IL-1 β , chưa làm vỡ các nang trứng tiền rụng trứng [39].

Tác dụng bảo vệ gan, thận:

Cao chiết methanol 80% từ phần củ loài *E. ventricosum* ở liều 200 và 400 mg/kg sau 30 ngày uống có tác dụng bảo vệ gan và thận trên mô hình chuột gây tổn thương gan và thận bằng isoniazid (75 mg/kg) và rifampicin (150 mg/kg) thông qua giảm nồng độ AST, ALT, ALP, tổng bilirubin, creatinin và BUN; tăng albumin, protein trong máu và cải thiện cấu trúc mô học gan và thận [27],[40]. Cao chiết từ phần thân và củ có hoạt tính kháng oxy hóa thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH và năng lực khử [41].

Tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm:

Cao chiết ethanol 70% từ thân *E. livingstonianum* có khả năng kháng *Escherichia coli* (MIC~ 120 mg/cm³), *Bacillus subtilis* (MIC~ 80 mg/cm³), *Salmonella typhi* (MIC~ 80 mg/cm³), *Shigella dysenteria* (MIC~120 mg/cm³) [30]. Cao chiết ethyl acetat và ethanol từ hạt *E. livingstonianum* có khả năng bắt gốc tự do DPPH và kháng *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida glabrata*, *Candida krusen* và *Candida albicans* [18].

Như vậy, từ các thông tin tổng quan cho thấy các báo cáo về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chi *Ensete* còn tương đối ít; các kết quả nghiên cứu tác dụng còn ở mức cơ bản, chưa đi sâu xác định cơ chế tác động. Do đó, nghiên cứu thêm về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của các loài trong chi này sẽ góp phần xây dựng được cơ sở dữ liệu khoa học cho chi này. Tại Việt Nam, loài chuối cô đơn (*E. glaucum*) được phát hiện nhiều ở tỉnh Ninh Thuận và là một trong số các dược liệu được tập trung phát triển của tỉnh. Mặc dù các bộ phận của cây chuối cô đơn được sử dụng trong y học dân gian để hỗ trợ chữa một số bệnh khác nhau nhưng chưa có các bằng chứng khoa học [5]. Trong đó, hạt được sử dụng để chữa đái tháo đường. Hơn nữa, các đánh giá sàng lọc sơ bộ ban đầu cho thấy cao chiết từ hạt chuối cô đơn tại tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam có hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế α -glucosidase *in vitro* tốt hơn các cao chiết từ các bộ phận khác [6],[8],[20]. Mặt khác, sàng lọc về thành phần hóa học cho thấy hạt chuối cô đơn có thành phần chính là polyphenol và flavonoid, những nhóm chất này đã được báo cáo có nhiều tác động có thể góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn như ức chế enzym tiêu hóa carbohydrat, ức chế enzym tổng hợp glucose và thoái hóa glycogen, giảm đề kháng insulin, ức chế hấp thu glucose qua ruột, kích thích tiết insulin, bảo vệ tụy, chống viêm, chống stress oxy hóa,... [42],[43],[44],[45]. Tất cả những điều này cho thấy hạt chuối cô đơn có thể là đối tượng tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu thêm các tác động theo hướng chống đái tháo đường, góp phần cung cấp các thông tin hỗ trợ cho việc sử dụng đối tượng này trong y học dân gian. Chính vì vậy, luận án tiến hành nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn.

1.2. Tổng quan về bệnh đái tháo đường tuýp 2

1.2.1. Khái niệm và phân loại bệnh đái tháo đường

Bệnh đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh rối loạn chuyển hóa không đồng nhất, có đặc điểm tăng glucose huyết do khiếm khuyết về tiết insulin, về tác động của insulin, hoặc cả hai. Tăng glucose huyết mạn tính trong thời gian dài gây nên những rối loạn chuyển hóa carbohydrat, protid, lipid, gây tổn thương nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt ở tim và mạch máu, thận, mắt, thần kinh [46].

Bệnh ĐTĐ có thể phân loại như sau [47]:

- ĐTĐ tuýp 1: do sự phá hủy tế bào β tụy bởi tự miễn dịch, thường dẫn đến thiếu hụt insulin tuyệt đối, bao gồm cả bệnh ĐTĐ tự miễn tiềm ẩn ở tuổi trưởng thành;
- ĐTĐ tuýp 2: do sự suy giảm chức năng của tế bào β tiến triển trên nền tảng đề kháng insulin và hội chứng chuyển hóa;
- ĐTĐ thai kỳ: bệnh được chẩn đoán trong 3 tháng giữa hoặc 3 tháng cuối của thai kỳ và không có bằng chứng về ĐTĐ tuýp 1, tuýp 2 trước khi mang thai;
- Thể chuyên biệt của ĐTĐ do các nguyên nhân khác như hội chứng ĐTĐ đơn gen (như ĐTĐ sơ sinh và ĐTĐ khởi phát ở người trẻ), các bệnh về tuyến tụy ngoại tiết (như xơ nang và viêm tụy) và ĐTĐ do thuốc hoặc hóa chất (như sử dụng glucocorticoid, điều trị HIV/AIDS hoặc sau khi ghép tạng).

1.2.2. Cơ chế bệnh sinh của bệnh đái tháo đường tuýp 2

ĐTĐ tuýp 2 chiếm khoảng 90-95% các trường hợp ĐTĐ và luận án nghiên cứu liên quan đến ĐTĐ tuýp 2 nên cơ chế bệnh sinh ĐTĐ tuýp 2 được tóm tắt trong luận án.

ĐTĐ tuýp 2 hay ĐTĐ không phụ thuộc insulin, chủ yếu ở người trưởng thành nhưng bệnh đang gia tăng gặp cả ở những người trẻ tuổi, thậm chí ở cả trẻ em. Đối với ĐTĐ tuýp 2, cơ thể vẫn còn sản xuất insulin vì lượng tế bào β tụy vẫn còn (số lượng tế bào β giảm 25-50%) [48], nhưng insulin được sản xuất ra không đủ hoặc các tế bào không hoặc kém nhạy với insulin, được gọi là đề kháng insulin.

Hai yếu tố đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh ĐTĐ tuýp 2 là khiếm khuyết chức năng tế bào β tụy và hiện tượng kháng insulin, hai yếu tố tác động qua lại lẫn nhau. Khi khối lượng tụy giảm (số lượng tế bào β giảm) hoặc có sự suy giảm bài tiết insulin

thì nồng độ glucose huyết sẽ tăng cao và khi nồng độ glucose huyết tăng cao sẽ ức chế hoạt động của insulin. Còn khi hiện tượng kháng insulin xuất hiện trước sẽ làm tăng nồng độ glucose huyết, cơ thể sẽ phản ứng lại bằng cách tiết ra nhiều insulin hơn để làm giảm nồng độ glucose hoặc tăng khối lượng tụy, quá trình này diễn ra lâu dài sẽ dẫn đến sự suy kiệt của tế bào β tụy. Ở bệnh ĐTĐ tuýp 2, bệnh nhân không có sự phá hủy tế bào β do tự miễn, không có tự kháng thể trong máu nhưng có sự thay đổi về chức năng và số lượng tế bào β hoặc cả hai. Mặt khác, đa số bệnh nhân thừa cân hoặc béo phì, nhất là béo phì vùng bụng có liên quan với tăng acid béo trong máu, mô mỡ cũng tiết ra một số hormon làm giảm tác dụng của insulin ở các cơ quan đích như gan, mỡ, cơ [49].

❖ Yếu tố di truyền và môi trường

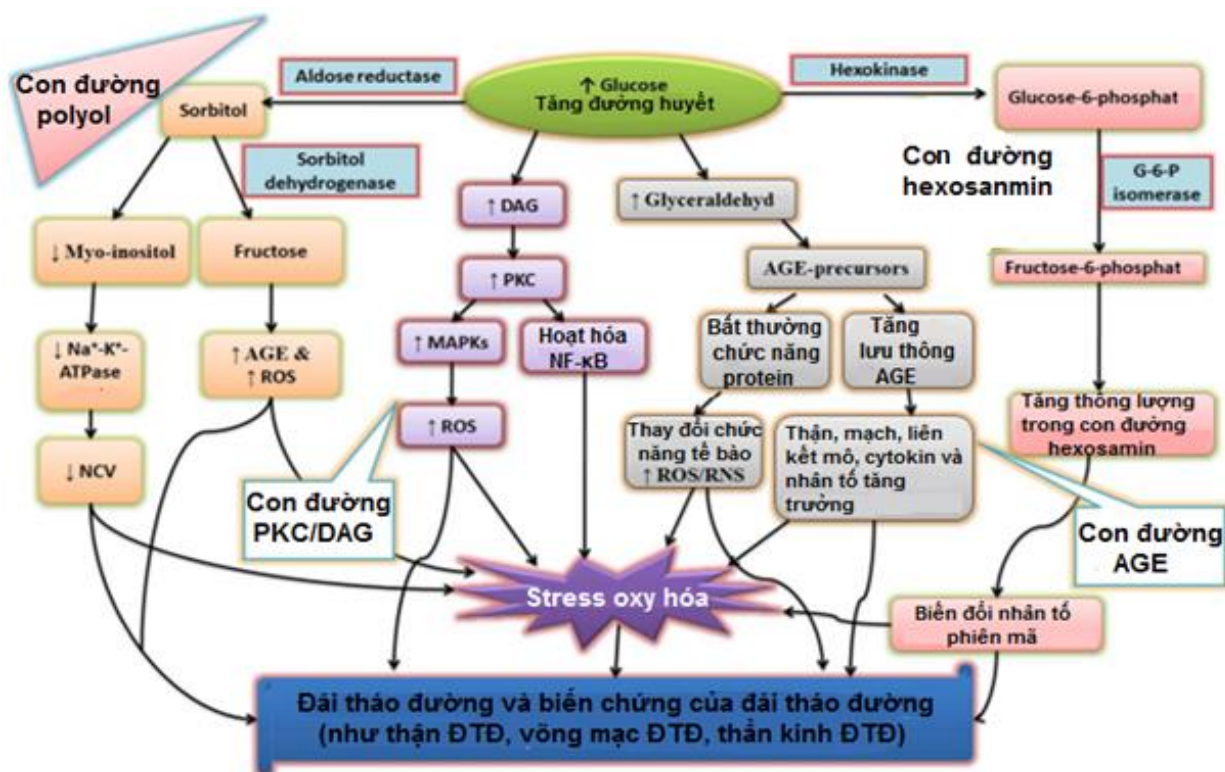
Các yếu tố môi trường đóng vai trò quan trọng như béo phì, ít vận động, cân nặng khi sinh nhỏ hoặc lớn, stress, dinh dưỡng và các độc tố khác. Các gen di truyền nguy cơ của bệnh ĐTĐ tuýp 2 vẫn chưa được xác định chính xác. Bệnh ĐTĐ tuýp 2 được cho là một rối loạn đa gen phát triển do sự tương tác phức tạp giữa nhiều gen và các yếu tố môi trường. Gen nào mang yếu tố quyết định, như thế nào những gen này tương tác với nhau và với môi trường để tạo ra bệnh vẫn còn chưa được hiểu rõ. Khác với ĐTĐ tuýp 1, nguy cơ di truyền chủ yếu tập trung ở vùng HLA, thành phần di truyền nguy cơ của ĐTĐ tuýp 2 không tập trung ở một vùng và dường như là kết quả của sự tương tác của nhiều gen nằm rải rác trên toàn bộ hệ gen. Cho đến nay, rất nhiều gen đã được nghiên cứu có liên quan đến bệnh ĐTĐ tuýp 2 như *CAPN10*, *TCF7L2*, *ABCC8*, *PPARG*, *IRS*, *KCNJ11*, *SCL2A2*, *WFS-1*, *HHEX*, *SCL30A8*...[50].

❖ Suy giảm chức năng và số lượng tế bào β tụy

Có nhiều nguyên nhân dẫn đến suy giảm chức năng và số lượng tế bào β như yếu tố di truyền, glucotoxicity (tạm dịch là ngộ độc glucose, đề cập đến hiện tượng suy giảm chức năng tế bào β trong tình trạng nồng độ glucose tăng cao), lipotoxicity (tạm dịch là ngộ độc lipid, đề cập đến quá trình tích tụ lipid quá mức và kích hoạt quá mức các con đường truyền tín hiệu lipid gây ra tình trạng suy yếu và rối loạn chức năng tế bào, chẳng hạn như tình trạng kháng insulin, rối loạn chức năng ty thể, thiếu năng lượng và căng thẳng lưới nội chất và cuối cùng có thể dẫn đến apoptosis tế bào), giảm tiết GLP-1, tăng apoptosis tế bào,...

Rối loạn glucose và rối loạn lipid máu được cho là có ảnh hưởng đến chức năng và số lượng tế bào β thông qua apoptosis ở bệnh nhân ĐTD tuýp 2. Hai cơ chế được thảo luận nhiều gần đây là ngộ độc glucose, ngộ độc lipid và sự kết hợp của chúng (Glucolipotoxicity, tạm dịch là ngộ độc glucose và lipid, đề cập đến trình trạng suy giảm chức năng và khả năng sống sót của tế bào β tuyến tụy do sự kết hợp của nồng độ glucose cao mãn tính và nồng độ lipid cao dưới dạng acid béo tự do) [51].

- **Độc tính với glucose (Glucotoxicity)**



Hình 1.2. Cơ chế phân tử có thể gây ra biến chứng ĐTD [52]

Khi nồng độ glucose huyết tăng cao và kéo dài dẫn đến tăng stress oxy hóa tế bào thông qua 4 con đường trao đổi chất chính: (1) tăng lượng glucose qua con đường polyol; (2) tăng hình thành các sản phẩm glycat hoá bền vững và thụ thể của chúng (con đường AGE); (3) kích hoạt kinase C (con đường PKC/DAG) và (4) sự hoạt động quá mức của con đường hexosamin (**Hình 1.2**).

Cả 4 con đường này được kích hoạt đều dẫn đến tình trạng stress oxy hóa bởi sự sản sinh quá mức ROS trong ty thể mà bình thường ROS sẽ được khử bởi catalase (CAT),

superoxid dismutase (SOD) và glutathion peroxydase (GSH-Px) nhưng tế bào β lại có rất ít những enzym này, đặc biệt là CAT. Quá tải các gốc tự do sẽ phản ứng với các thành phần tế bào dẫn đến tổn thương tế bào, làm rối loạn chức năng của tế bào β , gây chết tế bào, hình thành bệnh ĐTĐ và tiến triển các biến chứng [52].

Tăng glucose huyết làm tổn thương ty thể bởi ROS: NADH và FADH_2 được sản xuất từ quá trình chuyển hóa acid tricarboxylic (TCA), tại đây chúng cung cấp điện tử cho các phức hợp enzym oxy hóa khử màng ty thể. Các electron được chuyển qua các phức hợp oxidoreductase I, II, III và IV (cytochrom c), cho đến khi chúng nhận oxy phân tử, tạo thành nước. Sự chuyển electron thành các phức I, III và IV bởi NADH (và FADH_2 qua phức II đến phức III) tạo ra một gradient proton ở màng ngoài ty thể, tạo ra sự chênh lệch gradient nồng độ giữa màng ty thể bên trong và màng ty thể bên ngoài, dẫn đến thúc đẩy tổng hợp ATP và điều này rất quan trọng cho khả năng tồn tại, chức năng và sự trao đổi chất bình thường của ty thể. Khi các electron được truyền từ phức II đến phức III thì ROS được sản xuất như sản phẩm phụ. Mức độ ROS được tạo ra trong quá trình phosphoryl hóa oxy hóa bình thường là ít nhất và được giải độc bởi các chất chống oxy hóa như GSH, CAT và SOD. Mặt khác, glucose tăng sẽ dẫn đến tăng chu trình đường phân và TCA, cung cấp một lượng lớn các phân tử cho điện tử NADH và FADH_2 cho tế bào. Điều này tạo ra một gradient proton cao trên màng trong ty thể, làm tăng hoạt động của các phức hệ ban đầu và do đó tạo ra mức tăng các gốc tự do. Tích tụ các gốc tự do nói chung dẫn đến tổn thương DNA ty thể, màng ty thể và toàn bộ tế bào [53]. Đây cũng là một trong những nguyên nhân dẫn đến thay đổi tính thấm màng ty thể và giải phóng các thành phần của ty thể, kích hoạt con đường apoptosis tế bào.

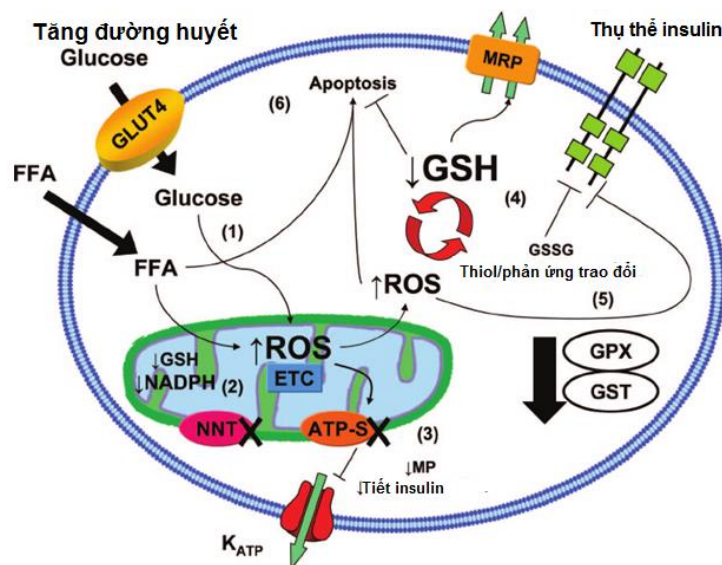
Tăng glucose huyết làm tổn thương mạng lưới nội chất (ER) bởi ROS: ER là một bào quan thực hiện các vai trò sinh học quan trọng bao gồm tổng hợp lipid, tổng hợp protein, sửa đổi sau dịch mã và gấp cuộn chính xác protein để tạo protein có chức năng. Do đó, ER chứa nhiều chaperon phân tử và phân tử gấp cuộn (foldase), nồng độ Ca^{2+} cao cho phép các phân tử này hoạt động. Tuy nhiên, khi quá tải protein cần xử lý so với các phân tử chức năng này gây ra sự tích tụ nhiều protein chưa gấp cuộn hoặc gấp cuộn không chính xác dẫn

đến stress ER, khi đó đáp ứng protein chưa gấp cuộn (UPR- Unfolded Protein Response) của tế bào β được kích hoạt để khôi phục cân bằng nội môi ER. Tuy nhiên, nếu kích hoạt UPR không khôi phục được cân bằng nội môi ER trong điều kiện stress ER kéo dài hoặc cường độ cao thì apoptosis phụ thuộc ty thể (bao gồm thay đổi tính thấm màng ty thể, giải phóng cytochrom c, kích hoạt tăng tín hiệu caspase) sẽ được kích hoạt thông qua các protein pro-apoptotic như CHOP, PUMA và DP5, các protein này ức chế các phân tử chống apoptosis thuộc họ Bcl-2 [54].

- ***Độc tính với glucose và lipid (Glucolipotoxicity)***

Bên cạnh tăng glucose huyết, các nghiên cứu cũng cho thấy các acid béo tự do (FFA) tăng cao góp phần vào cơ chế bệnh sinh ĐTĐ tuýp 2, FFA tăng lên gây ra kháng insulin và rối loạn chức năng tế bào β tụy. Nhiễm cấp tính FFA làm tăng khối lượng tế bào β , tế bào β tăng cường tiết insulin bù đắp cho tình trạng kháng insulin do FFA gây ra. Ngược lại, sự gia tăng FFA kéo dài dẫn đến rối loạn chuyển hoá lipid, giảm tiết insulin do glucose gây ra, làm suy giảm chức năng và khả năng sống của tế bào β . Hơn nữa, tiếp xúc đồng thời với glucose cao sau khi phát triển rối loạn dung nạp glucose gây ra hiệu ứng hiệp đồng độc tính với FFA, làm tăng cường độc tính với glucose. Kết hợp hai yếu tố này dẫn đến suy yếu chức năng và tăng chết tế bào β [55],[56].

Sau khi FFA đi qua màng tế bào thông qua CD36, FFA chuyển hóa tạo ra acyl-CoA tham gia vào chu trình TCA hoặc quá trình tổng hợp sphingolipid tạo ra các chất chuyển hóa như ceramid và sphingosin-1 phosphat [57]. Sự gia tăng quá mức FFA ở tế bào chất làm tăng sự hình thành ceramid và kích hoạt viêm qua NF- κ B. Sự tích tụ ceramid gây apoptosis qua trung gian stress ER; gây apoptosis nội bào thông qua tác động lên ty thể, thay đổi màng ty thể dẫn đến giải phóng cytochrom c, ROS/RNS, hoạt hóa các caspase, tăng ROS cũng làm tăng thêm quá trình tạo ceramid; ceramid ức chế Akt làm ảnh hưởng đến sự truyền tín hiệu insulin nội bào và gây apoptosis tế bào β ; ceramid ức chế sự biểu hiện gen insulin. Kích hoạt NF- κ B làm tăng iNOS và NO cũng gây hoại tử và apoptosis tế bào β . Mức độ gây độc tế bào β của FFA tăng khi nồng độ glucose cao [58],[59].



Hình 1.3. Sự tăng ROS và suy giảm GSH do sự kết hợp của glucose và FFA [60]

Sự kết hợp của glucose cao và FFA cao dẫn đến sự gia tăng ROS và suy giảm GSH gây ra sự phá hủy tế bào β tụy. Tăng glucose và quá trình oxy hóa FFA dẫn đến tăng tạo ra ROS thông qua chuỗi vận chuyển điện tử hô hấp (ETC) (1). Tiếp theo là giảm NADPH và GSH ty thể bởi sự biến đổi hoặc thiếu hụt NNT (Nicotinamid nucleotid transhydrogenase) (2). Điều này dẫn đến tăng tích lũy ROS, làm giảm ATP và tăng cường các kênh K_{ATP} gây ra sự phân cực màng tế bào và ngăn chặn sự tiết insulin (3). ROS được cho là một cơ chế chính làm trung gian gây ra sự suy giảm GSH tế bào (4). Stress oxy hóa và sự suy giảm GSH có thể làm thay đổi tín hiệu insulin thông qua các thiol/phản ứng trao đổi, làm ảnh hưởng độ nhạy của thụ thể insulin (5). Cuối cùng, sự suy giảm GSH, sự gia tăng FFA góp phần vào quá trình apoptosis tế bào β tụy qua trung gian ROS (6) (Hình 1.3) [60].

- **Con đường MAPK và suy giảm chức năng và số lượng tế bào β tụy**

Bên cạnh các tác động đã đề cập, các nghiên cứu cho thấy ROS cũng có thể kích hoạt con đường MAPK gây apoptosis tế bào β tụy. Kích hoạt con đường MAPK có liên quan đến thúc đẩy tình trạng kháng insulin ngoại biên, ức chế sản xuất và bài tiết insulin (rối loạn chức năng tế bào β), đồng thời tăng quá trình apoptosis của các tế bào β đảo tụy [61]. AMPK là một kinase protein serin/threonin và hoạt động như một enzym điều hòa trao đổi chất quan trọng ở sinh vật nhân thực như quá trình chuyển hóa carbohydrat, chất béo và protein, duy trì cân bằng nội môi năng lượng của tế bào. Mối liên hệ chặt chẽ của AMPK với sự khởi phát và tiến triển của bệnh ĐTĐ đã được chứng minh. Các nghiên cứu cho thấy AMPK được kích hoạt sẽ kích

hoạt quá trình apoptosis tế bào β , đồng thời ngăn chặn hoạt động của nó có thể bảo vệ các tế bào β thoát khỏi apoptosis [62]. Liên quan đến con đường MAPK, các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng AMPK được kích hoạt có thể gây chết tế bào β tụy bằng cách kích hoạt tín hiệu p38 MAPK và JNK MAPK. JNK, một thành viên của họ MAPK, đảm nhận chức năng điều tiết quan trọng trong sự tăng sinh, biệt hóa và apoptosis của tế bào. Trong điều kiện không thuận lợi, chẳng hạn như tiếp xúc với hóa chất độc hại hoặc ROS quá mức, mức độ JNK bị phosphoryl hóa tăng lên và JNK di chuyển đến ty thể. Sự di chuyển này làm thay đổi tính thấm của màng ngoài của ty thể, dẫn đến rối loạn chức năng ty thể và điều hòa bất thường các yếu tố gây chết tế bào sau đó, cuối cùng dẫn đến apoptosis tế bào β tụy [63].

❖ Kháng insulin

Kháng insulin là tình trạng giảm hoặc mất tính nhạy cảm của insulin với cơ quan đích. Tình trạng này cũng gián tiếp ảnh hưởng đến chức năng tiết insulin của tế bào β tụy vì tế bào β phải tăng tiết insulin bù trừ hiện tượng kháng insulin. Nguyên nhân dẫn đến hiện tượng kháng insulin có thể do các bất thường trước thụ thể như bất thường insulin hoặc do kháng thể kháng insulin; các khiếm khuyết tại thụ thể như ái lực của insulin với thụ thể. Tuy nhiên, các khiếm khuyết trước hay tại thụ thể thường ít xảy ra hơn. Hiện tượng kháng insulin ở ĐTĐ tuýp 2 chủ yếu là do các bất thường sau thụ thể, ở các con đường truyền tín hiệu nội bào của insulin [64],[65]. Một số yếu tố ức chế con đường truyền tín hiệu nội bào của insulin như: Sự phosphoryl hóa serin/threonin của các protein IR, IRS, PI3K bởi sự tăng biểu hiện của các serin/threonin kinase như PKC, IKK β (IKB kinase β), JNK, giảm phosphoryl hoá tyrosin của các protein này dẫn đến suy giảm tín hiệu kích thích của insulin; dephosphoryl hóa của quá trình phosphoryl hóa tyrosin bởi PTP (protein tyrosin phosphatase). Nghiên cứu cho thấy loại bỏ PTP1B, một PTP tế bào chất, làm tăng quá trình phosphoryl hóa tyrosin của IR và IRS-1, dẫn đến tăng độ nhạy của insulin; SHP2 (protein tyrosine phosphatase-2) gây phosphoryl hoá serin 307 của IRS-1 nên làm giảm phosphoryl hoá tyrosin của protein này; PTEN (Phosphatase and tensin homolog), SHIP (Src homology 2 (SH₂) – containing inositol 5-phosphatase) khử phosphoryl hoá của các phosphoinositol; p85 ức chế tiểu đơn vị điều hoà ngược p85 của PI3K điều hoà ngược hoạt động của PI3K; GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) gây phosphoryl hoá 3 vị trí serin của glycogen synthase, ức chế enzym này ngăn cản tổng hợp glycogen [66-69].

AMPK và kháng insulin: Sau khi được kích hoạt bởi sự phosphoryl hoá threonin 179, AMPK sẽ phosphoryl hóa các phân tử mục tiêu tiếp theo, mục tiêu chính là acetyl-CoA

carboxylase (ACC). AMPK phosphoryl hóa ACC tại Ser79 (một vị trí ức chế), ngăn chặn sự chuyển đổi acetyl-CoA thành malonyl-CoA, cho phép các acyl-CoA đi vào ty thể cho quá trình β oxy hóa. Một số phân tử mục tiêu khác của AMPK bao gồm TSC2, mTORC1, HMG-CoA reductase (ức chế tổng hợp cholesterol), PPAR γ (ức chế phiên mã một số gen). Sự hoạt hóa AMPK kích thích chuyển vị GLUT, hấp thu glucose, quá trình oxy hóa acid béo, ức chế quá trình tổng hợp glucose, cholesterol, acid béo,... Như vậy, các tác động của hoạt hoá AMPK ngoại vi có lợi cho bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2 [70-72].

FFA không chỉ góp phần suy giảm chức năng và chết tế bào β tụy, FFA còn thúc đẩy đề kháng insulin thông qua con đường PKC [73]. Sự đề kháng insulin còn liên quan đến các adipokin từ mô mỡ, adipokin có thể phân làm 2 nhóm bao gồm nhóm các yếu tố kháng insulin (như TNF- α , resistin, IL-6, SAA-serum amyloid A, PAI-Plasminogen activator inhibitor...) và nhóm các yếu tố tăng tính nhạy cảm insulin (như leptin, adiponectin, vaspin, visfatin) [74].

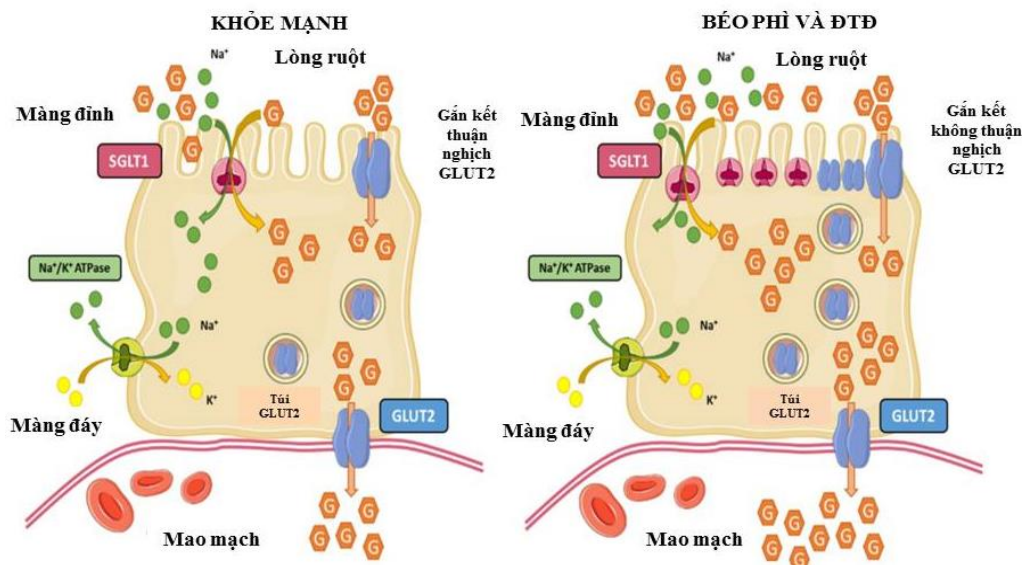
1.3. Đích tác dụng của các thuốc điều trị đái tháo đường

Các thuốc điều trị ĐTĐ hiện nay nhắm vào các mục tiêu khác nhau để tạo ra các tác động như làm chậm sự hấp thu glucid ở ruột, kích thích tế bào β tụy tiết insulin, giảm kháng insulin, giảm sản xuất glucose ở gan, tăng thải trừ glucose ở ống thận,...

1.3.1. Giảm hoặc chậm hấp thu glucid

Sau khi thức ăn có chứa glucid (như tinh bột, glycogen, các disaccharid, các monosaccharid) đến dạ dày, ruột non, thức ăn được nghiền nát, bị phân cắt thành các phân tử nhỏ đơn giản hơn nhờ các enzym có trong ruột. Tinh bột và glycogen được thủy phân nhờ amylase ở tuyến nước bọt và dịch tụy tạo thành các oligosaccharid. Dịch nhầy trong ruột động vật có vú tiết các disaccharidase như α -glucosidase (được hiểu là maltase), lactase, sucrose (trong đó α -glucosidase đóng vai trò quan trọng), các enzym này liên kết với màng nằm trong biểu mô ruột non giúp cho sự hấp thu glucose vào ruột non nhờ phản ứng thủy phân cắt các oligosaccharid thành monosaccharid diễn ra dễ dàng hơn [75]. Các monosaccharid hấp thu tại ruột non theo hai cơ chế là khuếch tán thụ động (arabinose, mannose, fructose) và vận chuyển thuận lợi (glucose, galactose) chủ yếu nhờ protein vận chuyển SGLT1, một protein màng kết hợp hai phân tử Na⁺ với một phân tử glucose. Sự khuếch tán thụ động qua bề mặt đáy của tế bào ruột chứa chất vận chuyển glucose GLUT2 cho phép glucose di chuyển từ tế bào biểu mô ruột vào môi trường ngoại bào gần các mao

mạch máu. Sự chuyển vị của GLUT2 từ túi tế bào chất vào màng các tế bào đỉnh làm tăng khả năng hấp thu glucose của tế bào ruột. Do đó, bất kỳ yếu tố nào ảnh hưởng đến hoạt động của SGLT1 và GLUT2 sẽ làm thay đổi hấp thu glucose [76]. **Hình 1.4** mô tả quá trình vận chuyển glucose sau bữa ăn trong hai trường hợp. Ở tế bào ruột người khỏe mạnh, sau bữa ăn, glucose trong lòng ruột được SGLT1 vận chuyển qua màng đỉnh và Na^+ sau đó được vận chuyển ra ngoài tế bào ruột qua màng đáy bởi Na^+/K^+ -ATPase. Glucose được phosphoryl hóa và dự trữ trong tế bào. Glucose bị khử phosphoryl hóa được GLUT2 vận chuyển thụ động ra khỏi tế bào qua màng đáy. Ngoài ra, để đáp ứng với nồng độ glucose cao trong lòng ruột, một lượng GLUT2 nội bào di chuyển nhanh đến màng đỉnh dẫn đến tăng hấp thu glucose. Ở tế bào ruột người béo phì/ĐTĐ, tình trạng kháng insulin làm mất kiểm soát vận chuyển GLUT2 dẫn đến sự gắn kết không thuận nghịch của GLUT2 trong màng tế bào ruột ở đỉnh và/hoặc màng tế bào ruột nội bào và tăng vận chuyển glucose xuyên biểu mô từ lòng ruột vào hệ tuần hoàn [77]. Sau quá trình này, các monosaccharid qua tĩnh mạch cửa vào gan, tại gan các monosaccharid sẽ được chuyển thành glucose.



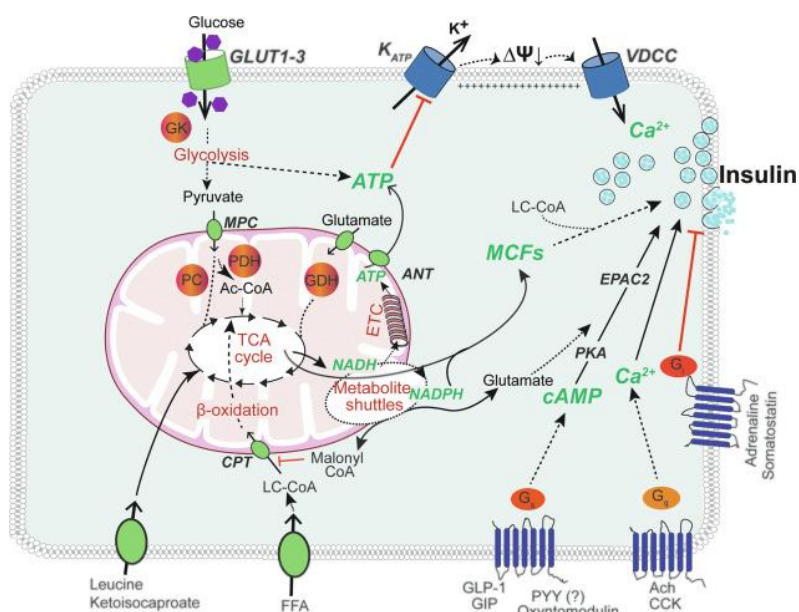
Hình 1.4. Sự vận chuyển glucose sau ăn ở tế bào ruột người khỏe mạnh và béo phì/ĐTĐ [77]

Như vậy, một số đích có thể tiếp cận để làm giảm hoặc chậm quá trình hấp thu các glucid tại đường tiêu hoá giúp kiểm soát glucose huyết sau bữa ăn như ức chế α -amylase, α -glucosidase (thuốc điển hình là acarbose, voglibose, miglitol), ức chế hoạt động SGLT1 (chưa có thuốc điều trị vì chưa có hoạt chất ức chế chọn lọc trên SGLT1 ở ruột). Ngoài ra

còn có colesevelam là thuốc duy nhất trong nhóm resin gắn acid mật được công nhận có hiệu quả trong điều trị, giúp giảm hấp thu glucose hoặc kéo dài sự hấp thu glucose ở ruột.

1.3.2. Tăng tiết insulin của tế bào β tụy

Insulin được tiết từ tế bào β tụy, bình thường insulin máu được duy trì ở nồng độ thấp (5-20% nồng độ insulin sau ăn), tế bào β tụy sẽ tăng tiết insulin để đáp ứng với sự gia tăng nồng độ glucose trong máu. Sự tiết insulin do kích thích bởi glucose liên quan đến nhiều con đường khác nhau như con đường kích hoạt, con đường điều chỉnh bởi chất dẫn truyền thần kinh hay hormon và con đường khuếch đại chuyển hoá (**Hình 1.5**) [78].



Hình 1.5. Điều hoà tiết insulin ở tế bào β tụy [78]

Trong con đường kích hoạt, ATP (được tạo ra bởi quá trình chuyển hóa glucose) và dòng Ca^{2+} là tín hiệu chính. Glucose được hấp thu vào tế bào thông qua kênh vận chuyển glucose không phụ thuộc insulin GLUT2 (SLC2A2 ở loài gặm nhấm) hoặc GLUT1 và GLUT3 (SLC2A1 và SLC2A3 ở người), sau đó được phosphoryl hóa bởi glucokinase thành glucose-6-phosphat tham gia vào quá trình đường phân tạo ATP. Kết quả là tỷ lệ ATP/ADP tăng dẫn đến đóng các kênh K^+ nhạy cảm ATP (K_{ATP}) trên màng tế bào, các ion K^+ không ra ngoài tế bào được làm cho bên trong tế bào tích điện dương gây ra siêu phân cực màng và mở các kênh Ca^{2+} phụ thuộc điện thế dẫn đến sự gia tăng Ca^{2+} tự do trong tế bào giúp các hạt insulin di chuyển đến bề mặt tế bào và kích thích các hạt này giải phóng insulin nhanh chóng khuếch

tán vào các mạch máu gần đó và tham gia vào quá trình điều hòa glucose huyết [78]. Theo cơ chế này, nhóm thuốc sulfonylurea và glinid được sử dụng trong điều trị ĐTĐ. Các thuốc trong nhóm sulfonylurea như chloropamid, tolbutamid, tolazamid (thế hệ 1, rất ít sử dụng), glibenclamid, gliclazid, glipizid (thế hệ 2) và glimepirid (thế hệ 3). Các thuốc trong nhóm glinid như nateglinid và repaglinid, chỉ có repaglinid lưu hành tại Việt Nam.

Sự tiết insulin còn được điều chỉnh bởi các chất dẫn truyền thần kinh và hormon liên kết với thụ thể trên bề mặt tế bào β tụy như acetylcholin (ACh), CCK (Cholecystokinin) tác dụng lên các thụ thể cặp đôi với protein G_q ; GLP-1 (Glucagon-like peptid 1), GIP (Glucose-dependent insulintropic peptid), VIP (Vasoactive intestinal polypeptid), glucagon tác dụng lên protein G_s ; adrenalin và somatostatin tác dụng với protein G_i . Khi GLP-1 liên kết với thụ thể GLP-1 làm kích hoạt AC (Adenylate cyclase) làm tăng cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) từ ATP, dẫn đến tăng PKA và các tín hiệu thông qua các protein trao đổi được kích hoạt trực tiếp với cAMP (Epac) tạo điều kiện phóng thích insulin. ACh tác động kích hoạt các thụ thể muscarinic acetylcholin, hoạt hoá phospholipase C (PLC)/diacylglycerol (DAG)/protein kinase C (PKC) giúp cải thiện tiết insulin do kích thích bởi glucose thông qua thúc đẩy việc giải phóng Ca^{2+} từ ER. Trong khi đó, adrenalin thông qua thụ thể G_i có tác động nghịch với glucagon hay GLP-1 bằng cách giảm hoạt động của AC, dẫn đến giảm cAMP và các tín hiệu sau đó, ức chế giải phóng insulin [78].

Theo hướng tác động này có các thuốc có tác dụng incretin được chia làm hai nhóm gồm nhóm thuốc đồng vận tại thụ thể GLP-1 có các thuốc exenatid, liraglutid, semaglutid, lixisenatid, albiglutid và dulaglutid, với các tác dụng như kích thích tế bào β tăng tiết insulin phụ thuộc glucose, đảm bảo pha đầu tiết insulin, tăng sinh tế bào β , giảm apoptosis tế bào β ; làm giảm nồng độ glucagon trong máu giúp giảm tổng hợp glucose ở gan và giảm nhu cầu insulin; trì hoãn quá trình làm rỗng dạ dày, làm giảm tình trạng tăng glucose máu sau ăn; tạo cảm giác no và giảm cảm giác thèm ăn, và nhóm thuốc ức chế DPP-4, một enzym thoái giáng GLP-1, do đó làm tăng nồng độ GLP-1 có hoạt tính, gồm các thuốc saxagliptin, sitagliptin, vildagliptin, linagliptin và alogliptin [79].

Bên cạnh đó còn có pramlintid, là chất tổng hợp của hormon amylin có vai trò đồng tiết cùng với insulin từ tế bào beta tụy, có tác dụng hiệp đồng với insulin để giảm glucose huyết.

Thuốc được chỉ định trên cả bệnh nhân ĐTĐ tuýp 1 và tuýp 2 để cải thiện kiểm soát glucose huyết bằng cách hạn chế tăng glucose huyết sau ăn. Chất chủ vận trên thụ thể dopamin D2 như bromocriptin, có vai trò trong giảm đề kháng insulin do tác động trên các hoạt động thần kinh ở vùng dưới đồi, điều chỉnh lại những bất thường ở vùng dưới đồi bao gồm sự tăng glucose huyết, acid béo tự do và triglycerid ở bệnh nhân kháng insulin [79].

Các tín hiệu của con đường khuếch đại chuyển hóa vẫn chưa được giải thích đầy đủ, nhưng được cho là có liên quan đến các yếu tố kết hợp trao đổi chất (MCFs-Metabolic coupling factors) từ chu trình TCA như sự tăng NADPH hoặc ATP và giảm MgADP dẫn đến khuếch đại sự tiết insulin [78].

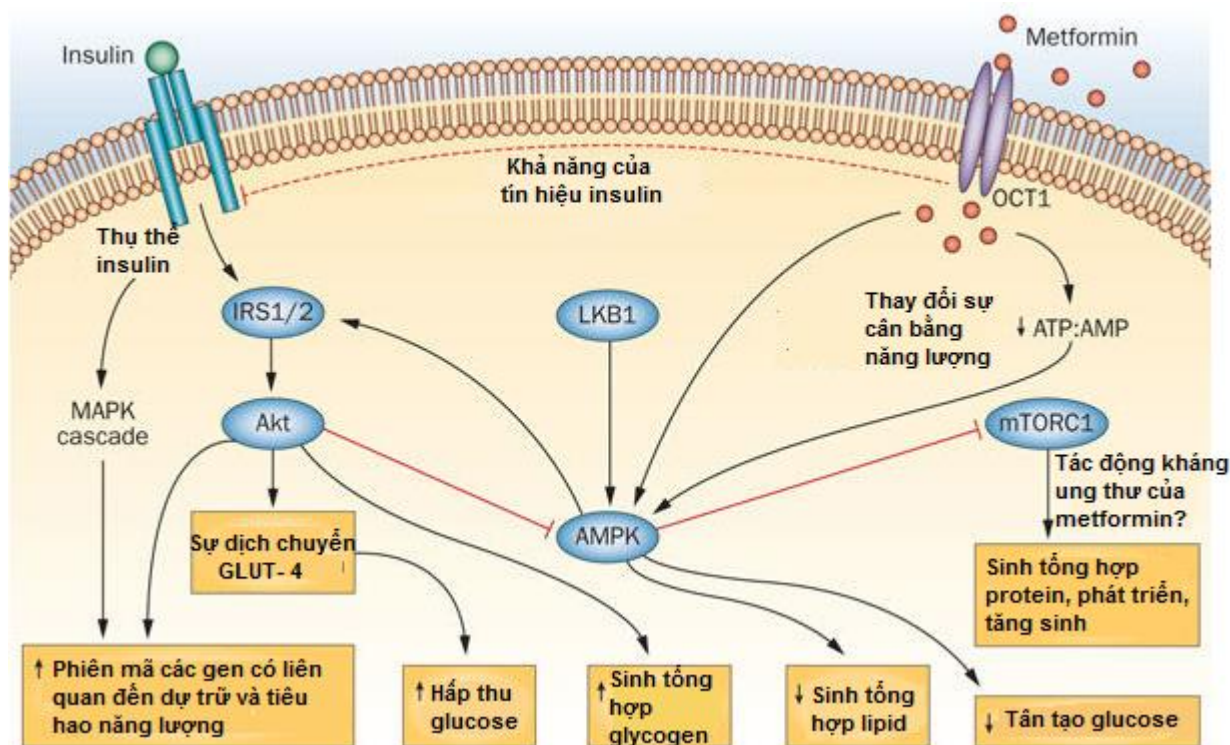
Bên cạnh các thuốc kích thích tế bào β tụy tiết insulin, insulin cũng được sử dụng trực tiếp ở dạng đường tiêm (chủ yếu là tiêm dưới da, tiêm truyền tĩnh mạch thường dùng trong trường hợp cấp cứu hôn mê do nhiễm toan ceton), chỉ định trong các trường hợp như ĐTĐ tuýp 1, ĐTĐ thai kỳ, bệnh nhân ĐTĐ mang thai; HbA1c > 10%, glucose huyết > 300 mg/dl hoặc có triệu chứng rõ (như ceton niệu); bệnh nhân ĐTĐ mắc bệnh cấp tính khác (như nhiễm khuẩn nặng, đột quỵ, nhồi máu cơ tim); bệnh nhân suy gan hoặc thận chống chỉ định dùng thuốc hạ glucose huyết đường uống; các thuốc hạ glucose huyết đường uống không hiệu quả hay bệnh nhân dị ứng với các thuốc hạ glucose huyết đường uống. Insulin được phân làm hai loại theo cấu trúc phân tử gồm insulin người (insulin thường, insulin isophan) và chất tương tự-insulin analog (aspart, lispro, glulisin, faster aspart, detemir, glargin, glargin U300, degludec) và phân làm 5 loại theo thời gian tác dụng gồm insulin tác dụng nhanh (aspart, lispro, glulisin, faster aspart), tác dụng ngắn (insulin thường), tác dụng trung bình (insulin isophan), tác dụng chậm, kéo dài (detemir, glargin, glargin U300, degludec) và insulin trộn, hỗn hợp (2 loại tác dụng nhanh (hoặc ngắn) và tác dụng dài (hoặc trung bình)) [80].

1.3.3. Giảm đề kháng insulin

Một số đích tác động trong nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị ĐTĐ như AMPK, PPAR γ , PTP1B, ACC, SIRT-1 (Sirtuin-1), GFAT, SHIP2, PTEN, IKK β , PKC,...

Hoạt hóa AMPK ở mô đích giúp cải thiện độ nhạy với insulin và cân bằng nội môi glucose nên trở thành mục tiêu tiềm năng trong nghiên cứu thuốc điều trị ĐTĐ tuýp 2 và các bệnh rối loạn chuyển hóa khác. Metformin là thuốc duy nhất thuộc nhóm biguanid còn được

sử dụng hiện nay trên lâm sàng, có tác dụng hoạt hóa AMPK dẫn đến các tác động có lợi cho bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2 như tăng chuyển vị GLUT4 làm tăng hấp thu glucose, tăng phiên mã các gen có liên quan đến dự trữ và tiêu hao năng lượng, tăng tổng hợp glycogen, giảm tổng hợp lipid, giảm tân tạo glucose,... (**Hình 1.6**) [81]. Thuốc khác trong nhóm là phenformin đã bị cấm vì tăng nguy cơ nhiễm acid lactic. Tuy nhiên, nhóm này không có tác dụng đáng kể đối với sự tiết insulin ở tụy nên cũng được dùng phối hợp với sulphonylurea hoặc insulin trong điều trị. Mặc dù AMPK là một mục tiêu tiềm năng để phát triển thuốc nhưng cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn về đích tác động này đặc biệt là hiệu quả trên lâm sàng bởi vì sự liên quan về mặt di truyền của AMPK trong phát triển bệnh ĐTĐ chưa được làm rõ; hơn nữa, AMPK là cảm biến năng lượng quan trọng của tế bào đáp ứng với stress, việc kích thích lâu dài hay quá ức AMPK có thể gây ra các tác động bất lợi cho tế bào, rối loạn chuyển hoá [71].



Hình 1.6. Tác dụng hoạt hóa AMPK của metformin [81]

PPAR- γ là thụ thể nhân tế bào loại II, PPAR- γ chỉ được biểu hiện nhiều trong mô mỡ và mô cơ xương, mức độ tăng lên khi kháng insulin. Thuốc thiazolidinedion có tác dụng làm giảm trực tiếp tình trạng đề kháng insulin, cải thiện chức năng tế bào β [82]. Hiện nay, chỉ có pioglitazon thuộc nhóm này còn được sử dụng tại Việt Nam.

PTP1B cũng là một mục tiêu cho nghiên cứu thuốc điều trị bệnh ĐTĐ tuýp 2. Việc nghiên cứu trên mục tiêu PTP1B có nhiều triển vọng, ức chế PTP1B làm tăng nhạy cảm với tín hiệu insulin, giảm béo phì đã được chứng minh trên mô hình chuột; mặt khác, biến đổi gen PTP1B trên chuột không ảnh hưởng đến khả năng sinh sản, sự sống và các bất thường lớn. Điều này cho thấy ức chế PTP1B có thể ít hoặc không có tác dụng phụ khi sử dụng [83-85]. Tuy nhiên, một số hạn chế khi nghiên cứu trên đích tác động PTP1B như chưa có chất có tính chọn lọc cao đối với PTP1B, enzym này phân bố rộng rãi trong cơ thể nên khó có chất đạt được hiệu quả nếu sử dụng hệ thống phân phối thuốc thông thường, các chất có thể ức chế tốt PTP1B trong các nghiên cứu *in vitro* thường tồn tại gốc phosphat tích điện âm trong phân tử nhưng các chất có nhóm phosphat tích điện âm sẽ khó đi vào bên trong tế bào để ức chế PTP1B nên nghiên cứu tác dụng trên *in vivo* có thể bị giới hạn [86],[87]. Hiện nay vẫn chưa có thuốc trị đái tháo đường nào được sử dụng trên lâm sàng theo cơ chế tác dụng ức chế PTP1B. Do đó, cần tìm các chất có khả năng ức chế PTP1B có ít hoặc tốt nhất là không có nhóm phosphat sẽ khắc phục được nhược điểm này. Một trong những hướng tiếp cận hiện nay là nghiên cứu tổng hợp chất mới hoặc khám phá các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế PTP1B có lợi về mặt cấu trúc để thuận lợi vào bên trong tế bào.

1.3.4. Một số mục tiêu tác động khác

Glucose được lọc qua cầu thận, sau đó được tái hấp thu chủ yếu ở ống lượn gần dưới tác dụng của SGLT2. Hơn 90% glucose lọc qua cầu thận vào tế bào biểu mô thông qua SGLT2 ở đoạn 1 của ống lượn gần (PCT); phần glucose còn lại (<10%) được tái hấp thu qua SGLT1 ở đoạn 2 PCT và đoạn 3 ống thẳng (PST). Sau đó, glucose đi vào dịch kẽ thông qua GLUT2 ở đoạn 1 hoặc qua GLUT1 ở đoạn 2 và 3 [88]. Do đó, thuốc ức chế SGLT2 làm tăng thải glucose qua đường tiểu giúp giảm glucose huyết. Các thuốc trong nhóm này bao gồm canagliflozin, dapagliflozin và empagliflozin.

Giảm sản xuất glucose và tăng tổng hợp glycogen ở gan (ức chế glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-biphosphatase hay glycogen phosphorylase, hoạt hóa glucose glucokinase), ức chế glutamin fructose-6-phosphat amidotransferase (GFAT); chất ức chế aldose reductase như tolrestat, epalrestat, ponalrestat...

1.4. Một số mô hình thực nghiệm trong nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết

1.4.1. Một số mô hình thực nghiệm *in vitro* và *ex vivo*

1.4.1.1. Mô hình ức chế các enzym tiêu hóa carbohydrat

Ức chế α -amylase và α -glucosidase có thể làm giảm quá trình thủy phân carbohydrat từ chế độ ăn uống ở ruột giúp kiểm soát tăng glucose huyết sau bữa ăn. Thử nghiệm DNSA (acid 3,5-dinitrosalicylic) và iodin bằng phương pháp đo quang thường được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế α -amylase. Trong khi đó, thử nghiệm sử dụng cơ chất pNPG (*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid) bằng phương pháp đo quang thường được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế α -glucosidase. Tác dụng của mẫu nghiên cứu được đánh giá thông qua phần trăm ức chế enzym và giá trị IC₅₀. Những thử nghiệm này đơn giản, ít tốn kém thời gian và chi phí nên được áp dụng rộng rãi trong nghiên cứu, cho phép sàng lọc nhanh các chất có tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase nhưng không biết rõ được kiểu ức chế [89].

Trong luận án, thử nghiệm DNSA được áp dụng để đánh giá tác dụng ức chế α -amylase và thử nghiệm sử dụng cơ chất pNPG được áp dụng để đánh giá tác dụng ức chế α -glucosidase của các mẫu thử, các thử nghiệm này phù hợp với điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm thực hiện nghiên cứu.

1.4.1.2. Mô hình ức chế hấp thu glucose ở ruột non

Hai mô hình *in vitro* để sàng lọc nhanh tác nhân có khả năng ức chế hấp thu glucose là sử dụng các dòng tế bào và ống thẩm tách. Một số dòng tế bào được sử dụng như Caco-2, HT-29, T-84, IEC, RIE,... Trong đó, Caco-2 là dòng tế bào điển hình, được sử dụng phổ biến hơn, các tế bào Caco-2 có khả năng biệt hóa thành một hỗn hợp các tế bào biểu mô ruột. Dòng tế bào này biểu hiện mạnh các chất vận chuyển glucose như SGLT1 và GLUT2 [90]. Do đó, tác động của mẫu nghiên cứu lên sự hấp thu glucose, sự biểu hiện của SGLT1 và GLUT2 của tế bào thường được đánh giá. Mô hình tế bào thực hiện khá đơn giản, có thể dễ dàng sửa đổi thành phần mô hình bao gồm thay đổi dòng tế bào và thành phần nuôi cấy nên được áp dụng rộng rãi để sàng lọc tác dụng và độc tính của các loại thuốc mới. Tuy nhiên, mô hình nuôi cấy tế bào không phù hợp để mô phỏng cấu trúc ruột [91].

Một ống thẩm tách thương mại với một đầu của ống được buộc lại để tạo thành một chiếc túi, sau đó cho hỗn hợp dung dịch có chứa glucose và mẫu nghiên cứu vào túi, buộc chặt đầu còn lại. Túi này được đặt vào dụng cụ đủ rộng chứa nước cất/nước muối sinh lý và được lắc ở nhiệt độ 37 °C. Lượng glucose khuếch tán ra môi trường bên ngoài được đo tại các thời điểm khác nhau. Chỉ số chậm thẩm tách glucose GDRI (Glucose dialysis retardation index) được tính toán. Ưu điểm của mô hình này là đơn giản, dễ thực hiện nhưng cần phải mua ống thẩm tách đắt tiền, môi trường thử nghiệm nhân tạo chưa thật sự giống ở ruột non, đặc biệt chỉ khảo sát được sự khuếch tán mà không đánh giá được cơ chế hấp thu glucose tương tự ở ruột non (ví dụ SGLT1, GLUT2), mô hình này chỉ phù hợp với những chất có khả năng liên kết với carbohydrat để làm chậm khả năng tiếp xúc của carbohydrat với các enzym tiêu hóa chúng, điều này có thể dẫn đến sự bỏ sót các chất có tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột. Do đó, mô hình này tương đối ít được áp dụng phổ biến trong khảo sát tác dụng của dược liệu. Thay vào đó, mô hình ức chế hấp thu glucose ở ruột non *ex vivo* được áp dụng nhiều hơn.

Hai mô hình *ex vivo* được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế hấp thu glucose là sử dụng buồng Ussing và đoạn ruột lộn ngược. Mô hình buồng Ussing sử dụng một mảnh mô ruột non và đánh giá sự hấp thu glucose từ buồng phải, qua mảnh mô ruột non, sang buồng trái [92]. Mô hình này tương đối đơn giản, nhanh chóng, dễ ứng dụng, sử dụng mô ruột thật nên có thể mô phỏng được tính phức tạp của ruột, có thể nghiên cứu ở từng đoạn ruột cụ thể, có thể áp dụng so sánh sự hấp thu glucose giữa các loài. Tuy nhiên, cần phải chuẩn bị thiết bị là buồng Chamber được thương mại đắt tiền, số lượng mô khảo sát ở cùng thời điểm thấp; kích thước mô gắn vào thiết bị nhỏ so với toàn bộ đoạn ruột; môi trường hấp thu khác với môi trường trong cơ thể sống; cần phải dùng môi trường dinh dưỡng và sục O₂ liên tục để duy trì sự sống cho đoạn ruột [92].

Mô hình đoạn ruột non lộn ngược được mô tả lần đầu tiên bởi Wilson và Wiseman năm 1953 [93], được sử dụng để dự đoán mức độ vận chuyển và chuyển hóa thuốc ở ruột. Đoạn ruột được lộn ngược và dung dịch thuốc thử nghiệm được cho vào để tạo thành một túi ruột [94]. Mô hình này tương đối đơn giản, chi phí thấp, dễ ứng dụng; sử dụng mô ruột thật nên có thể mô phỏng được tính phức tạp của ruột; có thể xác định thông số động học hấp thu glucose và đo lường sự hấp thu ở những vị trí khác nhau trên ruột non. Tuy nhiên, môi trường hấp thu khác với môi trường trong cơ thể sống; cần phải cung cấp đủ O₂ cho mô, quá trình chuẩn bị mô, ủ dịch tiến hành trong thời gian ngắn. Trong cả hai mô hình này, nồng độ glucose trong

mẫu dịch được đo và tính toán tính thấm biểu kiến P_{app} (apparent permeability) (cm/phút) đặc trưng cho khả năng hấp thu một chất qua màng ruột.

Trong luận án, phương pháp sử dụng đoạn ruột lợn ngược được phân lập từ chuột nhắt trắng khỏe mạnh cũng được áp dụng để đánh giá khả năng ức chế hấp thu glucose qua ruột của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Quy trình thực hiện đã được tối ưu phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm thực hiện nghiên cứu.

1.4.1.3. Mô hình đánh giá khả năng tiết insulin

Các dòng tế bào β tụy thương mại, tế bào β và tiểu đảo tụy phân lập từ mô tụy của động vật nghiên cứu (thường là chuột) được sử dụng để nghiên cứu tác dụng kích thích tiết insulin và các tác động khác có liên quan đến cơ chế bệnh sinh ĐTĐ. Một số dòng tế bào tiết insulin được sử dụng phổ biến như HIT, MIN6, β TC1, INS1, RIN, β HIC, NIT1,... những dòng tế bào này sản xuất insulin, một lượng nhỏ glucagon và somatostatin [95]. Sử dụng các dòng tế bào β bất tử cho phép nghiên cứu đồng nhất và lâu dài về chức năng sinh lý, rối loạn chức năng hay apoptosis tế bào β trong điều kiện bệnh lý, đồng thời cũng là công cụ để sàng lọc tác nhân điều trị ĐTĐ. Tuy nhiên, hạn chế lớn nhất của các dòng tế bào này là đáp ứng tương đối kém với glucose, cần nồng độ glucose cao hoặc bổ sung các yếu tố kích thích khác vào môi trường nuôi cấy, đồng thời nghiên cứu trên các dòng tế bào này chỉ là nghiên cứu trên tế bào đơn lẻ mà không phải một hệ thống tế bào hoàn chỉnh như đảo tụy (khác về điều kiện tưới máu đến tụy). Do đó, tiểu đảo tụy được phân lập từ chuột (chuột nhắt và chuột cống là phổ biến hơn so với lợn, dê, mèo, khỉ và chó) được áp dụng để nghiên cứu [96]. Một số cơ chế được nghiên cứu liên quan đến khả năng tiết insulin từ tế bào β tụy như tăng sản xuất ATP, ức chế kênh kali nhạy cảm ATP (K_{ATP}); thúc đẩy nồng độ Ca^{2+} nội bào; bảo vệ tế bào khỏi tác nhân gây độc (như glucose nồng độ cao, STZ,...), chống stress oxy hóa, chống viêm, chống apoptosis,... Chính vì vậy, các tiểu đảo tụy được phân lập từ chuột nhắt trắng được sử dụng cho nghiên cứu trong luận án.

1.4.1.4. Mô hình đánh giá mức độ nhạy với insulin

Mô hình *in vitro* sử dụng các dòng tế bào mô đích/tế bào phân lập từ mô đích thích hợp để nghiên cứu các cơ chế bệnh sinh ĐTĐ và tình trạng kháng insulin ở mức độ phân tử và tế bào; đồng thời, mô hình này có thể được áp dụng để sàng lọc và khám phá cơ chế của các thuốc/liệu pháp điều trị vì mô hình tế bào tương đối dễ duy trì và có thể lặp lại kết quả. 3T3-

L1 (dòng tế bào tiền mỡ, preadipose), L6, C2C12 (dòng tế bào cơ xương) và HepG2 (dòng tế bào gan) là những dòng tế bào được sử dụng phổ biến với một số hướng nghiên cứu như: Nghiên cứu tác động của các tác nhân lên các tín hiệu của con đường truyền tin nội bào của insulin như sự phosphoryl hóa phân tử tyrosin trên thụ thể insulin (IR), cơ chất thụ thể insulin (IRS), sự chuyển vị của GLUT4 lên màng tế bào,...; Nghiên cứu tác động của các tác nhân trên các đích tham gia hoặc ảnh hưởng đến con đường truyền tin nội bào của insulin như PI3K/Akt, AMPK, PTP1B, GSK-3, PPAR γ ,...; Nghiên cứu tác động của các tác nhân trên các tín hiệu của con đường gây viêm và stress oxy hóa dẫn đến tình trạng đề kháng insulin ở mô đích [97-99].

Bên cạnh sử dụng tế bào, một số thử nghiệm *in vitro* khác cũng được áp dụng như ức chế PTP1B. PTP1B được biểu hiện rộng rãi trong các mô của người như mô mỡ, gan, cơ và não, là yếu tố điều hòa âm tín hiệu thụ thể insulin và leptin. Phương pháp đo quang và phát huỳnh quang được sử dụng để thử ức chế PTP1B. Một số chất nền được sử dụng trong thử nghiệm ức chế PTP1B như chất nền đo màu *p*-nitrophenyl phosphat (*p*NPP), chất nền phát huỳnh quang 6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphat, 3-O-methylfluorescein phosphat và fluorescein diphosphat. Trong đó, chất nền *p*NPP được sử dụng rộng rãi nhất. Tác dụng của mẫu nghiên cứu được đánh giá thông qua phần trăm ức chế enzym và giá trị IC₅₀. Thử nghiệm này đơn giản, ít tốn thời gian, không đòi hỏi thiết bị phức tạp nên cũng được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu, cho phép sàng lọc nhanh các chất có tác dụng ức chế PTP1B nhưng không làm rõ được kiểu ức chế và chi phí hóa chất thử nghiệm tương đối đắt tiền [100]. Với điều kiện của phòng thí nghiệm, thử nghiệm này được áp dụng để đánh giá tác dụng của các mẫu nghiên cứu trong luận án.

1.4.2. Một số mô hình thực nghiệm *in vivo*

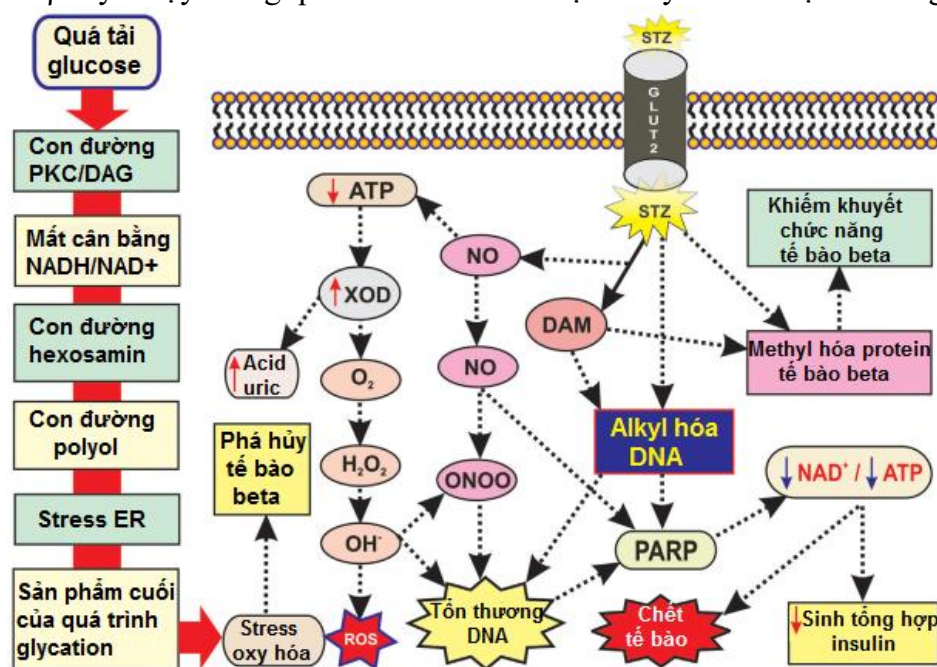
Có nhiều mô hình động vật được ứng dụng trong nghiên cứu cơ chế bệnh sinh cũng như liệu pháp điều trị ĐTĐ [101-103]. Giun tròn *Caenorhabditis elegans*, ruồi giấm *Drosophila melanogaster* và cá ngựa vằn *Danio rerio* là những động vật nhỏ thường được sử dụng để thiết lập mô hình nghiên cứu bệnh ĐTĐ [104],[105],[106]. Các loài gặm nhấm nhỏ, bao gồm chuột cống và chuột nhắt, là những động vật được sử dụng rộng rãi nhất trong nghiên cứu bệnh ĐTĐ. Một số tác nhân có thể dùng để gây mô hình ĐTĐ như hóa chất (phổ biến nhất là STZ và alloxan), hormon, kháng thể, virus, phẫu thuật, di truyền, chế độ ăn uống. Chó và lợn là những động vật lớn hơn cũng được sử dụng để thiết lập mô hình trong nghiên cứu về béo phì và ĐTĐ [107, 108].

1.4.2.1. Mô hình ĐTD do hóa chất

1.4.2.1.1. Mô hình ĐTD do streptozotocin (STZ)

Cơ chế gây ĐTD của STZ:

STZ có nguồn gốc từ *Streptomyces achromogens*, do có cấu tạo một đầu là glucose nên khi tiêm vào cơ thể động vật STZ đi vào tế bào một cách tự do dưới sự nhận dạng tương tự glucose của GLUT2. Khi vào tế bào STZ bị phân cắt thành glucose và N-methylnitrosourea (tham gia chính vào quá trình gây độc tế bào). STZ gây ra tình trạng ĐTD bằng cách gây tổn thương tế bào β tuyến tụy thông qua cơ chế chính là sự methyl hóa và tạo ra các gốc tự do.



Hình 1.7. Cơ chế gây ĐTD của STZ [109]

STZ là một tác nhân alkyl hóa DNA, gây ra sự phân mảnh DNA, tổn thương tế bào, cuối cùng là hoại tử và apoptosis. STZ ổn định nhất ở pH4,5 và phân hủy ở pH kiềm trong cytosol của tế bào β và tạo ra một sản phẩm phụ là diazomethan (DAM) hoạt động như một tác nhân alkyl hóa. STZ dẫn đến sự phá hủy nhanh chóng các sợi DNA thông qua sự tương tác giữa STZ và cytosin trong DNA. Sự tương tác này xảy ra ở pH5-5,5, ngoài giới hạn này sẽ bị đảo ngược [110]. Sự chuyển hóa của STZ tạo ra các ion carbonium (CH_3^+) hoạt động, là một yếu tố quan trọng trong quá trình alkyl hóa DNA. Các ion này tương tác với các electron tự do của phân tử nitơ và oxy có mặt trong vùng nucleophilic DNA. Gốc methylnitrosourea của STZ methyl hóa DNA ty thể ở vị trí O⁶ của guanin và dẫn đến đứt gãy sợi DNA. Quá trình tổn thương DNA

gây ra bởi STZ gọi là poly ADP-ribosyl hóa. Khi DNA bị tổn thương, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) được kích hoạt, tham gia vào quá trình sửa chữa DNA bị hỏng. Khi PARP hoạt động liên tục sẽ tiêu thụ một lượng lớn NAD^+ dẫn đến thiếu hụt NAD^+ , sự thiếu hụt này làm giảm sự tổng hợp ATP cho hoạt động của tế bào, ức chế sự tổng hợp, bài tiết insulin, làm tế bào bị phá hủy và viêm khu vực quanh đó. Bên cạnh đó, bản chất STZ là nitrosourea nên STZ có thể phóng thích NO khi vào tế bào. Sự tồn tại của NO trong tế bào gây nên tình trạng stress oxy hóa, cản trở quá trình trao đổi chất, tổn thương DNA... và dẫn đến chết tế bào. Mặt khác, STZ gây tăng glucose quá mức và kéo dài cũng sẽ dẫn đến stress oxy hóa và gây phá hủy tế bào β (**Hình 1.7**) [109].

Mô hình thực nghiệm gây ĐTD do STZ:

STZ có thể dùng riêng lẻ hoặc kết hợp với một số hóa chất khác hoặc với chế độ ăn kiểm soát để gây tình trạng ĐTD tuýp 1 hay tuýp 2. Liều STZ cần thiết để gây mô hình ĐTD tuýp 1 tùy thuộc vào loài sử dụng, chẳng hạn như tiêm phúc mạc (i.p.) hoặc tĩnh mạch (i.v.) liều 150-200 mg/kg ở chuột nhắt; 50-60 mg/kg ở chuột cống; 10-15 mg/kg trong 3-5 ngày ở chó. Đáp ứng của động vật sau khi tiêm STZ gồm 3 pha thường xảy ra bao gồm: (1) tăng glucose huyết thoáng qua sau 1 giờ tiêm; (2) hạ glucose huyết cấp kéo dài trong 6 giờ và (3) tăng glucose huyết duy trì 24-48 giờ sau khi tiêm [111-113]. Để tạo mô hình ĐTD tuýp 2, STZ thường được dùng ở nhiều liều thấp hoặc kết hợp với hóa chất khác (nicotinamid) hoặc chế độ ăn giàu chất béo. STZ dùng nhiều liều thấp (thường tiêm i.p. liều 50 mg/kg trong 5 ngày) có thể gây mô hình ĐTD do tuyến tụy bị viêm qua trung gian miễn dịch. Mô hình STZ+nicotinamid được triển khai phần lớn trên chuột *Wistar* hoặc *Sprague-Dawley* với liều STZ từ 45-65 mg/kg và nicotinamid từ 60-290 mg/kg (i.p. hoặc i.v.) [114]. Mô hình STZ kết hợp với chế độ ăn giàu chất béo, động vật được cho ăn chế độ ăn giàu chất béo trong 1,5 đến 12 tuần trước khi tiêm STZ liều tương đối thấp 15-50 mg/kg (i.p. hoặc i.v.) [113, 115].

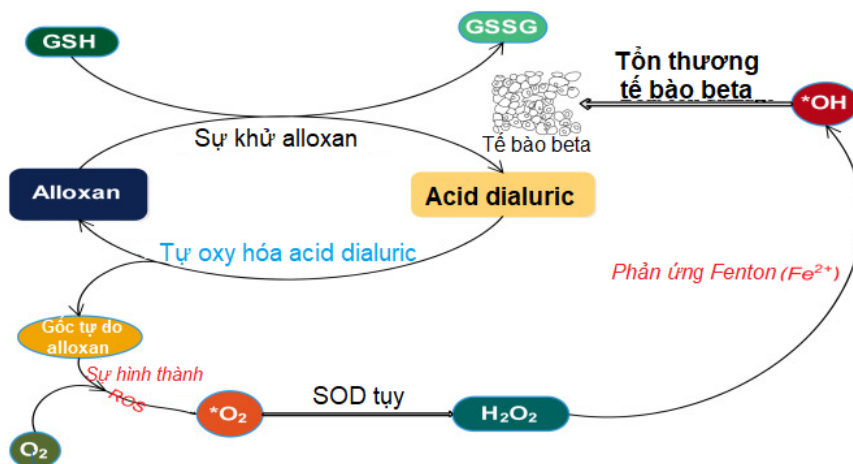
Tuy nhiên, kết quả khảo sát trước đây cho thấy STZ liều 140-200 mg/kg (i.p.) chưa gây được mô hình mô phỏng ĐTD tuýp 1 trên chuột nhắt do không phá hủy hoàn toàn tế bào β tuyến tụy, nồng độ C-peptid không đủ thấp để chẩn đoán là ĐTD tuýp 1 mặc dù nồng độ glucose huyết tăng kéo dài hơn 3 ngày [116]. STZ liều cao cũng chưa được chứng minh gây ra tình trạng đề kháng insulin tương tự như ĐTD tuýp 2. Tuy nhiên, STZ là tác nhân được sử dụng phổ biến để gây ra mô hình tăng glucose huyết thực nghiệm bởi tình trạng tăng glucose huyết ổn định và kéo dài cho phép nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của một tác

nhân khi sử dụng trong thời gian dài. Một số thuốc vẫn đáp ứng tốt trên mô hình này nên được sử dụng phổ biến làm chứng dương trong các nghiên cứu, chẳng hạn như glibenclamid [117].

1.4.2.1.2. Mô hình ĐTĐ do alloxan

Cơ chế gây ĐTĐ của alloxan:

Alloxan ưa nước, không thấm vào lớp lipid kép của màng sinh chất và có cấu trúc tương tự glucose nên vào được tế bào β thông qua GLUT2. Thời gian bán hủy của alloxan ngắn; trong dung dịch nước, nó tự phân hủy thành acid alloxanic không gây tăng glucose huyết trong vòng vài phút nên nó phải được hấp thu và tích lũy nhanh chóng trong tế bào β . Chính vì vậy, tác động của alloxan không hiệu quả khi lưu lượng máu đến tuyến tụy bị gián đoạn trong vài phút đầu sau khi tiêm alloxan [112]. Alloxan gây ra tình trạng ĐTĐ chủ yếu do cơ chế sản sinh các gốc tự do và gây hoại tử tế bào.



Hình 1.8. Sự hình thành ROS thông qua chu trình oxy hóa khử alloxan [118]

Alloxan là một hợp chất rất không ổn định, một đặc tính cho phép nó dễ dàng thực hiện chu trình oxy hóa khử. Với sự hiện diện của thiol nội bào, đặc biệt là GSH, alloxan trải qua một phản ứng tuần hoàn liên tục kéo dài để tạo ra ROS như anion gốc superoxid ($O_2^{\bullet-}$) và gốc hydroxyl ($OH^{\bullet}$) thông qua quá trình tự động oxy hóa sản phẩm khử acid dialuric của nó. Quá trình này bao gồm việc khử alloxan thành acid dialuric và tái oxy hóa acid dialuric thành alloxan. Quá trình này gây ra sự giải phóng gốc tự do alloxan khi có sự hiện diện của $O_2^{\bullet-}$. $O_2^{\bullet-}$ thường bị biến đổi thành hydrogen peroxid (H_2O_2) tương đối vô hại bởi SOD, một loại enzym chống oxy hóa có hầu như trong tất cả các mô. Catalase một loại enzym chống oxy hóa khác cần thiết để ngăn chặn sự tích tụ H_2O_2 bằng cách phân hủy nhanh chóng hợp chất này thành nước và oxy phân tử, hậu quả là sự hình thành gốc hydroxyl. Tuy nhiên, hoạt tính catalase ở

tuyến tụy rất thấp và kết quả là H_2O_2 tích tụ, dẫn đến sự chuyển đổi của nó thành gốc hydroxyl có hoạt tính cao thông qua phản ứng Fenton. Gốc hydroxyl là gốc nguy hiểm nhất trong tế bào và được coi là tác nhân chính gây độc tính tế bào β tụy và gây bệnh ĐTĐ do alloxan. Tổn thương tế bào β tuyến tụy do ROS có liên quan đến sự phân mảnh DNA của các tế bào này, dẫn đến kích thích poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), một loại enzym đóng vai trò quan trọng trong quá trình sửa chữa DNA [118].

Mô hình thực nghiệm gây ĐTĐ do alloxan:

Alloxan cũng được sử dụng để gây ĐTĐ trên nhiều loài động vật, ở chế độ liều một lần hoặc nhiều liều tương tự như STZ. Liều lượng của alloxan cũng khác nhau giữa các nghiên cứu, trong đó liều 150 mg/kg được sử dụng thường xuyên nhất. Tiêm i.v. 150 mg/kg alloxan có thể mô phỏng ĐTĐ tuýp 1, được ứng dụng trong thăm dò hiệu lực hạ glucose huyết của các chất có tác dụng hỗ trợ insulin (giảm liều insulin). Tiêm i.v. 70-80 mg/kg alloxan có thể mô phỏng ĐTĐ tuýp 2, sau 2 ngày tiêm nồng độ glucose trên 250 mg/dl, dương tính glucose niệu, âm tính ceton niệu, được ứng dụng để khảo sát tác dụng hạ glucose huyết của những thuốc sử dụng đường uống [119],[118]. Tiêm dưới da (s.c.) liều 100-175 mg/kg trên chuột cống *Wistar* hoặc *Sprague-Dawley* trưởng thành, tiêm s.c. liều 200 mg/kg ở chuột *Sprague-Dawley* sơ sinh, tăng glucose huyết đạt được vào ngày thứ 2, 4 hoặc 6 sau sinh; truyền i.v. liều 150 mg/kg trong 10 phút ở thỏ (70% động vật tăng glucose máu và acid uric, số còn lại tử vong hoặc tăng glucose máu tạm thời), tiêm i.v. liều 60 mg/kg ở chó Beagle 15-20 kg, tiêm i.v. liều 65-200 mg/kg ở các loài linh trưởng như khỉ, khỉ đầu chó. Sau khi sử dụng alloxan, động vật sẽ được nhận glucose và insulin thông thường trong 7-10 ngày tiếp theo. Sau 7-10 ngày, một liều insulin duy nhất hàng ngày (28 IU) sẽ được tiêm dưới da [113]. Đáp ứng của động vật sau khi tiêm alloxan gồm 4 pha thường xảy ra bao gồm: (1) hạ glucose huyết thoáng qua trong 30 phút sau vài phút tiêm, (2) tăng glucose huyết sau 1 giờ tiêm; (3) hạ glucose huyết kéo dài sau 4-8 giờ tiêm và (4) tăng glucose huyết sau 12-48 giờ tiêm [112].

1.4.2.1.3. Mô hình ĐTĐ do một số hóa chất khác

Dithizon là một hợp chất organosulfur, có đặc tính chelat, có khả năng thấm qua màng và phức hợp kẽm bên trong liposom, sau đó giải phóng proton, làm tăng khả năng gây bệnh ĐTĐ. Dithizon gây thoái hóa hoàn toàn và một phần của tế bào β . Dithizon (40-100 mg/kg tiêm i.v.) có thể gây ra tình trạng tăng glucose huyết vĩnh viễn sau 24-72 giờ dùng thuốc [113]. Một số chất có đặc tính chelat khác cũng được sử dụng như 8-(p-toluenesulfonylamino)-

quinolin (8-TSQ) và 8- (benzensulfanylamino)-quinolin (8-BSQ) liều đơn 40–100 mg/kg (i.v.) trên mèo, thỏ, chuột hamster và chuột nhắt.

Monosodium glutamat làm tăng nồng độ glutamat trong huyết tương, kích thích giải phóng insulin. Sử dụng monosodium glutamat ở chuột dẫn đến béo phì liên quan đến tăng insulin máu. Sau 29 tuần, mức glucose huyết, cholesterol toàn phần và chất béo trung tính đều tăng lên. Chuột được cho uống monosodium glutamat 2 mg/g bổ sung vào nước uống hàng ngày [113].

Aurothioglucose là gây ĐTĐ tuýp 2 do béo phì. Aurothioglucose tiêm i.p. ở động vật thí nghiệm dần dần phát triển bệnh béo phì, tăng insulin máu, tăng glucose huyết, kháng insulin trong thời gian 16-20 tuần. Aurothioglucose được vận chuyển đặc biệt đến các tế bào và gây ra các tổn thương hoại tử, nguyên nhân dẫn đến sự phát triển của chứng cuồng ăn và béo phì. Nó cũng làm tăng lipid trong cơ thể, quá trình tạo mỡ ở gan và bài tiết chất béo trung tính, tăng quá trình tạo mỡ ở mô mỡ và giảm chuyển hóa glucose. Chuột nhắt được tiêm i.p. một lần 30-40 mg/kg aurothioglucose [113].

Sắt nitrilotriacetat gây ra bệnh ĐTĐ bằng đường tiêm liều hàng ngày ở động vật thí nghiệm trong 60 ngày quan sát thấy các triệu chứng ĐTĐ đáng chú ý như tăng glucose huyết, glucose niệu, ceton huyết và ceton niệu [113].

Các thuốc khác được sử dụng để gây ra tình trạng ĐTĐ tuýp 2 như adrenalin, EDTA, diazoxid,... Adrenalin được dùng ở liều 0,1 mg/kg tiêm s.c. ở thỏ, glucose máu đạt đỉnh sau 1 giờ và kéo dài đến 4 giờ. Nồng độ glucose máu đạt khoảng 120-150 mg/dl nên mô hình này có thể dùng để sàng lọc thuốc đường uống có tác dụng hạ glucose máu. EDTA có khả năng gây tăng glucose huyết ở chuột đã cắt bỏ tuyến tụy một phần. Chuột nhắt, chuột cống và thỏ cũng dễ bị tăng glucose huyết bởi các tác nhân bao gồm thiazid, diazoxid, furosemid [113].

1.4.2.2. Mô hình ĐTĐ do tác nhân khác

Mô hình ĐTĐ do hormon: Corticosteroid kích thích vỏ thượng thận, dẫn đến tăng glucose huyết (có thể hồi phục hoặc không hồi phục) do mất cân bằng nội tiết tố sau đó. Dexamethason thường được sử dụng với liều tiêm 2-5 mg/kg 2 lần mỗi ngày trong vài ngày liên tiếp [113].

Mô hình ĐTĐ qua trung gian kháng thể: Mô phỏng ĐTĐ tuýp 1 do rối loạn tự miễn. Insulin bò được sử dụng cùng với chất bổ thể Freund để tạo ra kháng thể kháng insulin. Sau đó, chuột cống được tiêm 0,25-1 ml huyết thanh kháng insulin của chuột lang (truyền tĩnh mạch chậm hoặc i.p.) gây ra tình trạng tăng glucose huyết phụ thuộc vào liều lượng [113].

Mô hình ĐTĐ do virus: Virus cũng là một nguyên nhân dẫn đến ĐTĐ tuýp 1. Cơ chế mà virus có thể gây tăng glucose huyết bao gồm sự phá hủy tế bào β tuyến tụy, gây ra phản ứng tự miễn và gây ra các tác động toàn thân qua trung gian tế bào không phải tế bào β . Các loại virus được sử dụng như Cocksackievirus B4 (chuột SJL/J, SWR/J), RNA picornavirus, viêm não-cơ tim (biến thể D hoặc M) (chuột SJL/J, SWR/J, DBA/1J, DBA/2J, BALB/cCUM), virus viêm màng não mô tế bào lympho (biến thể Armstrong),... [113].

Mô hình ĐTĐ do phẫu thuật: Phẫu thuật cắt bỏ (toàn bộ hay một phần) tuyến tụy gây ra bệnh ĐTĐ ở mô hình động vật. Tuy nhiên, trong phẫu thuật cắt bỏ một phần tụy, ít nhất 90% tuyến tụy cần phải được cắt bỏ để có hiệu quả lâu dài. Khi cắt bỏ toàn bộ tụy dẫn đến ĐTĐ phụ thuộc insulin, do đó liệu pháp insulin cần được bổ sung để duy trì đời sống động vật. Thời gian và cường độ của bệnh tiểu đường gây ra phụ thuộc vào mức độ phẫu thuật cắt tụy được thực hiện. Nhược điểm chính của mô hình này là mất tế bào alpha do cắt tụy, dẫn đến mất đi các phản ứng điều hòa ngược (glucagon và somatostatin). Ngoài ra, các enzym tuyến tụy cũng không được tiết ra bởi động vật bị cắt tụy (như α -amylase từ tuyến tụy cần thiết cho việc tiêu hóa thích hợp nên chế độ ăn của động vật phải được bổ sung các enzym tụy). Một thách thức về mặt kỹ thuật là việc cắt bỏ toàn bộ tuyến tụy rất khó thực hiện ở hầu hết các loài động vật, đặc biệt là ở chuột. Do đó, phẫu thuật cắt bỏ một phần tuyến tụy kết hợp với tác nhân hóa học như STZ hoặc alloxan được sử dụng để tạo ra tình trạng tăng glucose máu ổn định hơn [113].

Mô hình ĐTĐ do di truyền: Một số mô hình di truyền phổ biến của loài gặm nhấm như chuột nhắt ĐTĐ không béo phì (NOD), chuột cống nhân giống sinh học (BB), chuột Wistar Bonn/Kobori, chuột cống ĐTĐ Cohen (ĐTĐ tuýp 1); chuột nhắt Agouti, chuột nhắt ob/ob, chuột nhắt ob/db, chuột nhắt/cống béo phì Zucker, chuột nhắt db/db, chuột nhắt KK, chuột nhắt KK-Ay,... (ĐTĐ tuýp 2) [113].

Mỗi mô hình mô phỏng trình trạng bệnh ĐTĐ có những ưu điểm và hạn chế riêng (Bảng 1.2), do đó tùy vào mục tiêu nghiên cứu và điều kiện thí nghiệm để lựa chọn mô hình phù hợp.

Bảng 1.2. Ưu điểm và hạn chế của một số loại mô hình ĐTĐ [119]

Loại mô hình	Ưu điểm	Hạn chế
ĐTĐ tự phát	-Bệnh ĐTĐ có nguồn gốc tự phát có nhiều loại có liên quan đến yếu tố di truyền, mô tả chính xác hơn	-Các mô hình thường là dòng cận huyết cao, đồng nhất, đơn gen nhưng hệ thống được động học của

Loại mô hình	Ưu điểm	Hạn chế
	tính chất phức tạp của bệnh ĐTĐ ở con người. -Nhiều loại mô hình động vật tùy theo thời điểm bắt đầu tác động hoặc cơ chế tác động (mô hình phát triển bệnh ĐTĐ rất nhanh hoặc mô hình ĐTĐ bao gồm tình trạng kháng insulin) Hầu hết các mô hình động vật cận huyết đều đồng nhất và được kiểm soát về mặt môi trường, cho phép phân tích di truyền dễ dàng. -Độ biến thiên của kết quả là tối thiểu và yêu cầu cỡ mẫu nhỏ.	con người phức tạp hơn các mô hình này. -Mô hình động vật không có sẵn và khó duy trì sức sống khỏe mạnh cho động vật mô hình. -Số lượng có hạn và đắt tiền. Tỷ lệ tử vong do nhiễm ceton cao ở động vật có tuyến tụy giòn (db/db, ZDF chuột <i>P. obesus</i>...) và cần insulin ở giai đoạn sau để sống sót.
ĐTĐ do dinh dưỡng/chế độ ăn uống	-Chi phí thấp. -Phát triển bệnh ĐTĐ kèm theo béo phì do dinh dưỡng quá mức giống như ĐTĐ ở người. -An toàn hơn hóa chất và ít gây độc cho các cơ quan quan trọng.	-Cần có thời gian dài vì động vật được can thiệp vào chế độ ăn để tăng glucose huyết. -Không có tình trạng tăng glucose huyết rõ ràng khi điều trị bằng chế độ ăn kiêng ở động vật bình thường và do đó không phù hợp để sàng lọc các thuốc trị ĐTĐ dựa trên các thông số glucose tuần hoàn.
ĐTĐ do hóa chất (STZ hoặc alloxan)	-Độc tính có tính chọn lọc cao đối với tế bào β tuyến tụy nên bảo tồn được tế bào α và δ. -Tiết insulin giúp động vật sống lâu mà không cần điều trị bằng insulin. -Nhiễm ceton và tỷ lệ tử vong tương đối thấp do liều lượng chính xác của cả STZ và alloxan đều được báo cáo trước đó. -Trương đối rẻ.	Tăng glucose huyết phát triển do tác dụng gây độc tế bào trên tế bào β, dẫn đến thiếu hụt insulin hơn là kháng insulin. -Việc điều trị kém ổn định và có thể đảo ngược do tốc độ tái tạo tế bào β cao. Vì vậy, cần phải cẩn thận để đánh giá chức năng tế bào β trong các thí nghiệm dài hạn. -Độc tính ở các cơ quan quan trọng khác cũng là mối quan tâm lớn.

Loại mô hình	Ưu điểm	Hạn chế
ĐTĐ do phẫu thuật	-Mô hình không gây độc cho các cơ quan quan trọng khác. -Mô hình có thể phát triển bệnh ĐTĐ rất nhanh do chỉ loại bỏ tuyến tụy.	-Việc thiết lập toàn bộ thử nghiệm sẽ rất tốn kém. -Phẫu thuật đòi hỏi trình độ chuyên môn kỹ thuật cao. -Xuất hiện một số vấn đề về tiêu hóa do cắt bỏ phần ngoại tiết dẫn đến thiếu hụt amylase, sự loại bỏ tế bào α (tiết glucagon) cùng với tế bào β dẫn đến phản ứng điều hòa ngược lại hạ glucose huyết. -Việc bổ sung kháng sinh và hormon sau phẫu thuật rất tốn kém và yêu cầu mức độ giám sát cao. -Tỷ lệ tử vong tương đối cao hơn.
ĐTĐ do di truyền	-Có tính chọn lọc cao và có thể làm sáng tỏ một gen duy nhất. -Giải phẫu di truyền phức tạp của bệnh ĐTĐ tuýp 2 dễ dàng hơn.	Mô hình này rất phức tạp và tốn kém để phát triển.

Từ những thông tin tổng quan và các ưu, nhược điểm của các mô hình ĐTĐ trên động vật kết hợp với điều kiện thực tế thực hiện luận án, mô hình ĐTĐ do hóa chất được lựa chọn thực hiện trong luận án. Trong số hai hóa chất được sử dụng phổ biến là STZ và alloxan, STZ được chọn do STZ có nhiều ưu điểm rõ ràng hơn alloxan như tỷ lệ tử vong thấp, mô phỏng được các cơ chế bệnh sinh ĐTĐ, khả năng gây ra tình trạng bệnh ĐTĐ không thể hồi phục và tính chọn lọc cao đối với tế bào β tuyến tụy. Mô hình gây ĐTĐ bằng alloxan có tỷ lệ thành công thấp hơn, khả năng phục hồi của động vật thí nghiệm cao hơn, khoảng 70% (30% số động vật còn lại hoặc bị tăng glucose huyết có thể hồi phục hoặc tử vong) [120]. Ngoài ra, alloxan có thể gây ra nhiễm ceton ở một số loài động vật. Vì vậy, STZ dần được dùng thay thế cho alloxan để gây mô hình ĐTĐ trên động vật. Một phân tích cho thấy 30,3% các nghiên cứu sử dụng alloxan trong khi đến 57,9% sử dụng STZ làm tác nhân gây ĐTĐ và các tác nhân khác chiếm 11,8% [118]. Tuy nhiên, khi xét về mặt chi phí, có thể cân nhắc lựa chọn alloxan ở giai đoạn sàng lọc nhanh trên *in vivo* các tác nhân có khả năng hạ glucose huyết do giá thành alloxan rẻ hơn STZ; sau đó, STZ là lựa chọn để nghiên cứu xác định tác dụng và cơ chế.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1.1. Cao chiết và hợp chất

Hạt chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman) được thu tại tỉnh Ninh Thuận vào tháng 4/2020 và được xác định tên khoa học bởi Thạc sĩ Lê Đức Thanh (Phòng Tài nguyên và Phát triển Dược liệu, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh) (Phiếu giám định mẫu nghiên cứu ở **Phụ lục 1**).

Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn (Cao chiết có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt nhất trong số 5 cao chiết được đánh giá-**Phụ lục 2**) và hai hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn bao gồm afzelechin và coniferaldehyd (Hai hợp chất phân lập có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt hơn trong số 6 hợp chất phân lập được đánh giá-**Phụ lục 3**). Quy trình chuẩn bị các cao chiết được trình bày ở **Phụ lục 4**. Quy trình phân lập các hợp chất được trình bày ở **Phụ lục 5**. Cao chiết và các hợp chất phân lập được cung cấp bởi Phòng Hóa-Chế phẩm, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh.

2.1.1.2. Thiết kế liều thử nghiệm

Do chưa tìm thấy thông tin rõ ràng và chính xác về liều sử dụng hạt chuối cô đơn trên người cũng như liều của các dạng dùng (ví dụ như cao chiết) từ hạt chuối cô đơn trong các công bố khoa học trên động vật. Theo thông tin truyền miệng cho thấy người dân (đặc biệt người dân vùng thu nguyên liệu nghiên cứu) thường sử dụng từ 10-20 g hạt chuối cô đơn để chữa bệnh. Từ đó cho thấy việc thăm dò liều có tác dụng của dược liệu này là cần thiết. Trong nghiên cứu này, thực nghiệm dung nạp glucose đường uống (OGTT) trên chuột bình thường và mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin (STZ) được áp dụng để đánh giá tác dụng làm giảm nồng độ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn ở các liều khác nhau bao gồm 12,5; 25 và 50 mg/kg (tương đương với 2,5; 5 và 10 g dược liệu khô/kg) và các liều này vẫn nằm trong khoảng an toàn từ kết quả độc tính cấp đường uống (**Phụ lục 6**). Liều có tác dụng tốt hơn tiếp tục được đánh giá ở các thử nghiệm tiếp theo và xác định cơ chế tác dụng hạ glucose huyết.

2.1.1.3. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng đực trưởng thành, khỏe mạnh (5-6 tuần tuổi) chủng *Swiss albino* được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC), Nha Trang. Chuột được nuôi ổn định ở điều kiện phòng thí nghiệm ít nhất 1 tuần trước khi thí nghiệm. Chuột được nuôi trong các lồng nhựa kích thước 33×21×15 cm ở phòng nuôi động vật ở điều kiện duy trì nhiệt độ 25 ± 1 °C với độ ẩm $65 \pm 5\%$ và chu kỳ 12 giờ sáng-tối (sáng từ 6:00 - 18:00). Chuột được cung cấp thực phẩm dạng viên tiêu chuẩn (IVAC), nước uống tự do, đầy đủ. Thể tích cho chuột uống là 10 ml/kg thể trọng vào khoảng 8-9 giờ sáng. Các thí nghiệm trên động vật tuân thủ “Hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm”, các phương pháp nghiên cứu trên động vật thí nghiệm trong luận án đã được phê duyệt bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh (Mã số: 591/GCN-HĐĐDNCTĐV, **Phụ lục 7**).

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ và thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

2.1.2.1. Hóa chất

Bảng 2.1. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

STT	Hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
<i>Hóa chất</i>			
1	Acid ethylenediaminetetraacetic (EDTA)	Bio Basic	Canada
2	Acid phosphorid	Xilong	Trung Quốc
3	Acid trichloacetic	GHTECH	Trung Quốc
4	Acrylamid	Sigma-Aldrich	Trung Quốc
5	Albumin huyết thanh bò (BSA)	Thermo Fisher Scientific	Mỹ
6	Ammonium persulphat	Sigma-Aldrich	Nhật Bản
7	Bisacrylamid	Bio Basic	Canada
8	Calci chlorid (CaCl ₂)	Xilong	Trung Quốc
9	Chất ức chế protease (Dạng viên)	Sigma-Aldrich	Đức
10	Collagenase II	Gibco	Mỹ
11	Đệm phosphat (Dạng viên)	Sigma-Aldrich	Mỹ
12	D-glucose	Sigma-Aldrich	Mỹ
13	Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Merck	Đức
14	Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	Mỹ

STT	Hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
15	Dung dịch đệm phosphat	Gibco	Mỹ
16	Dung dịch formol đệm trung tính 10% (NBF)	Thermo Fisher Scientific	Mỹ
17	Dung dịch muối cân bằng Hanks (HBSS) 10X	Gibco	Mỹ
18	Dung dịch phát hiện Western blot hóa phát quang tăng cường (ECL)	Cytiva-HyClone	Mỹ
19	Ethanol	Merck	Đức
20	Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare	Thụy điển
21	Glycin	Bio Basic	Canada
22	Huyết thanh thai bò (FBS)	Gibco	Mỹ
23	Kali chlorid (KCl)	Xilong	Trung Quốc
24	L-glutathion reduced (GSH)	Sigma-Aldrich	Nhật Bản
25	Magie chlorid (MgCl ₂)	Xilong	Trung Quốc
26	Malondialdehyd tetrabutylammonium (MDA)	Sigma-Aldrich	Ấn Độ
27	Methanol	Merck	Đức
28	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin	Gelntam Life Sciences	Anh
29	Natri chlorid (NaCl)	Xilong	Trung Quốc
30	Natri deoxycholat	Bio Basic	Canada
31	Natri hydrocarbonat	Xilong	Trung Quốc
32	Penicilin-streptomycin	Gibco	Mỹ
33	Phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Bio Basic	Canada
34	Phosphatase inhibitor cocktails 2 Phosphatase inhibitor cocktails 3	Sigma-Aldrich	Israel
35	Protein tyrosin phosphatase 1B (người, tái tổ hợp)	Enzo Life Sciences	Mỹ
36	Ringer lactat	B.Braun	Việt Nam
37	RPMI 1640	Gibco	Mỹ
38	Sodium dodecyl sulphat (SDS)	Bio Basic	Canada
39	Streptozotocin (STZ)	Sigma-Aldrich	Anh
40	Tris-HCl	Bio Basic	Canada
41	Triton X-100	Bio Basic	Canada
42	α -amylase (Malt)	Himedia	Ấn Độ
43	α -glucosidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich	Mỹ

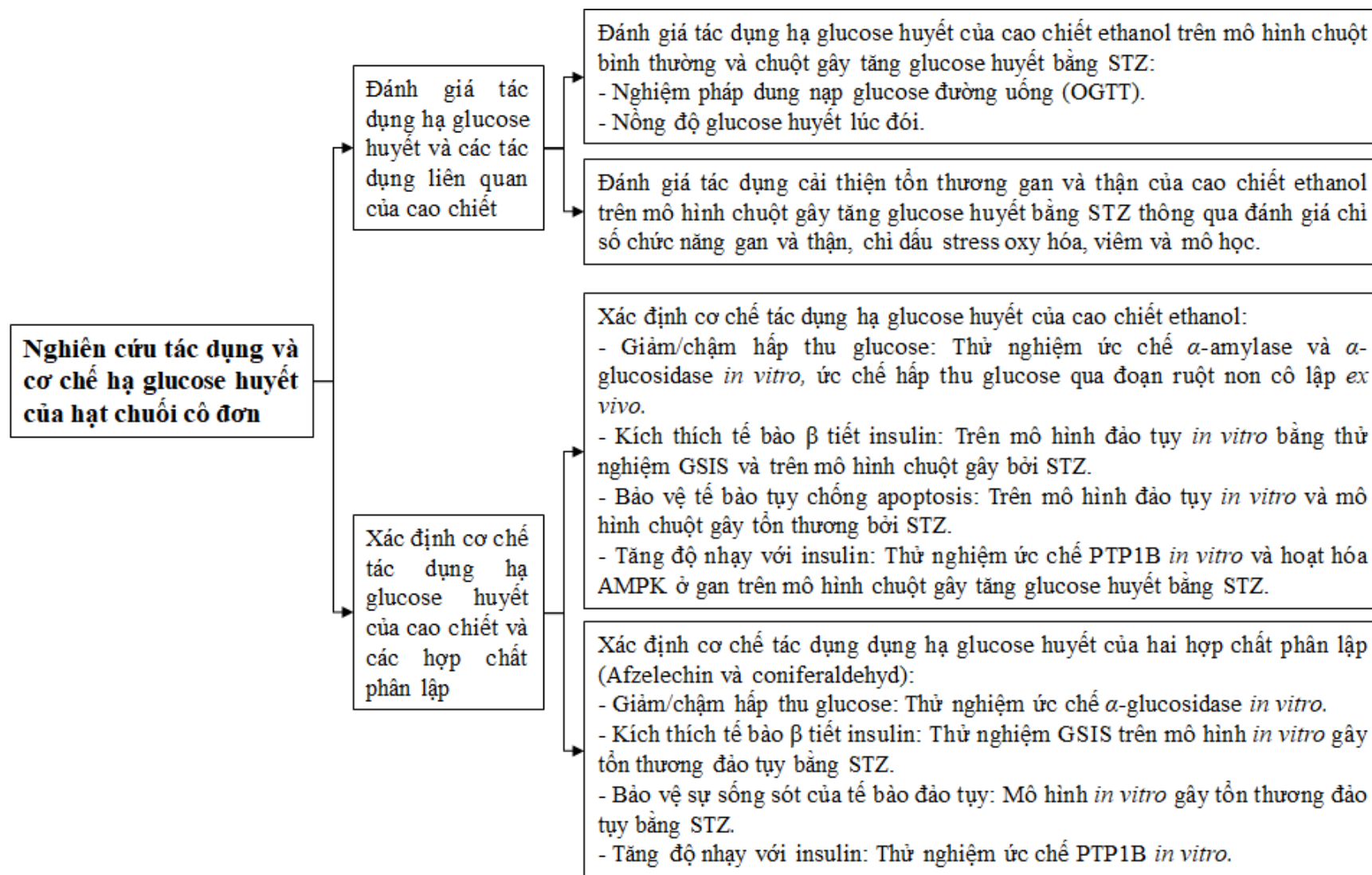
STT	Hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
44	β -mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Mỹ
<i>Thuốc thử</i>			
45	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT)	Sigma-Aldrich	Mỹ
46	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Sigma-Aldrich	Anh
47	Acid thiobarbituric	Sigma-Aldrich	Anh
48	Acid 3,5-dinitrosalicylic (DNSA)	Jinhuada	Trung Quốc
49	Dithizon	Sigma-Aldrich	Mỹ
50	<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (<i>p</i> NPG)	Sigma-Aldrich	Mỹ
51	<i>p</i> -nitrophenyl phosphat (<i>p</i> NPP)	Sigma-Aldrich	Mỹ
52	Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio Basic	Canada
<i>Bộ kit định lượng</i>			
53	Glucose GOD-PAP	Erba	Đức
54	Human Insulin ELISA (ab100578)	Abcam	Anh
55	LEGEND MAX Mouse IL-6 ELISA (431307)	BioLegend	Mỹ
56	LEGEND MAX Mouse TNF- α ELISA (430907)	BioLegend	Mỹ
57	Mouse Insulin ELISA (10-1247-01)	Mercodia	Thụy Điển
<i>Thuốc đối chiếu</i>			
58	Acarbose (A8980)	Sigma-Aldrich	Mỹ
59	Acid ursolic	Sigma-Aldrich	Mỹ
60	Glibenclamid (Số lô 00721, hạn sử dụng 18/10/2025)	Công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Domesco	Việt Nam
61	Glimepirid (Bột nguyên liệu)	Công ty TNHH Liên doanh Stellapharm	Việt Nam
62	Glucobay 50 (Số lô 81009448)	Bayer Pharma AG	Đức
63	Phloridzin dihydrat (>99%)	Sigma-Aldrich	Mỹ
<i>Kháng thể</i>			
64	Kháng thể kháng: Bcl-2 (633501), Bax (633801)	BioLegend	Mỹ

STT	Hóa chất	Hãng sản xuất	Nước sản xuất
65	Kháng thể kháng: Cytochrom C (CytC) (4272S), Cleaved caspase-3 (9664S), Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (9532S), p-p38 MAPK (9211S), p-AMPK (2535S), p-AMPK (2535S), α -tubulin (2144S)	Cell Signaling Technology	Mỹ
66	Kháng thể kháng: ERK1/2 (sc-514302), NF- κ B p65 (sc-8008), β -actin (sc-4778),	Santa Cruz Biotechnology	Mỹ
67	Kháng thể kháng: GAPDH (CB1001)	Merck	Đức
68	Kháng thể kháng: JNK1 (3496-1)	Epitomics	Mỹ
69	Kháng thể liên hợp HRP kháng: IgG thỏ (7074S), IgG chuột (7076).	Cell Signaling Technology	Mỹ

2.1.2.2. Thiết bị và dụng cụ

- Bể ủ nhiệt DK - 8D (BOXUN, Trung Quốc).
- Bộ điện di protein (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Mỹ).
- Cân kỹ thuật Radwag PS 510.R1, cân phân tích Radwag AS 220.R1 (Radwag, Ba Lan).
- Kính hiển vi huỳnh quang soi ngược (Eclipse Ts2R-FL (Nikon, Trung Quốc).
- Máy chụp quang hóa Imagequant Las 500 (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Mỹ).
- Máy đọc đĩa Multifunctional ELISA System (BioTek, Mỹ).
- Máy lắc tròn (Digisystem Laboratory, Đài Loan).
- Máy lắc ủ nhiệt (Grant Instruments, Anh).
- Máy ly tâm lạnh 5430R (Eppendorf, Đức), máy ly tâm EBA 200 (Hettich, Đức).
- Máy nghiền mô SpeedMill PLUS (Analytik Jena, Đức).
- Máy phân tích máu tự động (Alinity Abbott, Abbott Laboratories, IL, Mỹ).
- Tủ lạnh âm sâu (-80 °C) PHCPI (Panasonic, Nhật Bản)
- Tủ nuôi cấy tế bào (Esco Lifesciences, Singapore), tủ an toàn sinh học cấp II (Azbil Telstar, Tây Ban Nha), buồng đếm tế bào Neubauer (Marienfeld, Đức).
- Đĩa 6 giếng, 96 giếng, màng lọc tế bào nylon 70 nm (SPL Life Sciences, Hàn Quốc).
- Màng nitrocellulose, giấy hỗ trợ chuyển màng (Cytiva Sweden, Đức).
- Micropipet cơ, micropipet đa kênh điện tử các loại (Eppendorf, Đức).
- Phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0 (Cytiva, Mỹ), phần mềm NIS Elements v5.20 (Nikon, Trung Quốc), phần mềm Gen5 (BioTek, Mỹ).

2.2. Nội dung nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Mục tiêu 1: Đánh giá tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm.

- Đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) trên chuột bình thường.
- Đánh giá tác dụng hạ glucose huyết và cải thiện chức năng gan, thận của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.

Mục tiêu 2: Xác định cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm.

- Cơ chế tác dụng làm giảm hoặc chậm hấp thu glucose: Tác dụng ức chế α -amylase *in vitro* của cao chiết ethanol; ức chế α -glucosidase *in vitro* của cao chiết ethanol và hai hợp chất phân lập (Afzelechin và coniferaldehyd); ức chế hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập *ex vivo* của cao chiết ethanol.
- Cơ chế tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin: Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol và hai hợp chất phân lập bằng thử nghiệm tiết insulin được kích thích bởi glucose (GSIS) *in vitro* trên mô hình tiểu đảo tụy; của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.
- Cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào tụy: Tác dụng chống apoptosis của cao chiết ethanol và hai hợp chất phân lập trên mô hình *in vitro* gây tổn thương tiểu đảo tụy bởi STZ; của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.
- Cơ chế tác dụng làm tăng độ nhạy cảm với insulin: Tác dụng ức chế PTP1B *in vitro* của cao chiết ethanol và hai hợp chất phân lập; hoạt hóa AMPK ở gan của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

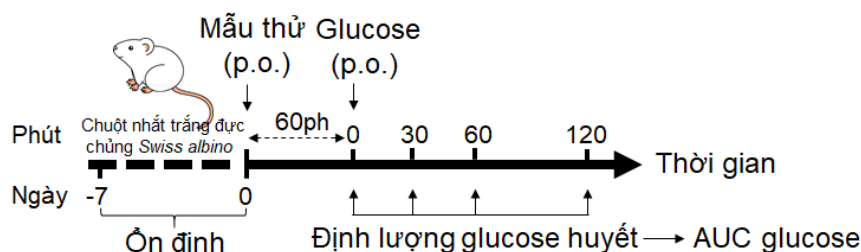
2.3.1. Thử nghiệm dung nạp glucose đường uống

Nguyên tắc: Trên mô hình động vật, thử nghiệm này cho phép đánh giá tác dụng hạ glucose huyết sau khi quá tải glucose bằng đường uống của mẫu nghiên cứu thông qua khả năng hấp thu glucose vào tế bào của cơ thể. Chuột nhắt trắng được cho uống glucose liều 2 g/kg và nồng độ glucose huyết được đo tại một số thời điểm trong 120 phút [121].

Tiến hành: Chuột nhắt trắng đực được nuôi ổn định ở điều kiện phòng thí nghiệm, xác định nồng độ glucose huyết lúc đói trước thử nghiệm, chuột được chia ngẫu nhiên thành các lô ($n = 8$) như sau:

- Lô chứng sinh lý: Chuột được uống nước cất.
- Các lô thử: Chuột được uống cao chiết ethanol ở các liều khác nhau (12,5, 25, 50 mg/kg).
- Lô đối chiếu: Chuột được uống glibenclamid liều 5 mg/kg [117].

Chuột được cho nhịn đói (nước uống đầy đủ) qua đêm (14 giờ), thực nghiệm OGTT được thực hiện sau một giờ cho uống mẫu thử. Nồng độ glucose huyết được xác định tại các thời điểm 0 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi uống glucose liều 2 g/kg [117]. Tác dụng của cao chiết ethanol được đánh giá theo thiết kế thử nghiệm được thể hiện trong **hình 2.2**.



Hình 2.2. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột bình thường

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Nồng độ glucose huyết (C) ở các thời điểm được định lượng bằng bộ kit GOD-PAP (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 8*);
- Phần trăm hạ glucose huyết so với lô chứng ở cùng thời điểm: ($\downarrow a\%$) = $[(C_{\text{chứng}} - C_{\text{thử}})/C_{\text{chứng}}] \times 100$;
- Sự tồn lưu glucose trong máu của chuột sau 120 phút dung nạp thông qua chỉ số diện tích dưới đường cong (AUC) của glucose [122]: AUC glucose (mg/dl×phút) = $[(C_0 + C_{30}) \div 2] \times (t_{30} - t_0) + [(C_{30} + C_{60}) \div 2] \times (t_{60} - t_{30}) + [(C_{60} + C_{120}) \div 2] \times (t_{120} - t_{60})$. Trong đó, C_0 , C_{30} , C_{60} , C_{120} là nồng độ glucose huyết tương ứng ở các thời điểm 0 phút (t_0), 30 phút (t_{30}), 60 phút (t_{60}) và 120 phút (t_{120}).

2.3.2. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol trên chuột nhắt trắng gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

Nguyên tắc: Streptozotocin (STZ) là tác nhân thường được sử dụng trong gây mô hình tăng glucose huyết thực nghiệm. STZ gây tổn thương và chết các tế bào β tiểu đảo tụy, dẫn đến khiếm khuyết tổng hợp và tiết insulin; giảm độ nhạy cảm với insulin ở các tế bào mô đích, kết quả là glucose trong máu tăng [109]. Bên cạnh đó, giảm chức năng gan và thận do STZ và/hoặc tăng glucose huyết mạn tính đã được báo cáo [123],[124]. Do đó, mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ được áp dụng để nghiên cứu tác dụng của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn.

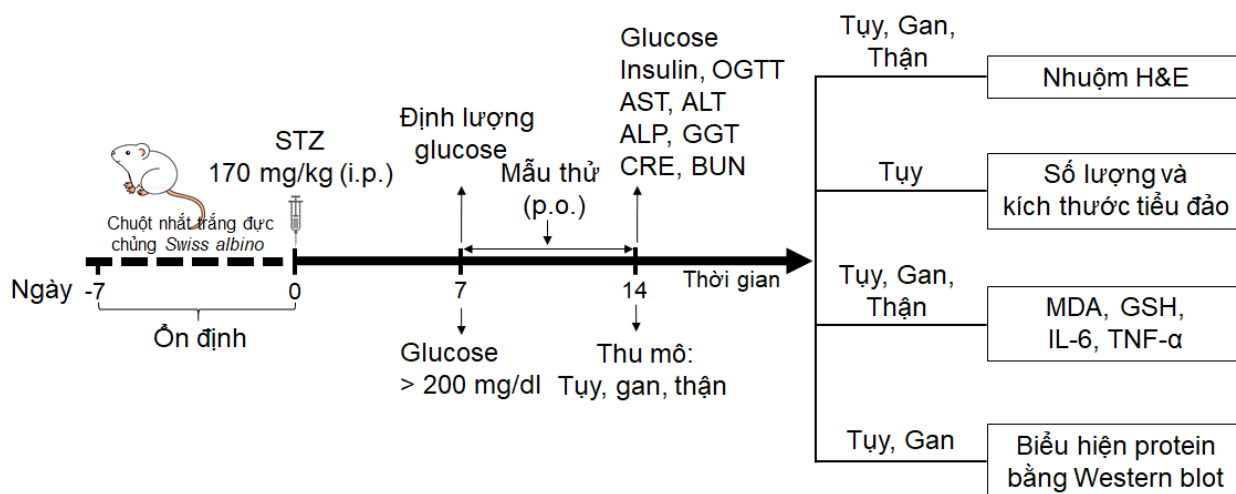
Tiến hành: Chuột nhắt trắng đực được cho nhịn đói (nước uống đầy đủ) qua đêm (16 giờ), máu đuôi chuột được thu để xác định glucose huyết lúc đói (nồng độ ban đầu). Những con chuột có nồng độ glucose huyết bình thường được tiêm màng bụng (i.p.) STZ một liều cao duy nhất 170 mg/kg [117] (STZ được pha trong dung dịch natri citrat 0,1 M, pH = 4,5, pha ngay trước khi tiêm). Vào ngày thứ 7, máu đuôi chuột được thu để xác định nồng độ glucose huyết lúc đói, những con chuột có nồng độ glucose huyết cao hơn 200 mg/dl [125] được chọn vào thử nghiệm. Những con chuột được chia vào lô chứng sinh lý được tiêm (i.p.) dung dịch natri citrat 0,1 M, pH = 4,5 cùng thời điểm với tiêm STZ.

Chuột được chia ngẫu nhiên thành các lô ($n = 9$) như sau:

- Lô 1 (Chứng sinh lý): Chuột bình thường được uống nước cất.
- Lô 2 (Chứng bệnh lý): Chuột tăng glucose huyết được uống nước cất.
- Lô 3 (Thử): Chuột tăng glucose huyết được uống cao chiết liều 12,5 mg/kg/ngày.
- Lô 4 (Thử): Chuột tăng glucose huyết được uống cao chiết liều 25 mg/kg/ngày.
- Lô 5 (Thử): Chuột tăng glucose huyết được uống cao chiết liều 50 mg/kg/ngày.
- Lô 6 (Đôi chiếu): Chuột tăng glucose huyết được uống glibenclamid 5 mg/kg/ngày [117].

Chuột được cho uống các mẫu thử tương ứng ở các lô mỗi ngày một lần vào các buổi sáng trong 7 ngày liên tục. Sau 1 giờ uống ở ngày thứ 7, máu đuôi chuột được thu để xác định nồng độ glucose và nồng độ insulin trong huyết tương. Sau đó, thực nghiệm OGTT được tiến hành. Thiết kế thí nghiệm được lặp lại, sau 1 giờ uống ở ngày thứ 7, máu tim chuột được thu để xác định nồng độ AST, ALT, ALP, GGT, creatinin và BUN trong huyết

thanh. Kết thúc thí nghiệm, một số mô tụy, gan và thận được thu và cho vào dung dịch bảo quản để thực hiện nhuộm mô, một số mô được bảo quản ở -80 °C cho đến khi sử dụng để xét nghiệm hóa sinh và kiểm tra sự biểu hiện protein.



Hình 2.3. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol trên mô hình chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi STZ

Hình tóm tắt các chỉ tiêu đánh giá cho tất cả các lần thử nghiệm

Các chỉ tiêu đánh giá:

Đánh giá tác dụng hạ glucose huyết:

- Nồng độ glucose huyết (C) lúc đói;
- Thử nghiệm dung nạp glucose đường uống (OGTT).

Đánh giá tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận:

- Chỉ số sinh hóa: AST, ALT, ALP, GGT, creatinin và BUN trong huyết thanh;
- Xét nghiệm mô bệnh học gan và thận;
- Hàm lượng chỉ dấu stress oxy hóa ở mô gan và thận: MDA và GSH;
- Hàm lượng chỉ dấu viêm ở mô gan và thận: TNF- α và IL-6.

Đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin:

- Nồng độ insulin huyết lúc đói.

Đánh giá tác dụng bảo vệ tụy:

- Kích thước và số lượng tiểu đảo tụy;

- Mức độ biểu hiện của một số protein trong con đường apoptosis tế bào ở mô tụy;
- Hàm lượng chỉ dấu stress oxy hóa ở mô tụy: MDA và GSH;
- Hàm lượng chỉ dấu viêm ở mô tụy: TNF- α và IL-6.

Đánh giá tác dụng tăng nhạy cảm với insulin:

- Mức độ biểu hiện của p-AMPK ở mô gan.

Phương pháp xác định các chỉ tiêu đánh giá

Nồng độ glucose huyết lúc đói

- Máu đuôi chuột (10 μ l) được thu vào cho vào ống có chứa chất chống đông EDTA 2% (1: 1 v/v). 5 μ l huyết tương được sử dụng để xác định nồng độ glucose huyết (C) bằng bộ kit GOD-PAP (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 8*).
- Phần trăm hạ glucose huyết so với lô chứng bệnh lý: ($\downarrow$ a%) = $[(C_{\text{chứng bệnh lý}} - C_{\text{thử}})/C_{\text{chứng bệnh lý}}] \times 100$.
- Phần trăm hạ glucose huyết so với trước điều trị: ($\downarrow$ b%) = $[(C_{\text{trước điều trị}} - C_{\text{sau điều trị}})/C_{\text{trước điều trị}}] \times 100$.

Thực nghiệm dung nạp glucose đường uống

Thực nghiệm OGTT được tiến hành tương tự ở **mục 2.3.1** sau 7 ngày điều trị với các chỉ tiêu đánh giá tương tự bao gồm:

- Nồng độ glucose huyết ở các thời điểm;
- Phần trăm hạ glucose huyết so với lô chứng bệnh lý ở cùng thời điểm;
- Sự tồn lưu glucose trong máu của chuột sau 120 phút dung nạp thông qua chỉ số AUC glucose.

Nồng độ insulin huyết lúc đói

Máu đuôi chuột (10 μ l) được thu vào ống có chứa chất chống đông EDTA 2% (1: 1 v/v). 10 μ l huyết tương được sử dụng để xác định nồng độ insulin huyết bằng bộ kit Mouse ELISA Insulin Kit (Mercodia) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (**Phụ lục 9**).

Dựa vào nồng độ glucose và nồng độ insulin huyết lúc đói, chỉ số chức năng tế bào β HOMA- β được tính toán: $\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{FPI})/(\text{FPG} - 3,5)$. Trong đó, FPI là nồng độ insulin huyết lúc đói (μ IU/ml) và FPG là nồng độ glucose huyết lúc đói (mmol/l) [126].

Nồng độ các chỉ số sinh hóa gan, thận

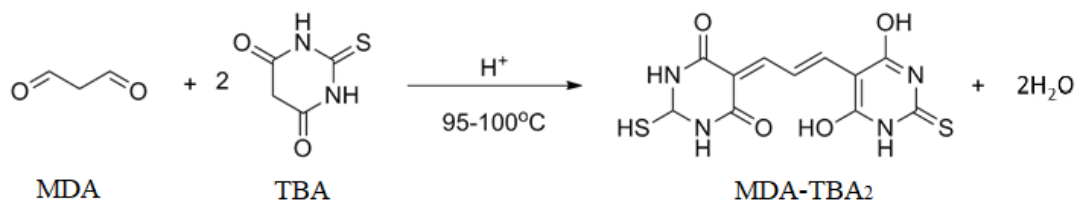
500 µl máu từ tim chuột được thu vào ống có chứa hạt silica, máu được đông ở nhiệt độ phòng khoảng 30-60 phút và ly tâm với tốc độ 5000 rpm trong 5 phút để thu huyết thanh. Nồng độ AST, ALT, ALP, GGT, creatinin và BUN được đo bằng máy phân tích máu tự động (Alinity Abbott, Abbott Laboratories, IL, Mỹ) tại Khoa xét nghiệm-Trung tâm Y khoa Medic Hòa Hảo TP. Hồ Chí Minh (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 10*).

Xét nghiệm mô bệnh học

Phương pháp nhuộm mô hematoxylin-eosin (H&E) thường quy được áp dụng (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 11*). Mô gan, thận và tụy ($n = 6$) sau khi lọc sạch được rửa kỹ bằng dung dịch nước muối sinh lý và chuyển vào dung dịch bảo quản (Neutral Buffered Formalin 10%). Quy trình cắt và nhuộm mô được thực hiện tại Khoa giải phẫu bệnh – Bệnh viện Lê Văn Thịnh, TP. Hồ Chí Minh. Cấu trúc vi thể gan, thận và tụy được đọc bởi TS. BS Lê Minh Huy (Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Dược TP. HCM). Mô gan được quan sát chủ yếu ở vùng khoảng cửa (viêm, thoái hóa tế bào), mô thận được quan sát chủ yếu ở vùng vỏ thận (viêm, bất thường ống thận, cầu thận, bể thận, mô kẽ) dưới kính hiển vi. Mô tụy được quan sát chủ yếu ở vùng tiểu đảo tụy, tất cả tiểu đảo tụy quan sát được trên lát cắt đều được đếm và đo diện tích sử dụng kính hiển vi (Nikon Eclipse Ts2R-FL) và phần mềm NIS-Elements (Nikon).

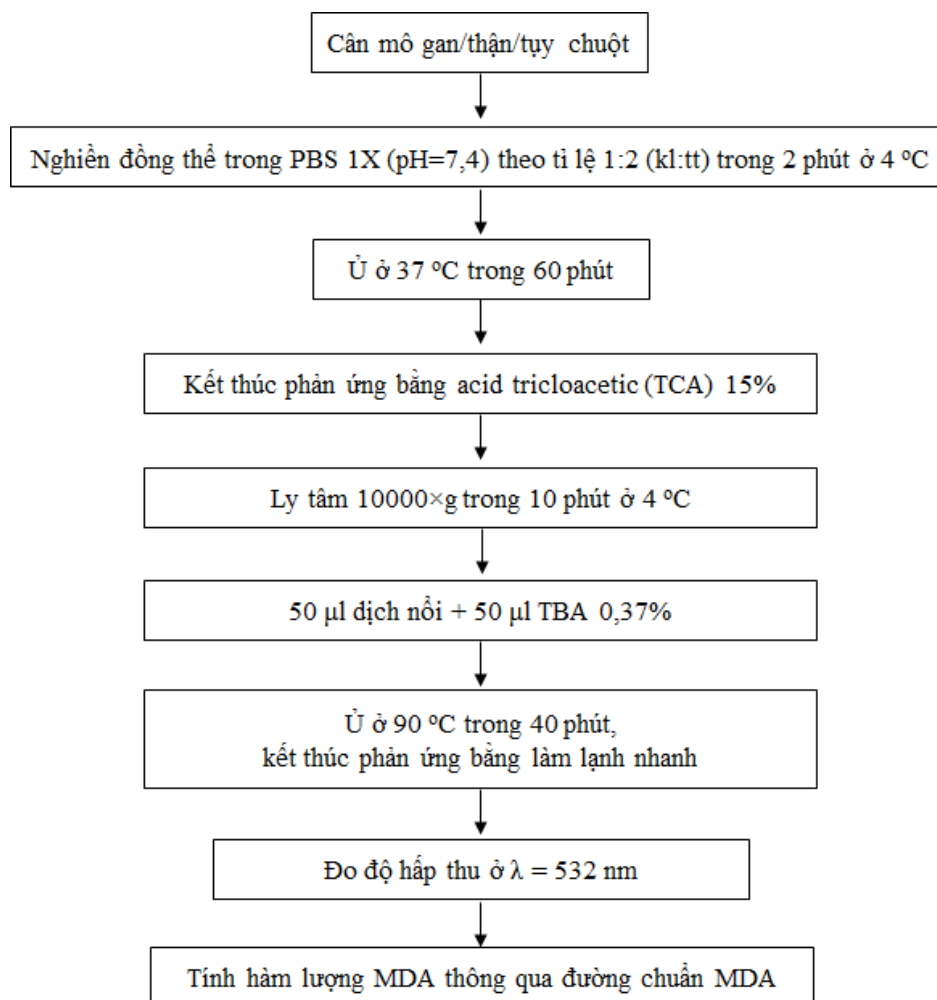
Định lượng malondialdehyd (MDA)

Nguyên tắc: MDA là một sản phẩm của quá trình peroxid hoá lipid tế bào, MDA trong dịch thử phản ứng với acid thiobarbituric (TBA) tạo ra phức MDA-2TBA có màu hồng và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 532 nm. Phản ứng được thực hiện trong điều kiện acid (pH = 4) và 95 °C. Cường độ màu của phức hợp tỉ lệ thuận với hàm lượng MDA có trong mẫu [127].



Hình 2.4. Phản ứng tạo phức giữa MDA và TBA

Tiến hành: Mô gan/thận/tụy chuột ($n = 6$) được sử dụng cho thử nghiệm.



Hình 2.5. Sơ đồ định lượng MDA

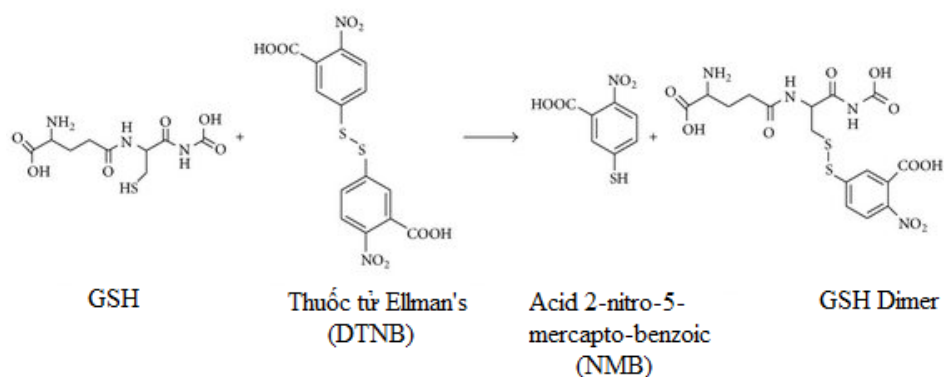
Định lượng protein: Hàm lượng protein (mg/ml) trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Bradford [128] thông qua đường chuẩn BSA (**Phụ lục 12**).

Tính toán: Hàm lượng MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) được tính thông qua đường chuẩn MDA ($y = 0,0058x + 0,0102$; $R^2 = 0,9956$); trong đó, x là nồng độ MDA (μM); y là độ hấp thu ở bước sóng 532 nm (**Phụ lục 13**).

Định lượng glutathion (GSH)

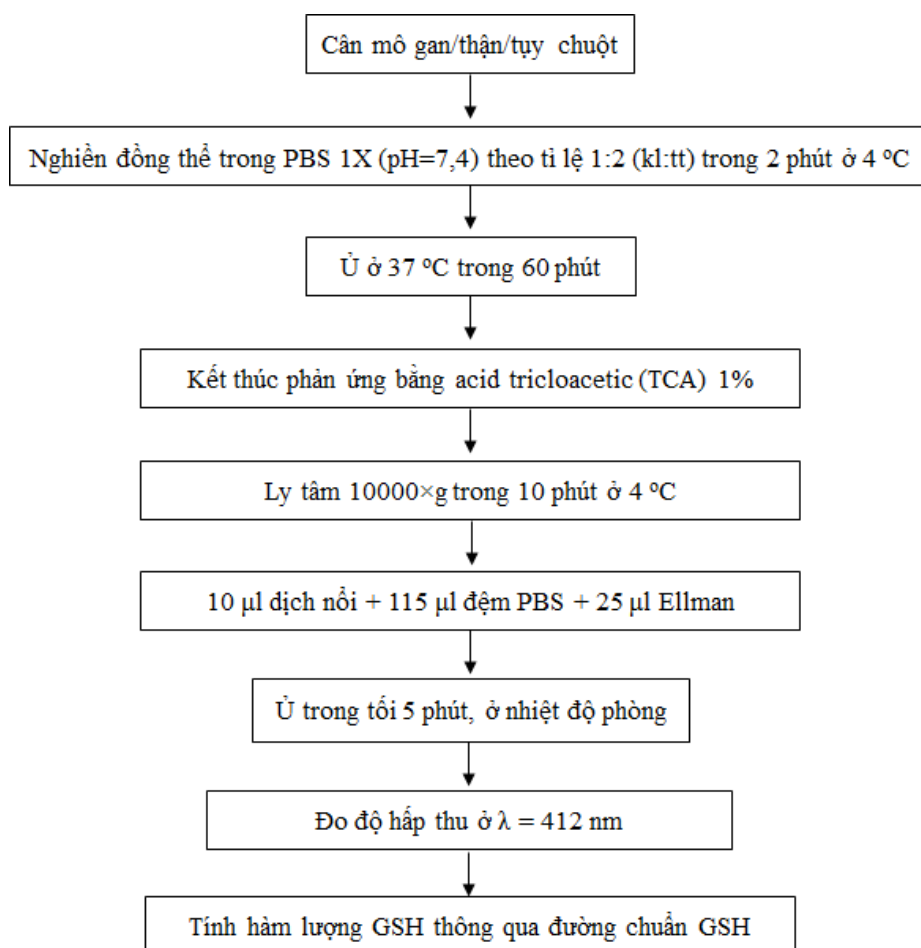
Nguyên tắc: GSH có mặt trong hầu như tất cả các mô của động vật có vú, là chất chống oxy hóa nội sinh và tham gia vào cân bằng nội môi tế bào. GSH phản ứng với thuốc thử Ellman (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) tạo ra phức có màu vàng và có độ hấp thu

cực đại ở bước sóng 412 nm. Cường độ màu của phức hợp tỉ lệ thuận với hàm lượng GSH có trong mẫu [129].



Hình 2.6. Phản ứng tạo phức giữa GSH và DTNB

Tiến hành: Mô gan/thận/tụy chuột ($n = 6$) được sử dụng cho thử nghiệm.



Hình 2.7. Sơ đồ định lượng GSH

Định lượng protein: Hàm lượng protein (mg/ml) trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Bradford thông qua đường chuẩn BSA (**Phụ lục 12**).

Tính toán: Hàm lượng GSH (mmol/mg protein) được tính thông qua đường chuẩn GSH ($y = 0,1141x + 0,0717$; $R^2 = 0,991$); trong đó, x là nồng độ GSH (mM); y là độ hấp thu ở bước sóng 412 nm (**Phụ lục 13**).

Định lượng TNF- α và IL-6

Chuẩn bị dịch đồng thể: Mô ($n = 3$) được đồng thể trong dung dịch đệm có chứa Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 2 M, EDTA 1 mM, Tween 0,01%, PMSF (Phenylmethanesulphonyl fluorid) 1 mM với tỷ lệ 1: 2 (khối lượng: thể tích) đối với gan và thận, 1: 3 (khối lượng: thể tích) đối với tụy. Dịch đồng thể được ly tâm với tốc độ $10000 \times g$ trong 20 phút ở 4 °C. Dịch nổi được thu để định lượng TNF- α và IL-6. Hàm lượng TNF- α và IL-6 trong dịch đồng thể mô gan/thận/tụy được xác định bằng bộ kit Mouse ELISA TNF- α và IL-6 (Biolegend, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 14 và 15*).

Kiểm tra mức độ biểu hiện của một số protein bằng Western blot

Mức độ biểu hiện của một số protein bao gồm Bax, Bcl-2, Cytochrom c, cleaved caspase-3, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), p-p38 MAPK, ERK1/2, JNK1, p-AMPK và NF- κ B p65 ở tụy và p-AMPK ở gan được kiểm tra bằng kỹ thuật Western blot [130], [131].

Thu nhận protein: Mô tụy/gan chuột ($n = 3$) được đồng nhất với tỉ lệ 1: 10 (khối lượng: thể tích) trong dung dịch đệm RIPA lạnh có chứa Tris-HCl 50 mM (pH = 8,0), Triton X100 0,1%, NaCl 150 mM, natri deoxycholat 0,5%, SDS 0,1%, natri orthovanadat 1 M, NaF 1 mM, PMSF 1 mM và phosphatase inhibitor II, III. Sau đó, dịch đồng thể được ủ trên đá lạnh trong 2 giờ để ly giải tế bào. Hỗn hợp được ly tâm ở $16000 \times g$ trong 20 phút ở 4 °C, phần dịch nổi được thu để xác định hàm lượng protein.

Định lượng protein: Hàm lượng protein (mg/ml) trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Bradford thông qua đường chuẩn BSA (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 12*).

Sau khi điều chỉnh hàm lượng protein tương đương giữa các mẫu, hỗn hợp protein được gia nhiệt ở 100 °C trong 5 phút, protein được giữ lạnh trên đá và tiến hành điện di protein.

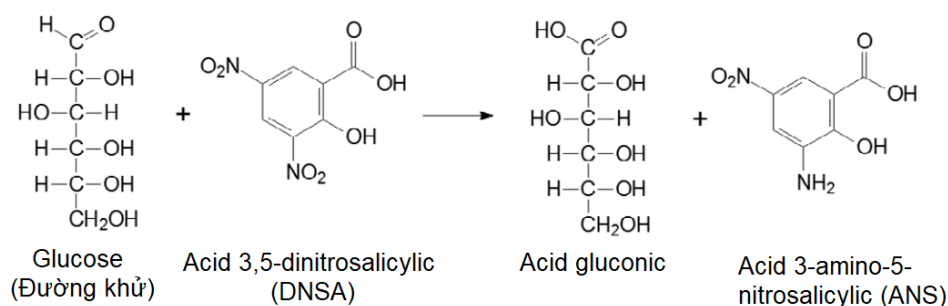
Điện di trên gel SDS-PAGE và chuyển màng: Protein được điện di trên gel sodium dodecyl sulfat-polyacrylamid gel (SDS-PAGE) 10% ở hiệu điện thế 80V trong 30 phút để dải protein về cùng một điểm xuất phát, sau đó quá trình điện di được thực hiện ở hiệu điện thế 125V trong 2 giờ. Protein được chuyển lên màng nitrocellulose ở hiệu điện thế 10V trong 1 giờ. Các dải protein có thể được quan sát sơ bộ bằng cách nhuộm màng với thuốc nhuộm Ponceau S. Màng được rửa với dung dịch giải nhuộm PBS-Tween 20 0,1% (PBS-T) trước khi thực hiện bước tiếp theo.

Xử lý màng lai: Màng được khóa bằng dung dịch sữa gầy 5% trong đệm PBS-T ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, màng được rửa bằng PBS-T 2 lần, mỗi lần 10 phút.

Ủ kháng thể và phát hiện protein: Màng được ủ với các kháng thể kháng protein bao gồm Bcl-2 1: 500 (633501, BioLegend), Bax 1: 500 (633801, BioLegend), Cytochrom C (CytC) 1: 1000 (4272S, Cell Signaling Technology-CST), Cleaved caspase-3 1: 1000 (9664S, CST), Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 1: 1000 (9532S, CST) hoặc GAPDH 1: 1000 (CB1001, Merck); p-p38 MAPK 1: 1000 (9211S, CST), ERK1/2 1: 200 (sc-514302, Santa Cruz), p-AMPK 1: 1000 (2535S, CST), JNK1 1: 1000 (3496-1, Epitomics), NF- κ B p65 1: 200 (sc-8008, Santa Cruz) hoặc β -actin 1: 200 (sc-4778, Santa Cruz) đối với mô tụy, p-AMPK 1: 1000 (2535S, CST) hoặc α -tubulin 1: 1000 (2144S, CST) đối với mô gan trong 20 giờ ở điều kiện mát (5° C). Sau đó, màng lai được rửa bằng PBS-T 3 lần, mỗi lần 10 phút. Màng được ủ với kháng thể liên hợp HRP (Horseradish peroxidase) tương ứng (anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 1: 2000 (7074S, CST) hoặc anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody 1: 2000 (7076, CST)) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và lắc nhẹ. Sau đó, màng lai được rửa bằng PBS-T 3 lần, mỗi lần 10 phút. Dung dịch ECL western blotting (Enhanced chemiluminescence western blotting detection kit) được sử dụng để hiện các dải protein trên màng. Các phức hợp miễn dịch được xác định bằng hóa phát quang sử dụng máy chụp quang hóa ImageQuant Las 500 và phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0 được sử dụng để phân tích hình ảnh.

2.3.3. Thực nghiệm ức chế α -amylase *in vitro*

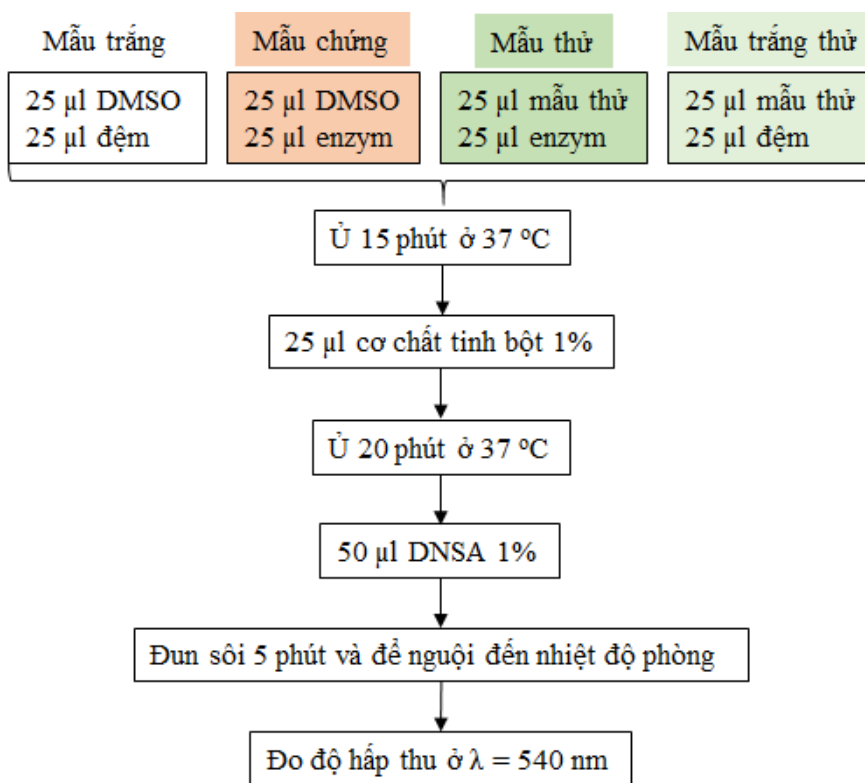
Nguyên tắc: Đường được tạo ra bởi α -amylase thủy phân tinh bột sẽ phản ứng với DNSA (acid 3,5-dinitrosalicylic) tạo thành ANS (acid 3-amino-5-nitrosalicylic). Cường độ màu tỷ lệ thuận với lượng đường tạo ra và hoạt độ α -amylase, độ hấp thu được đo ở bước sóng 540 nm [132].



Hình 2.8. Phản ứng tạo màu giữa đường và DNSA [132]

Tiến hành:

Mẫu thử: Cao chiết ethanol, acarbose (chứng dương).



Hình 2.9. Sơ đồ thử nghiệm ức chế α -amylase

Enzym được pha trong dung dịch đệm natri phosphat 0,02 M có chứa NaCl 6 mM (pH = 6,9) đạt nồng độ 1,25 U/ml. Mẫu thử được pha trong DMSO tạo thành dung dịch gốc có nồng độ 100 mg/ml. Dung dịch đệm phosphat được sử dụng để pha loãng cao chiết và acarbose thu được dãy nồng độ cuối trong thử nghiệm tương ứng là 62,5; 125; 250; 500; 750 µg/ml và 50; 100; 200; 400; 600 µg/ml. Nồng độ DMSO cuối cùng trong phản ứng cao nhất là 0,75% đối với cao chiết và 0,6% đối với acarbose. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ [133].

Đánh giá: Phần trăm ức chế enzym của mẫu thử được tính theo công thức:

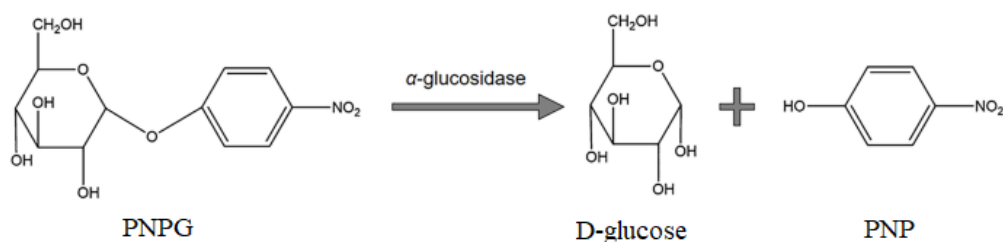
$$I(\%) = \frac{(A_c - A_{0c}) - (A_t - A_{0t})}{(A_c - A_{0c})} \times 100$$

Trong đó, $I(\%)$: Phần trăm ức chế enzym (%); A_c : Độ hấp thu ở mẫu chứng (có enzym, không có chất thử); A_{0c} : Độ hấp thu ở mẫu trắng (không có enzym, không có chất thử); A_t : Độ hấp thu ở mẫu thử (có enzym, có chất thử); A_{0t} : Độ hấp thu ở mẫu trắng thử (không có enzym, có chất thử).

Tác dụng ức chế enzym của mẫu thử được đánh giá theo giá trị IC_{50} , là giá trị nồng độ tại đó mẫu thử ức chế 50% hoạt tính enzym ở điều kiện thí nghiệm và được xác định dựa trên đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc phần trăm ức chế enzym vào log(nồng độ mẫu thử) sử dụng phần mềm GraphPad Prism (8.0.2, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.3.4. Thử nghiệm ức chế α -glucosidase *in vitro*

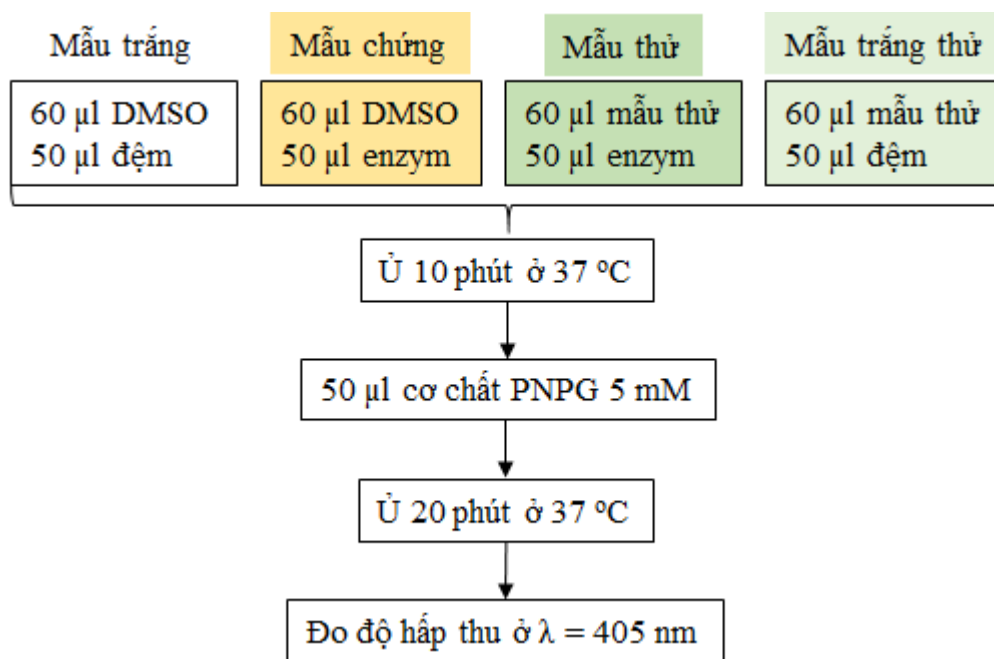
Nguyên tắc: α -glucosidase thủy phân cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (PNPG) tạo ra α -D-glucose và p-nitrophenol (PNP), lượng glucose sinh ra tỉ lệ với PNP. Vì vậy, độ hấp thu của hỗn hợp sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm để định lượng PNP tạo thành [134].



Hình 2.10. Phản ứng thủy phân PNPG bởi α -glucosidase [134]

Tiến hành:

Mẫu thử nghiệm: Cao chiết ethanol, hai hợp chất phân lập (Afzelechin và coniferaldehyd), acarbose (chứng dương).



Hình 2.11. Sơ đồ thử nghiệm ức chế α -glucosidase

Enzym được pha trong dung dịch đệm natri phosphat 0,1 M (pH = 6,8) đạt nồng độ 0,2 U/ml. Các mẫu thử được pha trong DMSO tạo thành dung dịch gốc có nồng độ 100 mg/ml (cao chiết và acarbose) và 10 mg/ml (afzelechin và coniferaldehyd). Dung dịch đệm phosphat được sử dụng để pha loãng cao chiết, acarbose, afzelechin và coniferaldehyd thu được dãy nồng độ cuối trong thử nghiệm tương ứng là 0,78; 1; 1,56; 2; 3,125 μ g/ml; 93,75; 187,5; 375; 750; 1500 μ g/ml; 12,5; 25; 50; 100; 150 μ g/ml và 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 μ g/ml. Nồng độ DMSO cuối cùng trong phản ứng cao nhất là 0,003% đối với cao chiết, 1,5% đối với acarbose và afzelechin, 0,5% đối với coniferaldehyd. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ [133].

Đánh giá: Phần trăm ức chế α -glucosidase và giá trị IC_{50} được tính toán tương tự **mục 2.3.3.**

2.3.5. Thực nghiệm ức chế hấp thu glucose tại ruột non *ex vivo*

Thực nghiệm *ex vivo* ức chế hấp thu glucose qua ruột chuột khỏe mạnh được thực hiện để đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn theo cơ chế làm giảm hoặc chậm hấp thu glucose. Thực nghiệm được thực hiện dựa trên mô hình của Wilson và Wiseman (1954) [135], có thay đổi phù hợp với điều kiện thí nghiệm thực tế.

Nguyên tắc: Glucose được hấp thu tại ruột non theo cơ chế vận chuyển thuận lợi nhờ chất đồng vận chuyển SGLT1, cho phép glucose di chuyển từ tế bào biểu mô ruột vào môi trường ngoại bào gần các mao mạch máu thông qua GLUT2 [76]. Do đó, mô hình đoạn ruột non cô lập được áp dụng để đánh giá tác dụng ức chế hấp thu glucose của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn.

Tiến hành:

Thiết kế các lô thử nghiệm: Chuột được chia thành các lô như sau ($n = 8$):

- Lô 1 (Chứng sinh lý): Ruột được ủ trong dịch ủ ruột có bổ sung dung môi pha mẫu thử.
- Lô 2 (Thử): Ruột được ủ trong dịch ủ ruột có bổ sung cao chiết ethanol ở nồng độ 2,5 mg/ml.
- Lô 3 (Thử): Ruột được ủ trong dịch ủ ruột có bổ sung cao chiết ethanol ở nồng độ 5 mg/ml.
- Lô 4 (Chứng dương): Ruột được ủ trong dịch ủ ruột có bổ sung phloridzin ở nồng độ 50 μ M.

Chuẩn bị các dung dịch thử nghiệm:

- Dịch rửa ruột, cô lập ruột: Dung dịch NaCl 0,9% được làm lạnh ở 5-10 °C và sục khí O₂ 100% liên tục trong ít nhất 1 phút.
- Dịch lộn ngược ruột và dịch điền vào lòng ruột: Hòa tan glucose trong dịch ringer lactat để được dung dịch có nồng độ glucose là 50 mg/dl (Chai 500 ml ringer lactat với mỗi 100 ml chứa: 0,6 g NaCl; 0,04 g KCl; 0,04 g CaCl₂.6H₂O; 0,516 g natri

lactat 60%). Làm lạnh dung dịch trên ở 5-10 °C và sục khí O₂ 100% liên tục trong ít nhất 1 phút.

- Dịch ủ ruột: Pha tương tự dịch lộn ngược ruột, bổ sung phloridzin hoặc cao chiết ethanol và đem ủ trước ở nhiệt độ 37 °C trong 30 phút.

Các giai đoạn thao tác trên ruột chuột:

Bước 1 (Chuẩn bị và cô lập đoạn ruột): Trước khi thử nghiệm, chuột được cho nhịn đói tối thiểu 16 giờ nhưng cho uống nước đầy đủ. Chuột được an tử bằng đá CO₂. Tiến hành mở bụng chuột bằng một đường rạch ở giữa và cô lập đoạn ruột non từ tá tràng đến cuối hồi tràng. Toàn bộ đoạn ruột non được rửa sạch bằng dịch rửa ruột. Sau đó, đoạn ruột được chuyển vào một đĩa petri có chứa sẵn dịch rửa ruột và loại bỏ lớp mạc treo ruột. Một phần đoạn ruột được cắt bỏ, chỉ giữ lại đoạn ruột khoảng 15 cm tính từ đầu hồi tràng.

Bước 2 (Lộn ngược ruột và cho dịch vào túi ruột): Đoạn ruột đã được cô lập được chuyển vào một đĩa petri có chứa sẵn dịch lộn ngược ruột. Tiến hành lộn ngược ruột và cho dịch vào túi ruột theo các bước như sau:

2.1. Luồn một đầu đoạn ruột vào đầu có eo của thanh thép không gỉ dài khoảng 20 cm và buộc chặt bằng chỉ tại vị trí eo.

2.2. Luồn toàn bộ phần ruột qua thanh thép để màng niêm mạc lộ ra phía ngoài.

2.3. Dùng dao cắt một đường vòng quanh đầu ruột có buộc chỉ, cách eo khoảng 1 cm và đẩy ruột ra khỏi thanh thép.

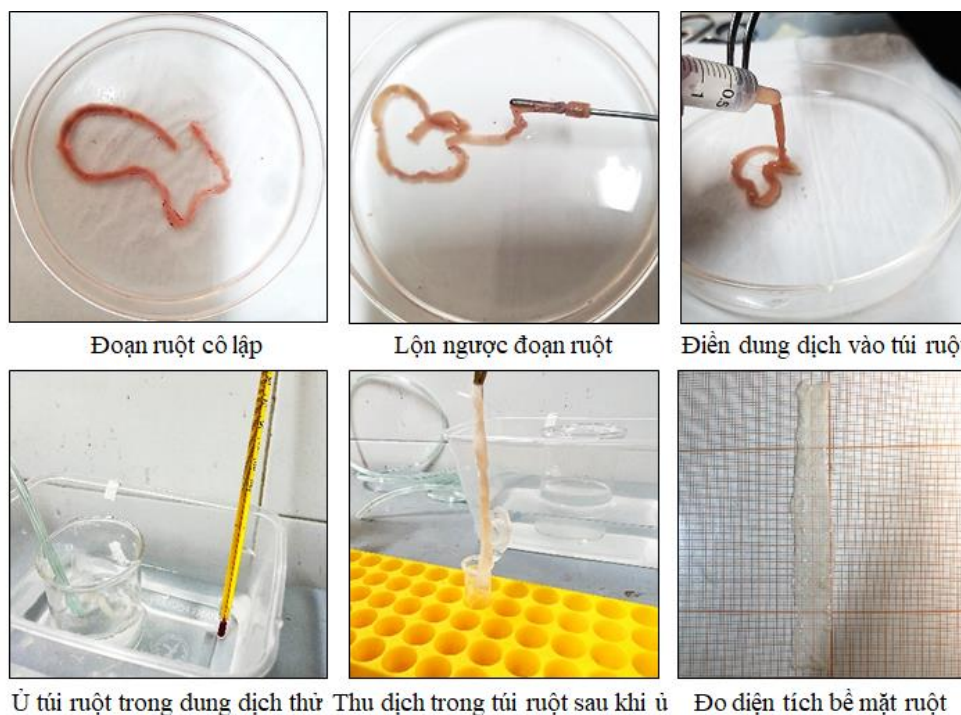
2.4. Buộc một đầu đoạn ruột bằng chỉ, luồn đầu còn lại vào một ống kim tiêm có chứa sẵn dịch điền vào lòng ruột.

2.5. Bơm dịch điền vào lòng ruột sao cho ruột có độ căng phòng phù hợp và dùng chỉ buộc chặt đầu bơm dịch để có một túi ruột dài khoảng 10 cm.

2.6. Kiểm tra độ kín của các mối buộc và độ căng phòng của ruột trước khi đem ủ.

2.7. Chuyển túi ruột vào cốc chứa sẵn 50 ml dung dịch ủ ruột, khí O₂ 100% được sục liên tục trong 120 phút ủ.

Bước 3. Sau khi ủ, đoạn ruột được lấy ra khỏi dịch ủ ruột, thấm hết nước bên ngoài đoạn ruột, dịch trong túi ruột được thu vào một eppendorf qua nhát cắt ở một đầu đoạn ruột. Thể tích dịch và diện tích đoạn ruột tương ứng được đo.



Hình 2.12. Hình ảnh trong quá trình thí nghiệm

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Nồng độ glucose: Sau khi thu mẫu, dịch được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút để tách các tế bào biểu mô ruột rơi ra trong quá trình thí nghiệm, dịch trong được thu để định lượng glucose theo quy trình được tóm tắt ở **phụ lục 8**.
- Tính thấm biểu kiến P_{app} (apparent permeability) đặc trưng cho khả năng hấp thu một chất qua màng ruột [136],[137] và được tính toán theo công thức:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dT \cdot A \cdot C_0} = \frac{V \cdot dC}{dT \cdot A \cdot C_0} \text{ (cm/phút)}$$

Trong đó: dQ : sự thay đổi hàm lượng chất thử nghiệm trong dịch điền ruột trước và sau thí nghiệm (mg); V : thể tích của dịch trong túi ruột (ml); dC : sự tăng nồng độ chất thử nghiệm trong dịch trong túi ruột sau thí nghiệm (mg/dl); dT : thời gian diễn ra thí nghiệm (phút); C_0 : nồng độ dịch ủ ban đầu; A : diện tích bề mặt ruột (cm²).

2.3.6. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin và bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy trên mô hình tiểu đảo tụy *in vitro*

Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol và hai hợp chất phân lập (Afzelechin và coniferaldehyd) từ hạt chuối cô đơn được đánh giá trên mô hình tiểu đảo tụy phân lập *in vitro*, quá trình được tiến hành như sau:

- Phân lập và nuôi cấy tiểu đảo tụy;
- Đánh giá tính đặc hiệu và chức năng tiết insulin của tiểu đảo;
- Đánh giá tác động của cao chiết ethanol, afzelechin và coniferaldehyd lên khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo bằng thử nghiệm MTT;
- Đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin bằng thử nghiệm tiết insulin được kích thích bởi glucose (GSIS, Glucose-stimulated insulin secretion);
- Đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin và bảo vệ tế bào tiểu đảo của cao chiết ethanol, afzelechin và coniferaldehyd trên mô hình gây tổn thương tiểu đảo tụy *in vitro* bằng STZ.

2.3.6.1. Phân lập và nuôi cấy tiểu đảo tụy

Quy trình phân lập và nuôi cấy tiểu đảo tụy được thực hiện theo mô tả trước đây [138],[139] với một số thay đổi phù hợp với điều kiện thí nghiệm thực tế.

- Tuyến tụy từ chuột nhắt trắng được phân lập và cho vào falcon 50 ml chứa 3 ml dung dịch collagenase II 200 U/ml pha trong dung dịch HBSS (Hank's balanced salt solution) vô trùng. Falcon chứa tụy được ủ trong bể nước 37 °C trong 30 phút để có thể tiêu hóa hết đảo tụy. Khi kết thúc quá trình ủ, các falcon được đặt vào bể nước đá và bổ sung 25 ml dung dịch HBSS/ CaCl_2 3 mM vào mỗi ống. Các ống được lắc mạnh 40 lần trong 10 giây.
- Các ống được ly tâm với tốc độ 290×g trong 30 giây ở 4 °C. Phần dịch phía trên được đổ bỏ và phần cặn được hòa trong 20 ml dung dịch HBSS/ CaCl_2 3 mM bằng cách xoay nhẹ trong vài giây.

- Huyền phù được cho qua rây 0,419 mm vào falcon 50 ml mới (Falcon ban đầu được rửa sạch với 5 ml dung dịch HBSS/CaCl₂ 3 mM).
- Các ống tiếp tục được ly tâm với tốc độ 290×g trong 30 giây ở 4 °C. Phần dịch phía trên được đổ bỏ và falcon được úp ngược cẩn thận trên khăn giấy (Lưu ý: Không để các đảo tụy trượt ra và thấm xuống khăn).
- Cẩn được hòa trong 10 ml Ficoll 1077 bằng cách xoáy nhẹ trong vài giây. Lớp phân cách giữa Ficoll 1077 (ở dưới) và 10 ml RPMI (ở trên) được duy trì cẩn thận bằng cách thêm từ từ môi trường từ thành ống với tốc độ 1 ml mỗi 10 giây.
- Falcon được ly tâm với tốc độ 900×g trong 20 phút ở 20 °C với khả năng tăng tốc rất chậm và không phanh.
- Các đảo tụy từ lớp giữa Ficoll/môi trường được thu bằng pipet pasteur nhựa cho vào một falcon mới. Sau đó, môi trường nuôi cấy RPMI 1640 có chứa 10% FBS, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml được bổ sung vào.
- Các ống tiếp tục được ly tâm với tốc độ 290×g trong 5 phút ở 4 °C. Sau đó cẩn đảo tụy được thu thập và hòa trong 5 ml môi trường nuôi cấy.
- Các đảo tụy được lọc qua bộ lọc 70 nm và tráng falcon cũ bằng 4 ml môi trường.
- Môi trường nuôi cấy được thêm sẵn vào đĩa nuôi cấy 6 giếng (3 ml/giếng); sau đó, mặt bộ lọc giữ tiểu đảo được tiếp xúc với môi trường nuôi cấy trong giếng, lưới lọc được rửa với môi trường nuôi cấy.
- Các tiểu đảo phân lập được nuôi trong đĩa nuôi cấy 6 giếng ở 37 °C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Đếm số lượng tiểu đảo, các tiểu đảo có viền mịn, không có tâm tối được nhặt bằng micropipet 200 µl và chia vào các nhóm thử nghiệm.
- Đánh giá tiểu đảo sau phân lập: Quan sát hình thái tiểu đảo sau khi phân lập, đánh giá tính đặc hiệu của các tiểu đảo tụy và chức năng tiết insulin của tiểu đảo tụy sau 24 giờ nuôi cấy.

2.3.6.2. Đánh giá tính đặc hiệu

Nguyên tắc: Dithizon (diphenyl thiocarbazon) là một hóa chất hữu cơ, tạo phức chelat với kẽm trong insulin có ở các tế bào β tụy. Do đó, các tiểu đảo tụy sẽ bị nhuộm màu đỏ hồng trong khi các tế bào ống thì sẽ không bị nhuộm. Phương pháp này giúp xác định số lượng tiểu đảo và hiệu quả của quá trình phân lập hoặc tình chế tiểu đảo tụy [140].

Tiến hành: Tiểu đảo tụy được phân tán trong 1 ml dung dịch đệm Krebs-Ringer bicarbonate (pH=7,4) (KRB), 10 μ l dung dịch Dithizon (10 mg/ml) được thêm vào và ủ ở 37 °C trong 10 phút. Sau đó, các tiểu đảo tụy được quan sát dưới kính hiển vi.

Đánh giá: Quan sát hình thái và tình trạng nhuộm màu [138],[141].

2.3.6.3. Đánh giá chức năng tiểu đảo

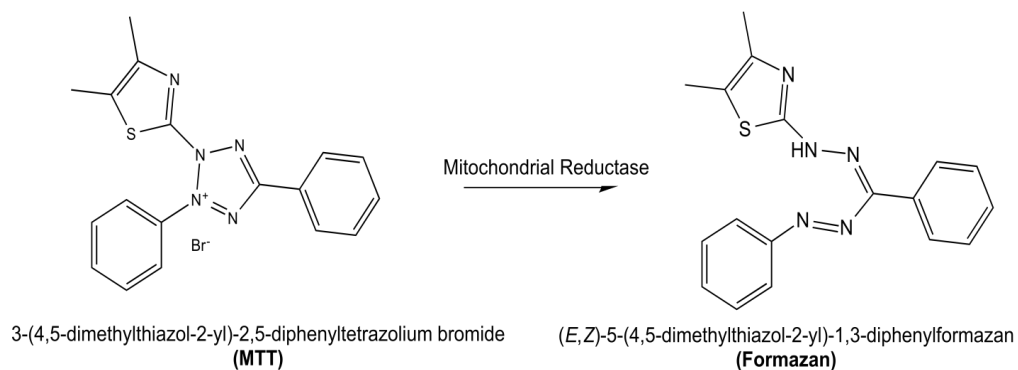
Nguyên tắc: Tế bào β tụy sử dụng glucose để tạo ATP nhằm đóng các kênh kali nhạy cảm ATP (K_{ATP}) gây khử cực màng, kích hoạt kênh calci phụ thuộc điện áp dẫn đến việc gia tăng nồng độ calci nội bào và gây tiết insulin [142].

Tiến hành: Các tiểu đảo được rửa và thu trong dung dịch KRB, 10 tiểu đảo được ủ trong dung dịch KRB có chứa glucose 2,8 mM ở 37 °C trong 1 giờ, sau đó các tiểu đảo này tiếp tục được ủ trong dung dịch KRB có chứa glucose 16,8 mM ở 37 °C trong 1 giờ. Dịch ủ ở 2 điều kiện ủ được thu để định lượng insulin. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá: Hàm lượng insulin được xác định bằng bộ kit Insulin ELISA (Abcam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (**Phụ lục 16**) [143].

2.3.6.4. Thử nghiệm MTT

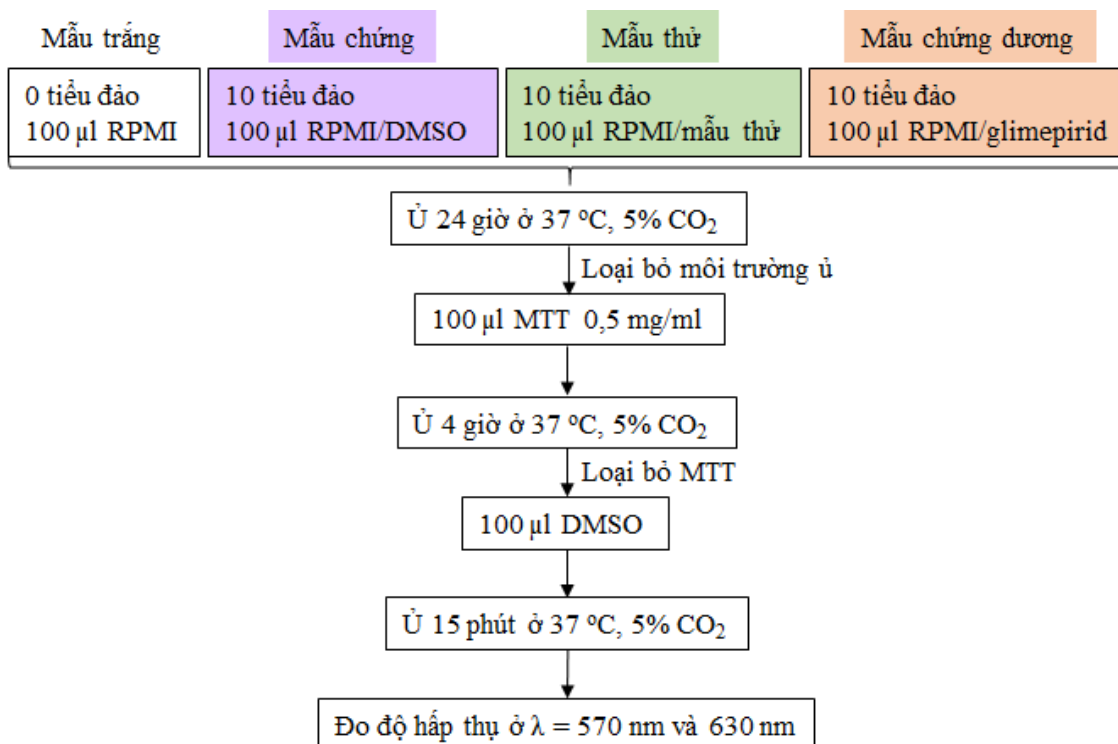
Nguyên tắc: Vòng tetrazolium có trong thuốc thử MTT sẽ gắn vào ty thể của tế bào hoạt động, dưới tác dụng của enzym dehydrogenase trong ty thể tế bào sống, màu vàng của MTT biến đổi thành màu tím của tinh thể formazan [144].



Hình 2.13. Phản ứng tạo tinh thể formazan [145]

Tiến hành:

Mẫu thử: Cao chiết ethanol, hai hợp chất phân lập (Afzelechin và coniferaldehyd) và glimepirid (Chứng dương).



Hình 2.14. Sơ đồ thử nghiệm MTT

Các tiểu đảo có kích thước tương đương nhau (sử dụng chức năng đo diện tích bằng phần mềm NIS-Elements) sẽ được nhặt dưới kính hiển vi để tiến hành thí nghiệm.

Các mẫu thử được pha trong DMSO tạo thành dung dịch gốc có nồng độ 50 mg/ml (cao chiết), 50 mM (Afzelechin và coniferaldehyd) và 10 mM (Glimepirid). Môi trường RPMI được sử dụng để pha loãng cao chiết, afzelechin và coniferaldehyd thu được dãy nồng độ cuối trong thử nghiệm là 12,5; 25; 50; 100 và 500 µg/ml hoặc µM. Glimepirid được pha tương tự để đạt nồng độ cuối trong thử nghiệm là 10 µM. Nồng độ DMSO cuối cùng trong phản ứng cao nhất là 1%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ [144].

Đánh giá: Phần trăm tế bào sống sót được tính theo công thức:

$$\text{Tế bào sống sót (\%)} = \frac{Ab_{thử}}{Ab_{chứng}} \times 100$$

$$Ab = Ab_{570} - Ab_{630} \quad (1)$$

$$Ab_{570} \text{ (hoặc } Ab_{630}) = Ab_{tế bào} - Ab_{trắng} \quad (2)$$

Trong đó,

Ab_{570} : độ hấp thu ở bước sóng 570 nm

$Ab_{trắng}$: độ hấp thu của giếng trắng không có tế bào

Ab_{630} : độ hấp thu ở bước sóng 630 nm

$Ab_{thử}$: độ hấp thu của mẫu thử tính từ (1) và (2)

$Ab_{tế bào}$: độ hấp thu của giếng có tế bào

$Ab_{chứng}$: độ hấp thu mẫu chứng tính từ (1) và (2)

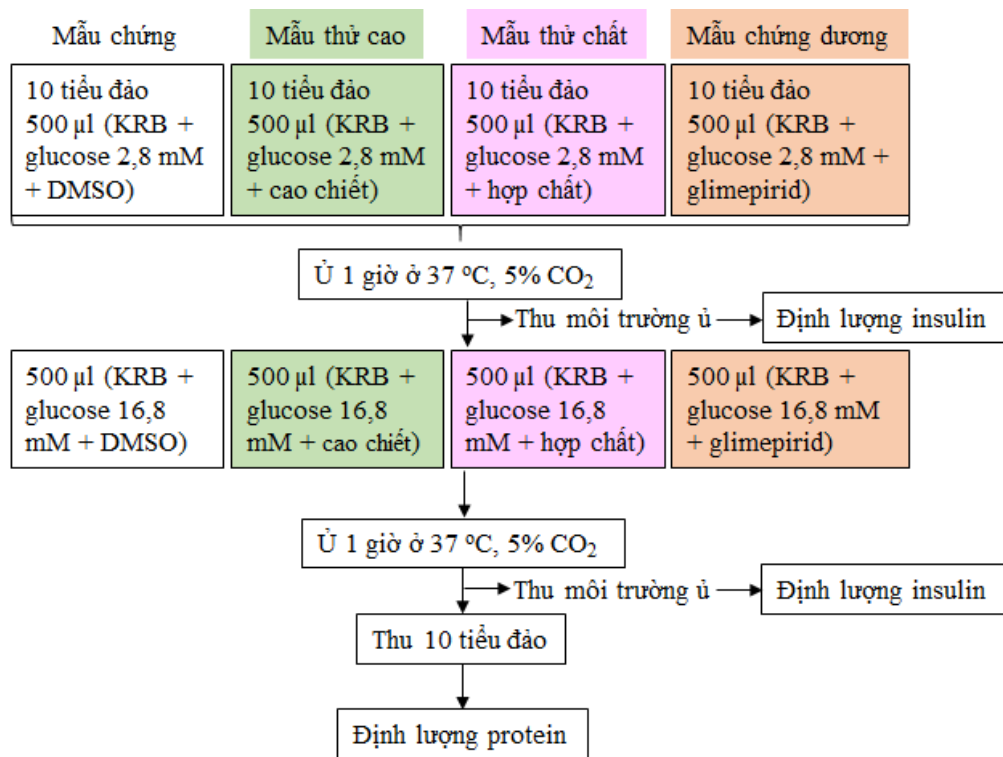
2.3.6.5. Thử nghiệm GSIS

Nguyên tắc: Khi bổ sung nồng độ glucose cao trong môi trường ủ các tiểu đảo tụy, các tế bào β tiểu đảo tụy được kích thích sẽ tăng tiết insulin để đáp ứng với điều kiện glucose cao ở ngoại vi [146],[147].

Tiến hành:

Phân lô thử nghiệm: Các tiểu đảo tụy được chia thành các lô như sau:

- Lô chứng: Tiểu đảo tụy được ủ với DMSO ở nồng độ 0,2%.
- Các lô thử cao chiết: Tiểu đảo tụy được ủ với cao chiết ở các nồng độ khảo sát (12,5; 25; 50 và 100 µg/ml).
- Các lô thử hợp chất: Tiểu đảo tụy được ủ với afzelechin/coniferaldehyd ở các nồng độ khảo sát (12,5; 25; 50 và 100 µM).
- Lô chứng dương: Tiểu đảo tụy được ủ với glimepirid ở nồng độ 10 µM.



Hình 2.15. Sơ đồ thử nghiệm GSIS

Dịch ủ ở 2 điều kiện ủ được thu để định lượng insulin. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ.

Đánh giá: Hàm lượng insulin được xác định bằng bộ kit Insulin ELISA (Abcam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (**Phụ lục 16**).

2.3.6.6. Mô hình thực nghiệm in vitro gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng streptozotocin

Nguyên tắc: STZ là tác nhân được sử dụng phổ biến để gây tổn thương và chết các tế bào β tiểu đảo tụy, dẫn đến khiếm khuyết tổng hợp và tiết insulin trên thực nghiệm [109]. Do đó, mô hình gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ được sử dụng để đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol và hai hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn.

Tiến hành: Các tiểu đảo tụy được chia thành các lô như sau:

- Lô chứng sinh lý: Tiểu đảo tụy được nuôi cấy trong môi trường bổ sung DMSO 0,2% và natri citrat 0,5 mM.
- Lô chứng bệnh lý: Tiểu đảo tụy được nuôi cấy trong môi trường bổ sung DMSO 0,2% và STZ 5 mM [148].

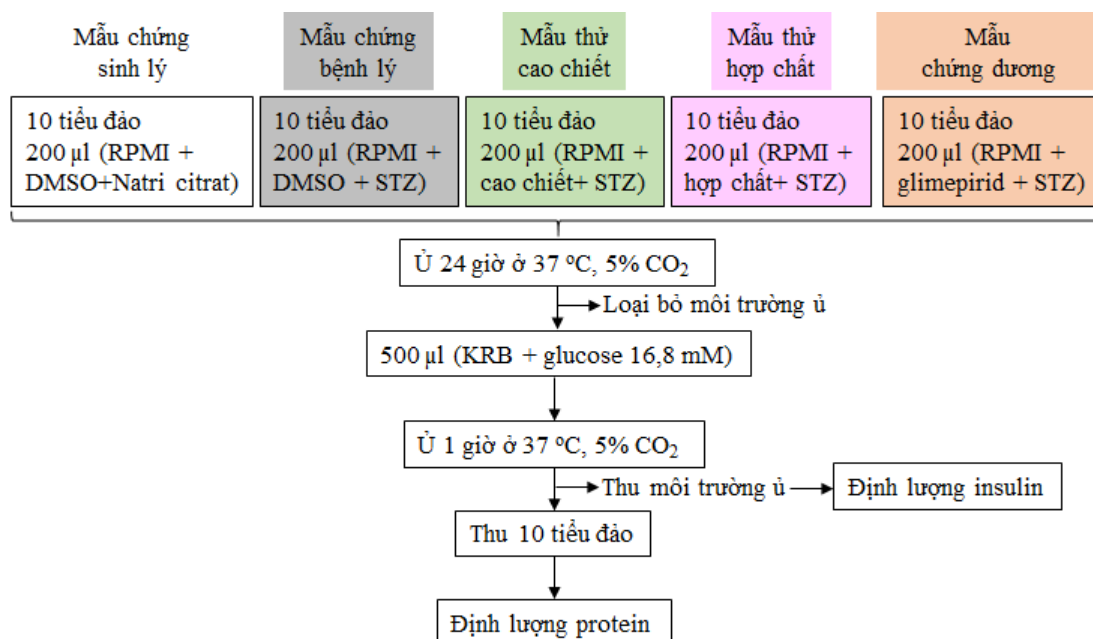
- Các lô thử cao chiết: Tiểu đảo tụy được nuôi cấy trong môi trường bổ sung cao chiết ở các nồng độ khảo sát (50 và 100 $\mu\text{g/ml}$) và STZ 5 mM.
- Các lô thử hợp chất: Tiểu đảo tụy được nuôi cấy trong môi trường bổ sung afzelechin/coniferaldehyd ở các nồng độ khảo sát (50 và 100 μM) và STZ 5 mM.
- Lô chứng dương: Tiểu đảo tụy được nuôi cấy trong môi trường bổ sung glimepirid 10 μM và STZ 5 mM.

Sau 24 giờ ủ ở 37 °C, 5% CO₂, các tiểu đảo tụy được ủ với glucose nồng độ 16,8 mM để kiểm tra mức độ tiết insulin đáp ứng với nồng độ glucose cao; đánh giá khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo và mức độ biểu hiện của một số protein.

Các chỉ tiêu đánh giá:

Đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin

Sau khi các tiểu đảo tụy được ủ ở điều kiện nồng độ glucose cao, dịch ủ được thu để định lượng insulin (**Hình 2.16**). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ.



Hình 2.16. Sơ đồ thử nghiệm đánh giá tác dụng kích thích tế bào β tiết insulin trên mô hình gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ

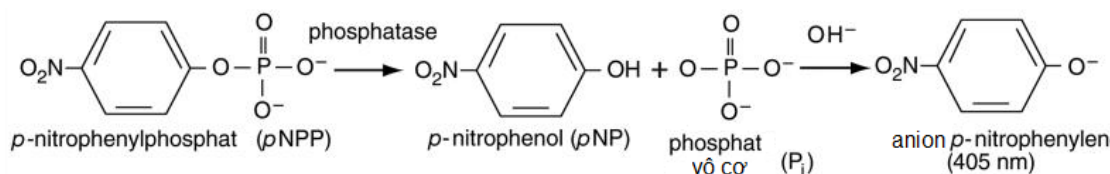
Hàm lượng insulin được xác định bằng bộ kit Mouse ELISA Insulin Kit (Mercodia) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (**Phụ lục 9**).

Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy

- Sau 24 giờ ủ ở 37 °C, 5% CO₂, phần trăm sống sót của các tế bào tiểu đảo được đánh giá bằng thử nghiệm MTT: Thực hiện tương tự như quy trình ở **mục 2.3.6.4**.
- Mức độ biểu hiện của một số protein bằng Western blot (thực hiện đối với cao chiết ethanol ở nồng độ 100 µg/ml): Sau 24 giờ ủ ở 37 °C, 5% CO₂, các tiểu đảo tụy được thu thập để kiểm tra mức độ biểu hiện của một số protein bao gồm Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) [130], [131]. Dịch protein được thu nhận tương tự như mô tả ở **phụ lục 16**. Quy trình Western blot được tiến hành tương tự như mô tả ở **mục 2.3.2** với protein đối chứng là α -tubulin.

2.3.7. Thử nghiệm ức chế PTP1B *in vitro*

Nguyên tắc: Phosphatase khử nhóm phosphat của cơ chất *p*-nitrophenyl phosphat (*p*NPP) tạo ra *p*-nitrophenol (*p*NP). Trong môi trường kiềm, *p*-nitrophenol chuyển thành *p*-nitrophenolat có màu vàng. Vì vậy, độ hấp thụ của hỗn hợp sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm để định lượng *p*-nitrophenolat tạo thành [149].



Hình 2.17. Phản ứng khử nhóm phosphat của *p*NPP bởi phosphatase [149]

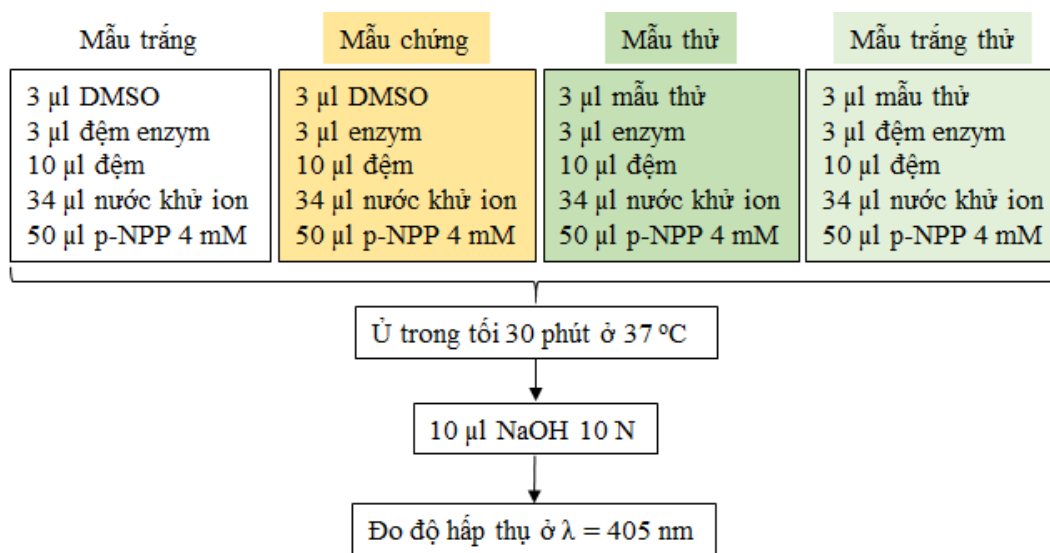
Tiến hành:

Mẫu thử: Cao chiết ethanol, hai hợp chất phân lập (Afzelechin và coniferaldehyd) và acid ursolic (chứng dương).

Dung dịch đệm thử nghiệm có chứa 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA (Acid ethylenediaminetetraacetic) và 50 mM citrat (pH=6,0). Dung dịch đệm pha enzym có chứa 1 M NaCl, 0,5 mM PMSF (Phenyl methyl sulfonyl florid), 4,86 mM β -mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl (pH=7,5). Enzym được pha trong dung dịch đệm enzym đạt nồng độ 20 µg/ml.

Các mẫu thử được pha trong DMSO tạo thành dung dịch gốc có nồng độ 10 mg/ml (cao chiết) và 20 mM (acid ursolic, afzelechin và coniferaldehyd). Dung dịch đệm được sử dụng để pha loãng cao chiết, acid ursolic, afzelechin và coniferaldehyd thu được dãy nồng

độ cuối trong thử nghiệm tương ứng là 1,25; 2,5; 10 $\mu\text{g/ml}$; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μM ; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μM và 0,625; 2,5; 10; 20 μM . Nồng độ DMSO cuối cùng trong phản ứng cao nhất là 0,1%. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ [150].



Hình 2.18. Quy trình thử nghiệm ức chế PTP1B

Đánh giá: Phần trăm ức chế PTP1B và giá trị IC_{50} được tính toán tương tự **mục 2.3.3.**

2.3.8. Xử lý số liệu

Số liệu thực nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism (phiên bản 8.0.2, Inc., La Jolla, CA, Mỹ). Số liệu được kiểm tra phân phối chuẩn bằng phép kiểm Anderson-Darling và Shapiro-Wilk. Trong trường hợp phân phối chuẩn, số liệu được so sánh bằng phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA), sau đó là hậu kiểm Tukey nếu phương sai bằng và Dunnett nếu phương sai khác, số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Trung bình $\pm$ SD). Trong trường hợp phân phối không chuẩn, số liệu được so sánh bằng Kruskal-Wallis sau đó là hậu kiểm Dunn và số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung vị $\pm$ khoảng tứ vị. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê nếu $p < 0,05$.

2.4. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh (Thử nghiệm ức chế hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập từ chuột và phân lập đảo tụy), Khoa Dược – Đại học Quốc gia Seoul, Hàn Quốc (Thử nghiệm ức chế PTP1B).

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm

3.1.1. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột bình thường

Bảng 3.1. Tác dụng của cao chiết ethanol trên glucose huyết bằng thực nghiệm OGTT trên chuột bình thường

Lô	n	Nồng độ glucose huyết (mg/dl)			
		0 phút	30 phút	60 phút	120 phút
Chứng	8	90,35 ± 25,33	198,15 ± 47,19	143,51 ± 27,70	83,51 ± 18,06
Cao chiết 12,5 mg/kg	8	108,30 ± 23,36	126,00 ± 48,34** (↓36,41%)	94,69 ± 26,97** (↓34,02%)	66,69 ± 18,90
Cao chiết 25 mg/kg	8	94,92 ± 27,85	134,47 ± 33,11* (↓32,14%)	93,31 ± 23,78** (↓34,98%)	72,49 ± 22,93
Cao chiết 50 mg/kg	8	91,11 ± 18,91	169,89 ± 35,68 (↓14,26%)	120,97 ± 16,93 (↓15,71%)	74,51 ± 16,90
Glibenclamid 5 mg/kg	8	98,06 ± 12,41	134,90 ± 18,98* (↓31,92%)	95,73 ± 22,78** (↓33,29%)	76,05 ± 12,09

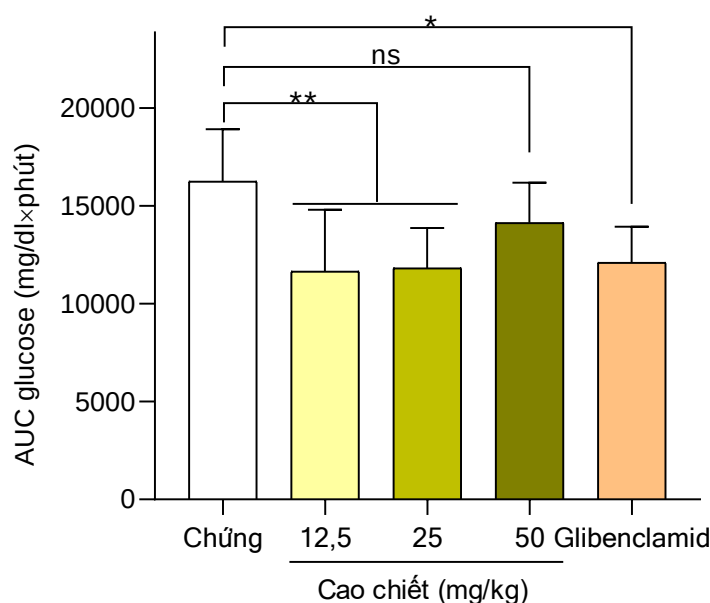
Trung bình ± SD (n = 8); (↓a%) Phần trăm hạ glucose huyết so với lô chứng ở cùng thời điểm;

*p < 0,05 và **p < 0,01 so với lô chứng ở cùng thời điểm (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **bảng 3.1** cho thấy:

Cao chiết liều 12,5 và 25 mg/kg, glibenclamid liều 5 mg/kg có tác dụng làm giảm nồng độ glucose huyết có ý nghĩa thống kê so với lô chứng sau 30 và 60 phút dung nạp với phần trăm hạ glucose huyết so với lô chứng là trên 30%.

Cao chiết liều 50 mg/kg làm giảm không đáng kể nồng độ glucose huyết so với lô chứng sau 30 và 60 phút dung nạp (p > 0,05).



Hình 3.1. AUC nồng độ glucose trong máu sau 120 phút của chuột bình thường uống cao chiết ethanol trong thực nghiệm OGTT

Trung bình $\pm$ SD ($n = 8$); $^{ns}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$ và $^{**}p < 0,01$ (Phép kiểm Tukey)

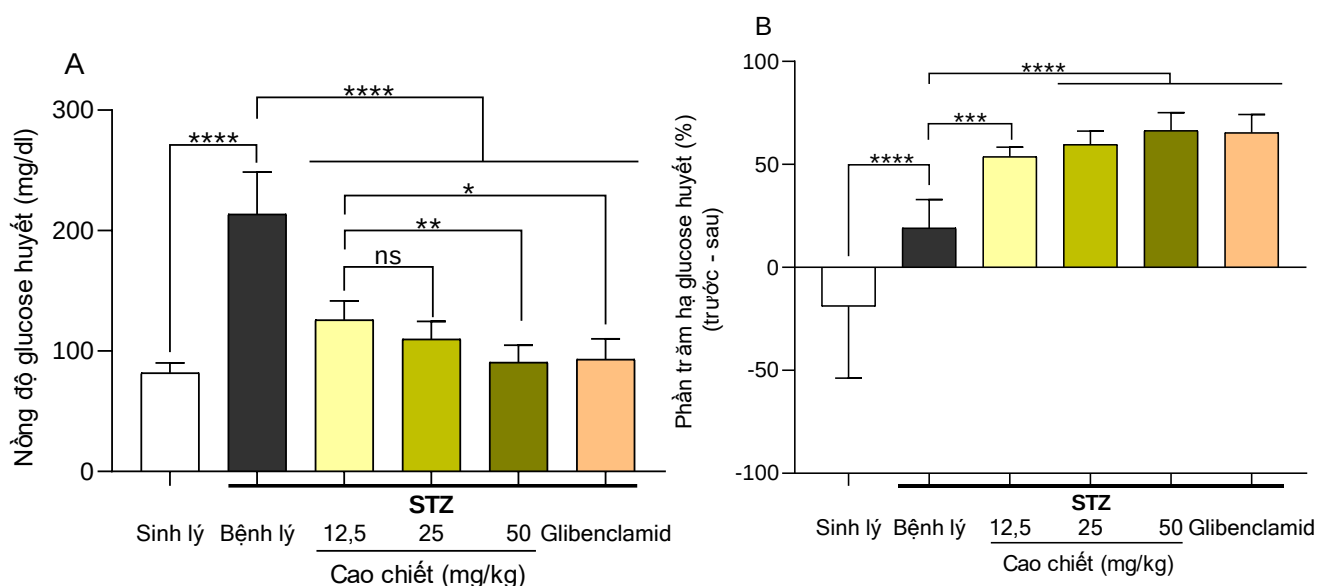
Kết quả ở **hình 3.1** cho thấy:

Cao chiết liều 12,5 và 25 mg/kg, glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm AUC glucose có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Trong khi đó, cao chiết ở liều 50 mg/kg làm giảm không đáng kể AUC glucose so với lô chứng ($p > 0,05$).

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng làm giảm nồng độ glucose huyết trong thực nghiệm dung nạp glucose đường uống trên chuột bình thường. Do đó, cao chiết ethanol được tiếp tục đánh giá tác dụng hạ glucose huyết trên mô hình chuột nhất trắng gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin.

3.1.2. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên chuột nhất gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

Trong nghiên cứu này, STZ liều duy nhất 170 mg/kg đã gây thành công mô hình chuột tăng glucose huyết với tỷ lệ đạt được khoảng 70%, các biểu hiện của chuột sau 7 ngày như tăng nồng độ glucose huyết (trung bình đạt 280 mg/dl) và sụt cân đáng kể so với lô sinh lý (**Phụ lục 17**).



Hình 3.2. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 9$); (A) Nồng độ glucose huyết của các lô chuột sau 7 ngày điều trị, $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey); (B) Phần trăm hạ glucose huyết của các lô chuột so với trước điều trị, $^{***}p < 0,001$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Dunnett)

Kết quả ở **hình 3.2** cho thấy:

Sau 7 ngày điều trị, nồng độ glucose huyết trung bình của lô bệnh lý vẫn cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Cao chiết liều 12,5, 25 và 50 mg/kg cũng như glibenclamid liều 5 mg/kg có tác dụng giảm đáng kể nồng độ glucose huyết so với lô bệnh lý ($p < 0,0001$) với phần trăm giảm glucose huyết so với lô bệnh lý tương ứng là 41,01%, 48,48%, 57,60% và 56,39%. Kết quả này cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hạ glucose huyết. Mặt khác, cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg thể hiện tác dụng hạ glucose huyết tương đương nhau ($p > 0,05$) và tốt hơn cao chiết liều 12,5 mg/kg.

Về mức độ hạ glucose huyết so với trước điều trị, phần trăm hạ glucose huyết trung bình của các lô chuột được điều trị đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý.

Tổng hợp lại, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hạ glucose huyết tốt trên mô hình chuột nhất trắng gây tăng glucose huyết bằng STZ. Trên mô hình bệnh lý, cao

chiết liệu 25 và 50 mg/kg thể hiện tác dụng tốt hơn cao chiết liệu 12,5 mg/kg. Do đó, trong giới hạn của luận án, cao chiết ở hai liệu này được chọn để tiếp tục nghiên cứu.

3.1.3. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

Trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ, tác dụng của cao chiết ethanol cũng được đánh giá bằng thực nghiệm OGTT.

Bảng 3.2. Tác dụng của cao chiết ethanol sau 7 ngày uống trên khả năng dung nạp glucose của chuột tăng glucose huyết bởi STZ

Lô	n	Nồng độ glucose huyết (mg/dl)			
		0 phút	30 phút	60 phút	120 phút
Sinh lý	9	81,80 ± 8,36	182,56 ± 30,93	124,84 ± 27,58	79,42 ± 16,67
Bệnh lý	9	213,54 ± 35,14 ^{****} (↑161,05%)	290,44 ± 38,02 (↑59,09%) ^{***, ****}	246,25 ± 18,58 ^{****} (↑97,25%)	225,20 ± 31,94 ^{****} (↑183,56%)
Cao chiết 25 mg/kg	9	109,97 ± 14,72	258,95 ± 33,44 (↓10,84%)	181,37 ± 36,22 (↓26,35%)	116,33 ± 21,42 (↓48,34%)
Cao chiết 50 mg/kg	9	90,53 ± 14,24	195,58 ± 41,26 (↓32,66%)	137,36 ± 30,53 (↓44,22%)	103,68 ± 19,75 (↓53,96%)
Glibenclamid 5 mg/kg	9	93,11 ± 17,13	209,73 ± 38,95 (↓27,79%)	135,77 ± 19,23 (↓44,86%)	93,36 ± 15,20 (↓58,54%)

Trung bình ± SD (n = 9); (↓a%): phần trăm hạ glucose huyết so với lô bệnh lý ở cùng thời điểm,

(↑b%): phần trăm tăng glucose huyết so với lô sinh lý ở cùng thời điểm;

0, 60 và 120 phút: ^{****}p < 0,0001 so với các lô khác; **30 phút:** ^{***}p < 0,001 so với lô glibenclamid và ^{****}p < 0,0001 so với lô sinh lý và lô 50 mg/kg (Phép kiểm Tukey)

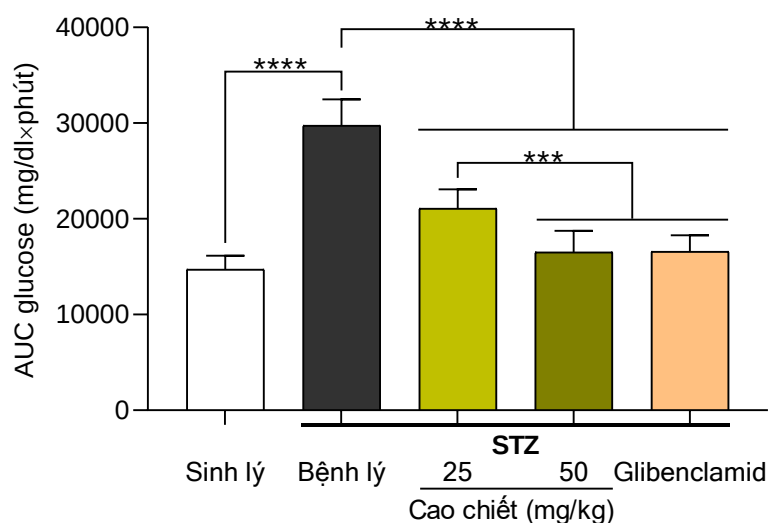
Kết quả ở **bảng 3.2** cho thấy:

Ở tất cả các thời điểm khảo sát, nồng độ glucose huyết của lô bệnh lý đều cao hơn đáng kể so với lô sinh lý (p < 0,0001).

Sau 30 phút dung nạp, cao chiết liệu 50 mg/kg và glibenclamid liệu 5 mg/kg làm giảm nồng độ glucose huyết có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý với phần trăm giảm glucose huyết ở lô chuột được điều trị với cao chiết liệu 50 mg/kg là trên 30%. Cao chiết liệu 25 mg/kg làm giảm không đáng kể nồng độ glucose huyết so với lô bệnh lý (p>0,05).

Sau 60 và 120 phút dung nạp, cao chiết ở các liều và glibenclamid đều làm giảm nồng độ glucose huyết có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý với phần trăm giảm glucose huyết ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg là trên 40% sau 60 phút dung nạp và trên 50% sau 120 phút dung nạp. Trong khi đó, phần trăm giảm glucose huyết ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg là trên 20% sau 60 phút dung nạp và dưới 50% sau 120 phút dung nạp.

Mặt khác, mức độ làm giảm nồng độ glucose huyết của cao chiết liều 50 mg/kg tốt hơn so với cao chiết liều 25 mg/kg sau 30 và 60 phút dung nạp glucose đường uống.



Hình 3.3. AUC nồng độ glucose trong máu sau 120 phút của các lô chuột trong thực nghiệm OGTT trên mô hình chuột tăng glucose huyết bởi STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 9$); *** $p < 0,001$ và **** $p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.3** cho thấy:

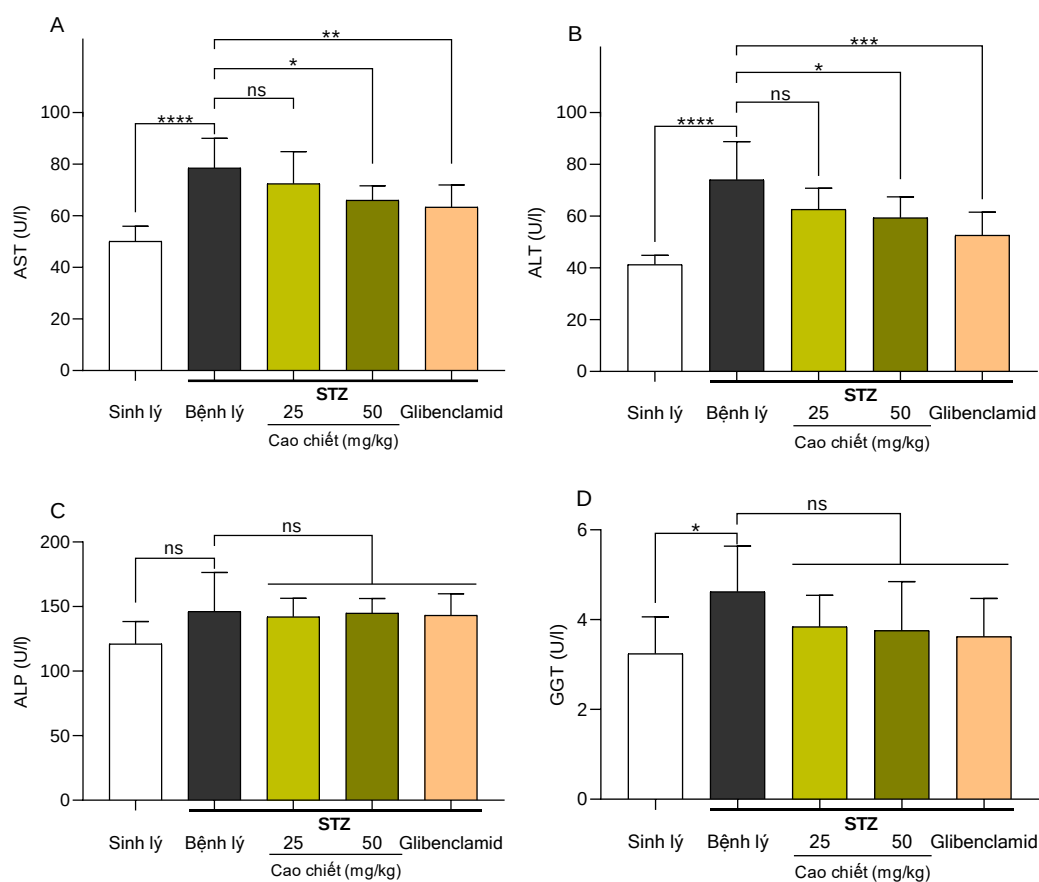
AUC glucose ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Cao chiết ở các liều khảo sát (25 và 50 mg/kg) và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm AUC glucose có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p < 0,0001$). Cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg thể hiện tác dụng giảm AUC glucose tương đương nhau ($p > 0,05$) và tốt hơn cao chiết liều 25 mg/kg ($p < 0,001$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn cũng có tác dụng hạ glucose huyết trong thực nghiệm dung nạp glucose đường uống trên chuột nhắt trắng gây tăng glucose huyết bằng STZ.

3.1.4. Tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

3.1.4.1. Tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

Tác dụng cải thiện chức năng gan của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua nồng độ của các enzym gan trong huyết thanh bao gồm AST, ALT, ALP và GGT.



Hình 3.4. Tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ thông qua đánh giá các chỉ số enzym gan
Trung bình $\pm$ SD (n = 9); $^{ns}p > 0,05$, $^{}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)*

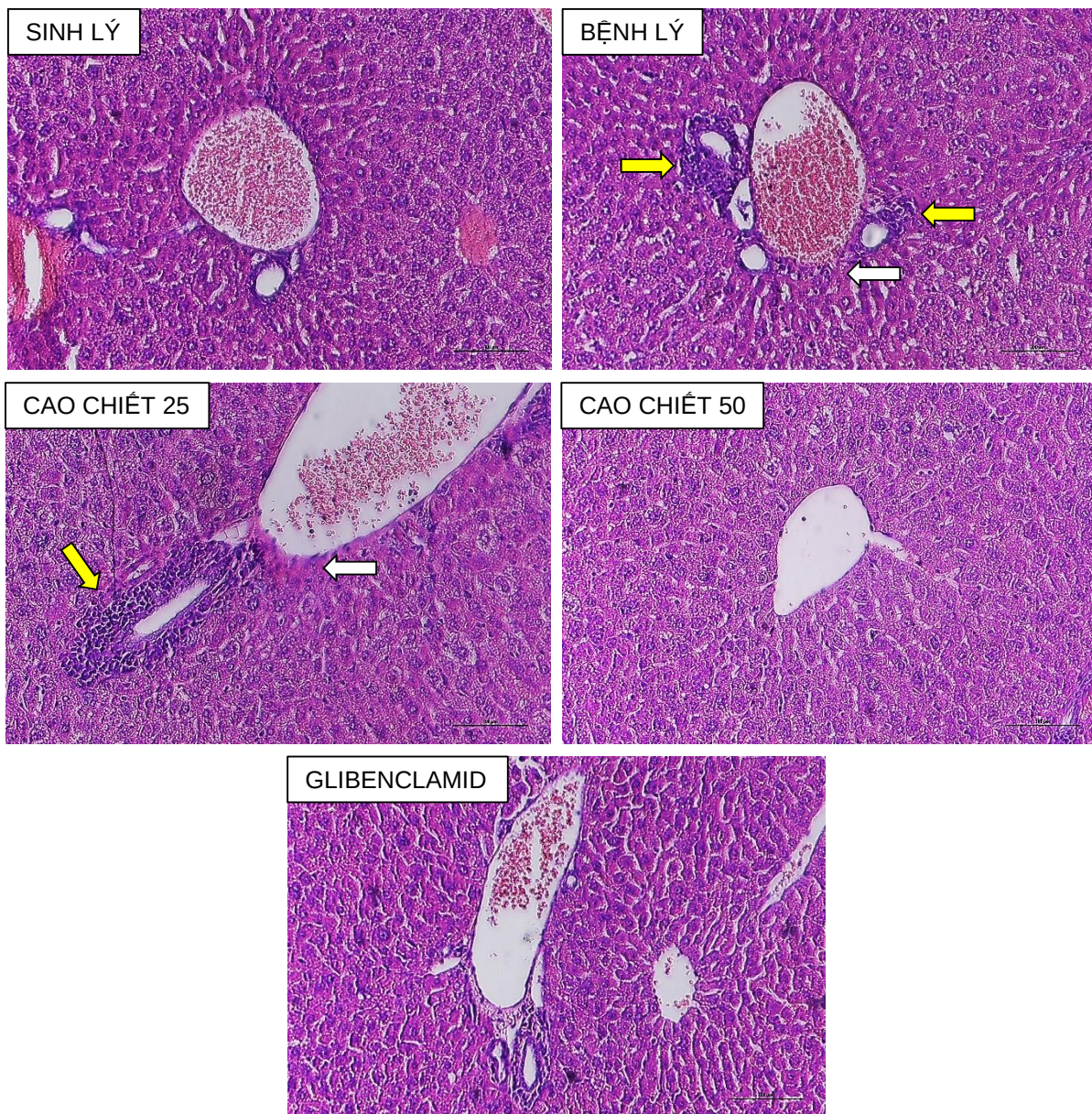
Kết quả ở **hình 3.4** cho thấy:

Nồng độ AST, ALT, ALP và GGT huyết thanh ở lô bệnh lý cao hơn so với lô sinh lý, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở chỉ số AST ($p < 0,0001$), ALT ($p < 0,0001$) và GGT ($p < 0,05$). Phần trăm tăng nồng độ AST, ALT và GGT huyết thanh ở lô bệnh lý tương ứng là 56,78%, 79,39% và 42,48% so với lô sinh lý; trong khi đó, nồng độ ALP huyết thanh ở lô bệnh lý không khác so với lô sinh lý (20,73%, $p > 0,05$).

Cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ AST huyết thanh (tương ứng là 15,99% và 19,39%) và ALT huyết thanh (tương ứng là 19,76% và 28,88%) nhưng không làm giảm nồng độ ALP và GGT huyết thanh so với lô bệnh lý sau 7 ngày điều trị. Cao chiết liều 25 mg/kg chưa thể hiện tác dụng làm giảm nồng độ các enzym này trong huyết thanh.

Như vậy, cao chiết ethanol ở liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện chức năng gan thông qua giảm nồng độ AST và ALT huyết thanh trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.

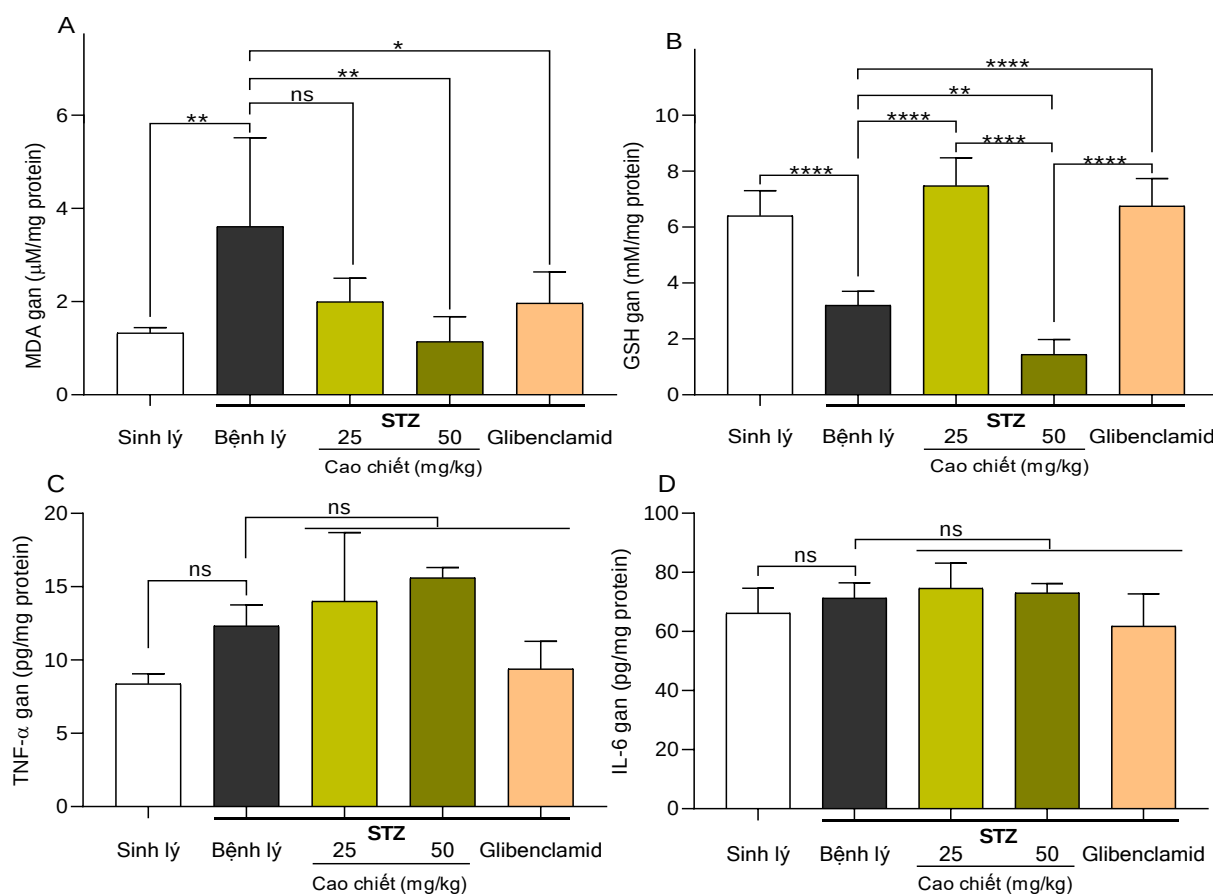
Tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua quan sát cấu trúc mô học gan bằng nhuộm H&E (**Hình 3.5**). Kết quả cho thấy không phát hiện bất thường trong cấu trúc mô gan ở vùng khoảng cửa ở lô sinh lý cũng như lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg hoặc glibenclamid liều 5 mg/kg. Tuy nhiên, cấu trúc mô gan của lô bệnh lý và lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg cho thấy một số thay đổi như hoại tử tế bào gan nhẹ và thâm nhiễm tế bào viêm quanh khoảng cửa; có thoái hóa tế bào gan rải rác (thoái hóa bên trong, thoái hóa phòng), thoái hóa mỡ dạng u hạt nhỏ ở mức độ nhẹ. Cấu trúc mô gan ở vùng xung quanh tĩnh mạch trung tâm và một số vùng khác thì bình thường ở tất cả các lô thử nghiệm (**Phụ lục 18**).



Hình 3.5. Hình ảnh vi thể đại diện mô học gan vùng khoảng cửa sau 7 ngày điều trị với cao chiết ethanol trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ (H&E, 200×)

Mũi tên màu vàng cho thấy sự thâm nhiễm tế bào viêm quanh mạch máu, mũi tên trắng cho thấy vùng hoại tử

Tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua mức độ của một số chỉ dấu stress oxy hoá bao gồm MDA, GSH và cytokin viêm bao gồm TNF- α , IL-6 trong dịch đồng thể gan.



Hình 3.6. Tác động của cao chiết ethanol trên các chỉ số MDA, GSH, TNF- α và IL-6 trong dịch đồng thể gan sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ

(A) Hàm lượng chỉ dấu stress oxy hóa (MDA và GSH) trong mô gan (Trung bình $\pm$ SD, $n = 6$), (B) Hàm lượng cytokin viêm (TNF- α và IL-6) trong mô gan (Trung bình $\pm$ SD, $n = 3$); $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.6** cho thấy:

Hàm lượng MDA gan ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,01$). Cao chiết liều 25 mg/kg làm giảm không đáng kể hàm lượng MDA gan so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm đáng kể hàm lượng MDA gan so với lô bệnh lý ($p < 0,01$ và $p < 0,05$).

Hàm lượng GSH gan ở lô bệnh lý thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Cao chiết liều 25 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm tăng đáng kể hàm lượng GSH so với lô bệnh lý ($p < 0,0001$). Tuy nhiên, lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg

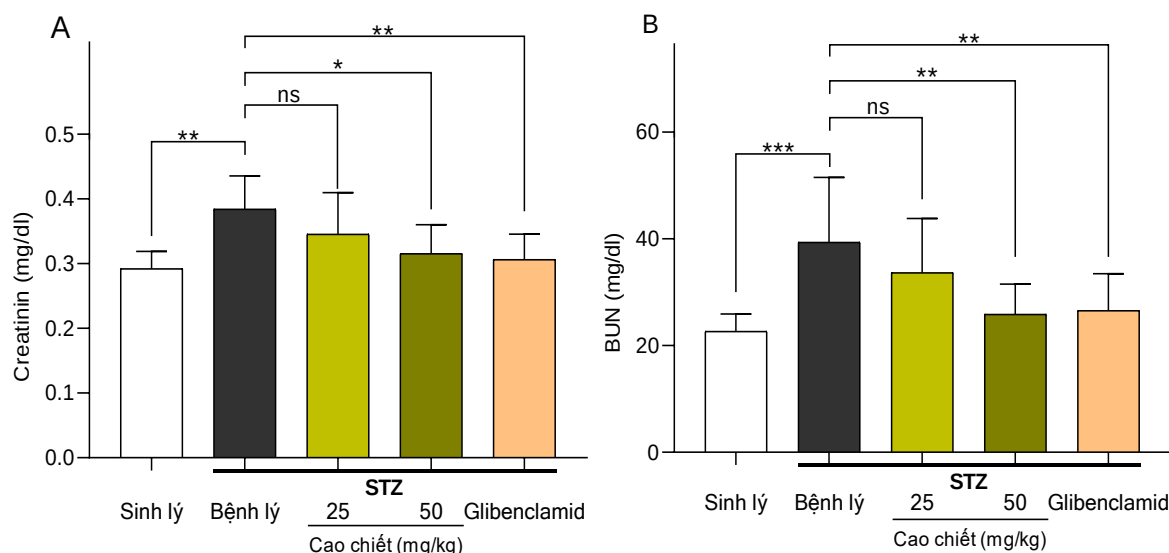
có hàm lượng GSH thấp hơn đáng kể so với lô bệnh lý ($p < 0,01$) và so với các lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg ($p < 0,0001$).

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng TNF- α và IL-6 gan ở lô bệnh lý so với lô sinh lý ($p > 0,05$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng cải thiện tổn thương gan có thể thông qua cơ chế điều hoà tình trạng stress oxy hoá.

3.1.4.2. Tác dụng cải thiện tổn thương thận của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên chuột nhắt gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

Tác dụng cải thiện chức năng thận của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua nồng độ creatinin và BUN trong huyết thanh.



Hình 3.7. Tác dụng cải thiện tổn thương thận của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ thông qua đánh giá chỉ số creatinin và BUN

Trung bình $\pm$ SD ($n = 9$); $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{***}p < 0,001$

(Phép kiểm Tukey (A) và Dunnett (B))

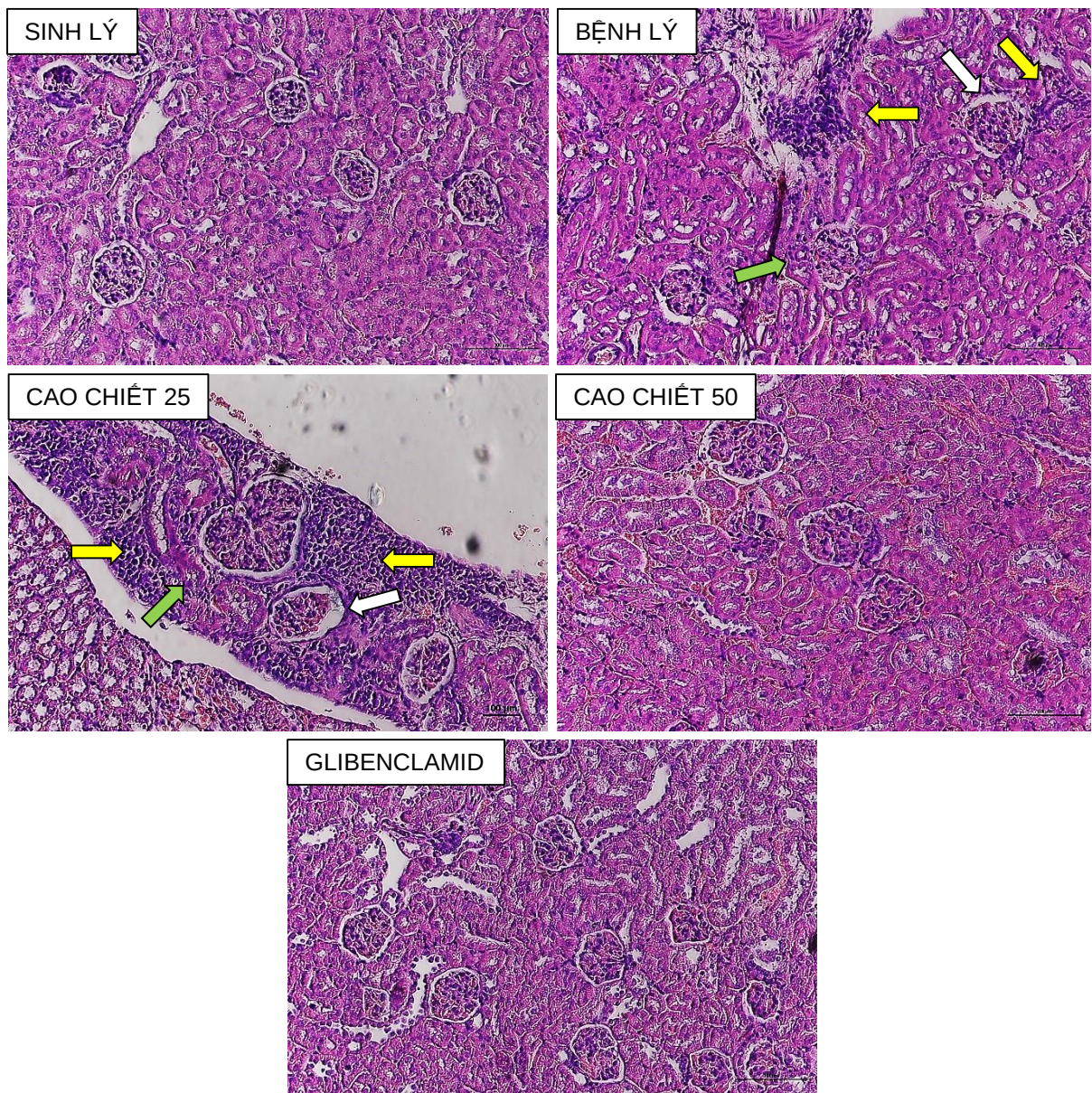
Kết quả ở **hình 3.7** cho thấy:

Nồng độ creatinin và BUN trong huyết thanh ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,01$ và $p < 0,001$) với phần trăm tăng nồng độ creatinin và BUN ở lô bệnh lý tương ứng là 31,55% và 73,74% so với lô sinh lý.

Cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ creatinin huyết thanh (tương ứng là 17,90% và 21,21%) và BUN huyết thanh (tương ứng là 34,34% và 32,51%) so với lô bệnh lý sau 7 ngày điều trị. Cao chiết liều 25 mg/kg không làm giảm đáng kể nồng độ creatinin và BUN trong huyết thanh so với lô bệnh lý ($p > 0,05$).

Như vậy, cao chiết ethanol ở liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện chức năng thận thông qua giảm nồng độ creatinin và BUN trong huyết thanh trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.

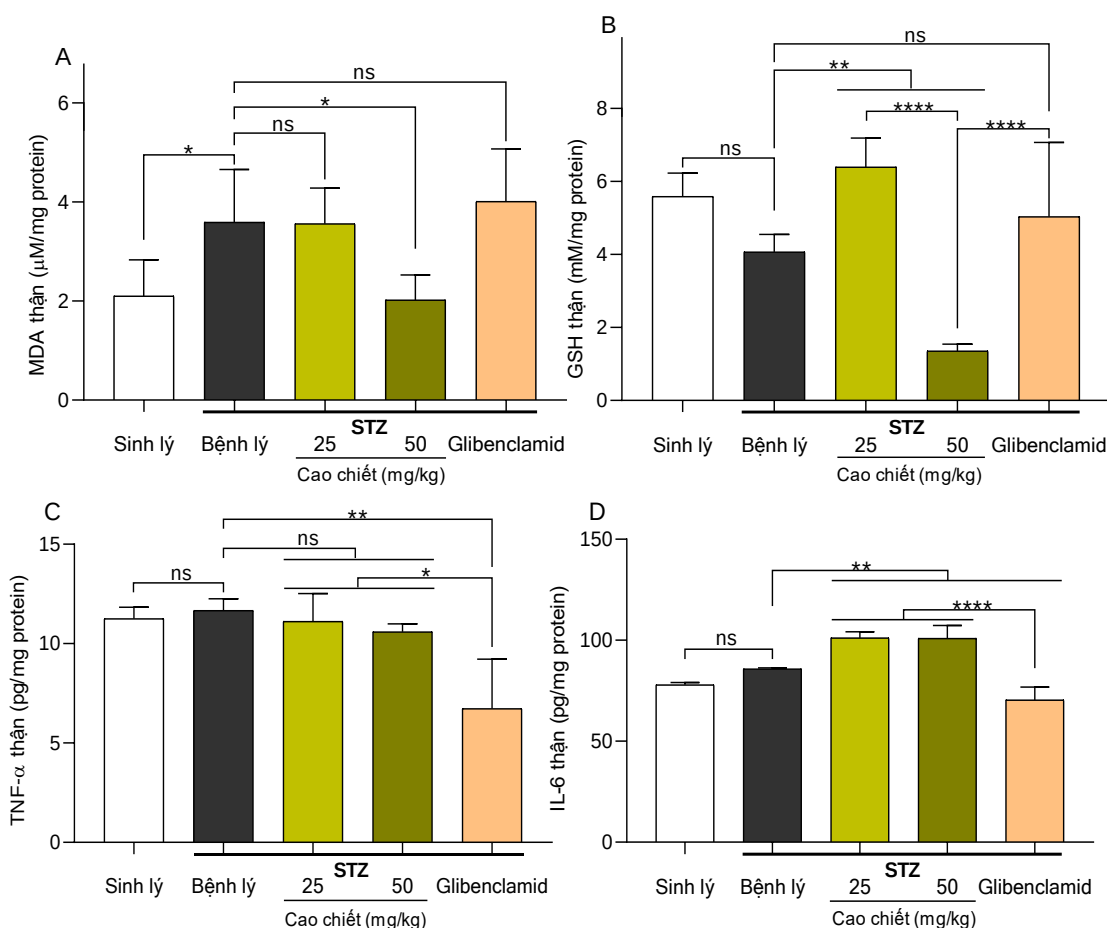
Tác dụng cải thiện tổn thương thận của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua quan sát cấu trúc mô học thận bằng nhuộm H&E (**Hình 3.8**). Kết quả cho thấy không phát hiện bất thường trong cấu trúc mô thận ở vùng vỏ thận ở lô sinh lý và lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg hoặc glibenclamid liều 5 mg/kg. Tuy nhiên, cấu trúc mô thận của lô bệnh lý và lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg cho thấy một số hiện tượng như thâm nhập nhiều lympho bào, tương bào trong mô kẽ và quanh ống thận, bề thận kèm rải rác có các ống thận bị phá hủy, đồng thời thay đổi cầu thận bao gồm mở rộng màng đáy cầu thận ở vùng vỏ thận. Cấu trúc mô thận ở vùng tuỷ thận và vùng nhú thận thì bình thường ở tất cả các lô thử nghiệm (**Phụ lục 18**).



Hình 3.8. Hình ảnh vi thể đại diện mô học vùng vỏ thận sau 7 ngày điều trị với cao chiết hạt chuối cô đơn trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ (H&E, 200×)

Mũi tên màu vàng cho thấy sự thâm nhiễm tế bào viêm, mũi tên xanh cho thấy ống thận bị phá hủy, mũi tên trắng cho thấy sự mở rộng màng đáy cầu thận

Tác dụng cải thiện tổn thương thận của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua mức độ của một số chỉ dấu stress oxy hoá bao gồm MDA, GSH và cytokin viêm bao gồm TNF- α , IL-6 trong dịch đồng thể thận.



Hình 3.9. Tác động của cao chiết ethanol trên các chỉ số MDA, GSH, TNF- α và IL-6 trong dịch đồng thể thận sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ
 (A) Hàm lượng chỉ dấu stress oxy hóa (MDA và GSH) trong mô thận (Trung bình $\pm$ SD, $n = 6$),
 (B) Hàm lượng cytokin viêm (TNF- α và IL-6) trong mô thận (Trung bình $\pm$ SD, $n = 3$); $^{ns}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.9** cho thấy:

Hàm lượng MDA thận ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng MDA thận ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg hoặc glibenclamid liều 5 mg/kg so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg làm giảm đáng kể hàm lượng MDA thận so với lô bệnh lý ($p < 0,05$).

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hàm lượng GSH, TNF- α và IL-6 thận ở lô bệnh lý so với lô sinh lý ($p > 0,05$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng cải thiện tổn thương thận có thể thông qua cơ chế chống peroxy hóa lipid màng tế bào.

3.2. Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm

3.2.1. Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

3.2.1.1. Cơ chế tác dụng làm giảm hoặc chậm hấp thu glucose

3.2.1.1.1. Tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase của cao chiết ethanol

Tác dụng làm giảm hoặc chậm hấp thu glucose của cao chiết ethanol bước đầu được đánh giá thông qua khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase *in vitro*.

Bảng 3.3. Tác dụng ức chế α -amylase của cao chiết ethanol

Mẫu	Phần trăm ức chế (%)					IC ₅₀ (μ g/ml)
Nồng độ (μ g/ml)	62,5	125	250	500	750	
Cao chiết	15,90 $\pm$ 3,37	37,74 $\pm$ 5,78	51,23 $\pm$ 4,32	69,59 $\pm$ 2,29	86,63 $\pm$ 5,48	222,80
Nồng độ (μ g/ml)	50	100	200	400	600	
Acarbose	20,99 $\pm$ 2,52	33,90 $\pm$ 3,65	53,44 $\pm$ 1,10	60,64 $\pm$ 0,29	70,74 $\pm$ 4,88	206,73

Trung bình $\pm$ SD (n = 3)

Kết quả ở **bảng 3.3** cho thấy:

Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn và acarbose có tác dụng ức chế α -amylase với IC₅₀ tương ứng là 222,80 và 206,73 μ g/ml.

Bảng 3.4. Tác dụng ức chế α -glucosidase của cao chiết ethanol

Mẫu	Phần trăm ức chế (%)						IC ₅₀ (μ g/ml)
Nồng độ (μ g/ml)	0,78	1,00	1,56	2,00	3,125	6,25	
Cao chiết	16,63 $\pm$ 1,92	34,49 $\pm$ 5,71	51,23 $\pm$ 5,17	58,93 $\pm$ 2,36	80,16 $\pm$ 3,48	97,99 $\pm$ 0,43	1,58
Nồng độ (μ g/ml)	93,75	187,5	375	750	1500		
Acarbose	23,04 $\pm$ 4,48	36,70 $\pm$ 6,65	44,99 $\pm$ 2,27	64,19 $\pm$ 3,27	73,31 $\pm$ 2,42		411,77

Trung bình $\pm$ SD (n = 3)

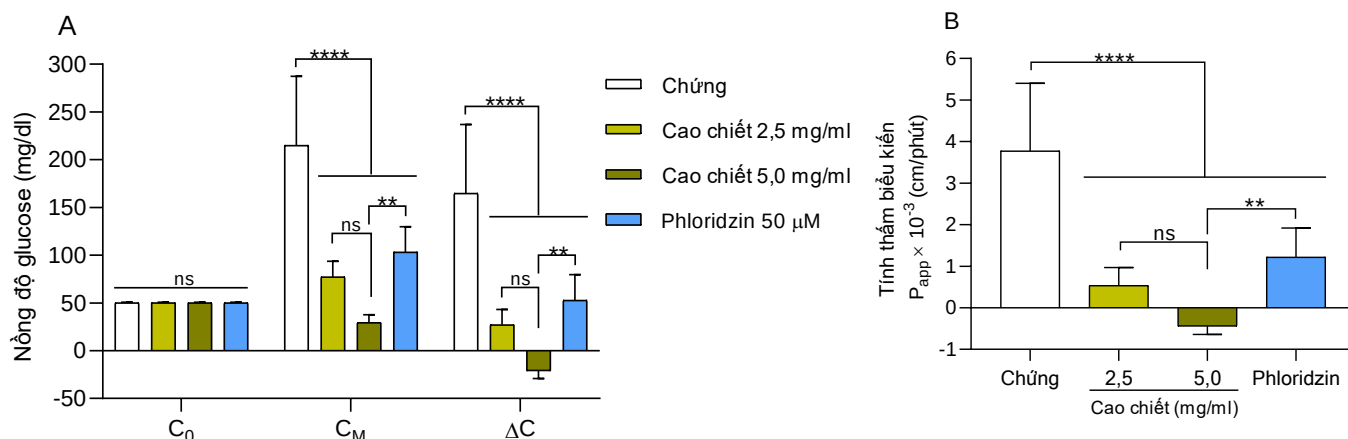
Kết quả ở **bảng 3.4** cho thấy:

Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn và acarbose có tác dụng ức chế α -glucosidase với IC₅₀ tương ứng là 1,58 và 411,77 μ g/ml.

Mặt khác, kết quả ở **bảng 3.3** và **3.4** cũng cho thấy cao chiết có tác dụng ức chế α -glucosidase điển hình hơn α -amylase và cao chiết có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt hơn nhiều so với acarbose.

3.2.1.1.2. Tác dụng ức chế hấp thu glucose của cao chiết ethanol trong thực nghiệm *ex vivo* đoạn ruột non cô lập

Tác dụng làm giảm hoặc chậm hấp thu glucose của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn tiếp tục được đánh giá thông qua khả năng ức chế hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập từ chuột *ex vivo*.



Hình 3.10. Tác dụng ức chế hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập *ex vivo* của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

Trung bình $\pm$ SD ($n = 8$); (A) Nồng độ glucose của dịch cho vào lòng ruột ban đầu (C_0), của dịch trong túi ruột sau khi ủ ruột 120 phút (C_M) và độ chênh lệch nồng độ glucose trước và sau khi ủ ruột (ΔC); (B) Tính thấm biểu kiến (P_{app}); $^{ns}p > 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Dunnett)

Kết quả ở **hình 3.10** cho thấy:

Sau khi ủ 120 phút, nồng độ glucose trong túi ruột của lô chứng, lô cao chiết 2,5 mg/ml và lô phloridzin 50 μ M đều tăng so với nồng độ glucose ban đầu (C_0), trong khi đó nồng độ glucose trong túi ruột của lô cao chiết 5 mg/ml giảm so với nồng độ glucose ban đầu. Nồng độ glucose ở lô cao chiết các nồng độ và lô phloridzin thấp hơn so với lô chứng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,0001$).

Tính thấm biểu kiến (P_{app}) ở các lô thử nghiệm đều giảm đáng kể so với lô chứng ($p < 0,0001$). Khả năng ức chế sự hấp thu glucose của cao chiết ở nồng độ 5 mg/ml gần như hoàn toàn; trong khi đó, khả năng ức chế của cao chiết ở nồng độ 2,5 mg/ml và phloridzin 50 μ M thấp hơn với phần trăm ức chế tương ứng là 86,10% và 67,91%.

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn ở các nồng độ khảo sát có tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột non cô lập.

3.2.1.2. Cơ chế tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin

Để chứng minh tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có liên quan đến tác động kích thích tế bào β tiết insulin hay không, các tiểu đảo tụy từ chuột nhắt trắng đã được phân lập. Kết quả cho thấy đã phân lập được các tiểu đảo tụy chất lượng để tiến hành nghiên cứu thông qua quan sát hình thái tiểu đảo dưới kính hiển vi, đánh giá độ đặc hiệu của tiểu đảo bằng nhuộm dithizon và chức năng tiết insulin của tế bào β bằng thử nghiệm GSIS (**Phụ lục 19**).

3.2.1.2.1. Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol trên thực nghiệm GSIS in vitro

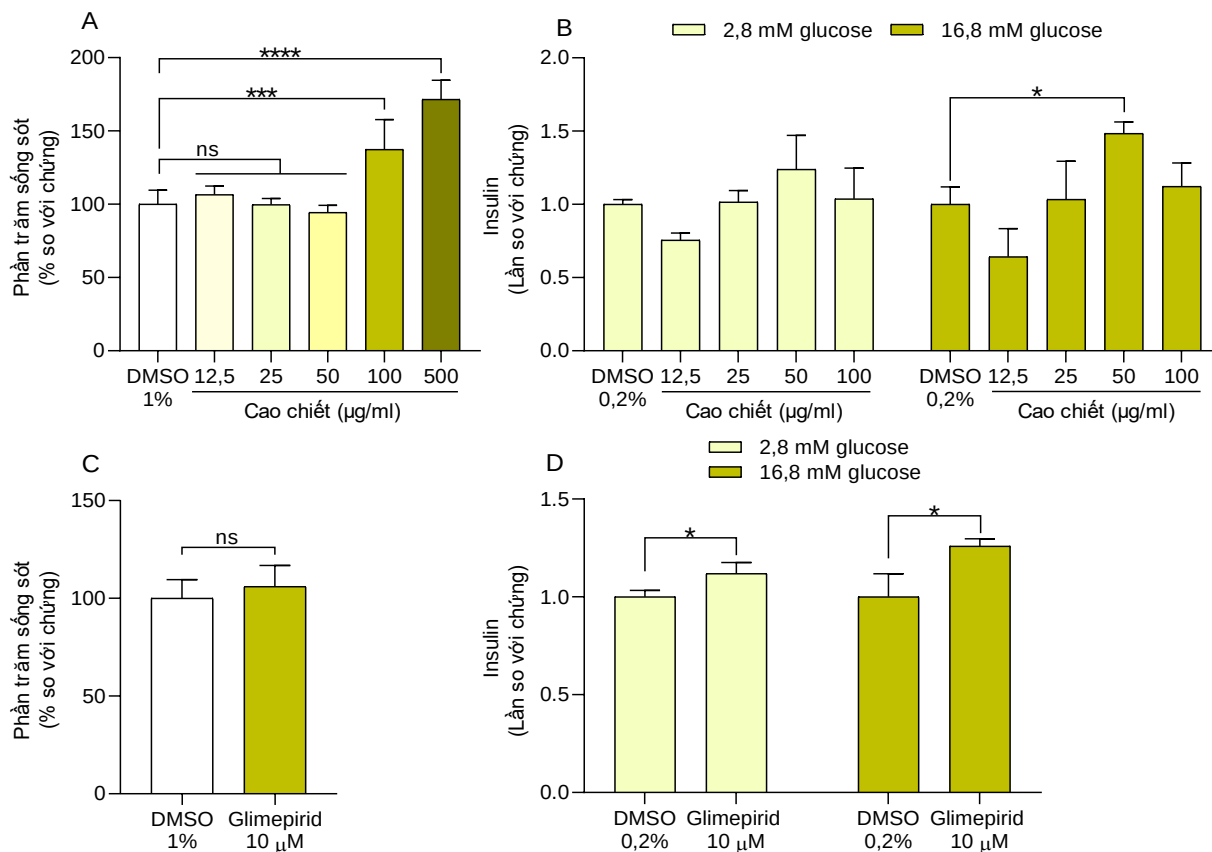
Trong nghiên cứu này, tác động của cao chiết ethanol lên khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo được đánh giá bằng thử nghiệm MTT và khả năng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin được đánh giá bằng thử nghiệm GSIS.

Kết quả ở **hình 3.11** cho thấy:

Hình A cho thấy phần trăm sống sót tế bào ở nhóm tiểu đảo tụy được xử lý với cao chiết ở nồng độ từ 12,5 đến 50 μ g/ml không có sự khác biệt so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Trong khi đó, phần trăm sống sót tế bào ở nhóm tiểu đảo tụy được xử lý với cao chiết ở nồng độ 100 và 500 μ g/ml cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Hình B cho thấy cao chiết ở các nồng độ khảo sát (12,5 đến 100 μ g/ml) không thể hiện tác động kích thích tiết insulin so với nhóm chứng ở điều kiện cơ bản (glucose 2,8 mM). Ở điều kiện này, hàm lượng insulin ở các nhóm được xử lý với cao chiết ở các nồng độ không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Ở điều kiện kích thích (glucose 16,8 mM), hàm lượng insulin ở các nhóm được xử lý với cao chiết ở nồng độ 12,5, 25 và 100 μ g/ml không khác biệt so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Trong khi đó, cao chiết ở nồng độ 50 μ g/ml làm tăng tiết insulin đáng kể so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Hình C và D cho thấy glimepirid ở nồng độ 10 μM không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo ($p > 0,05$) và có khả năng kích thích tiết insulin ở cả điều kiện cơ bản và điều kiện kích thích (glucose 16,8 mM) ($p < 0,05$).



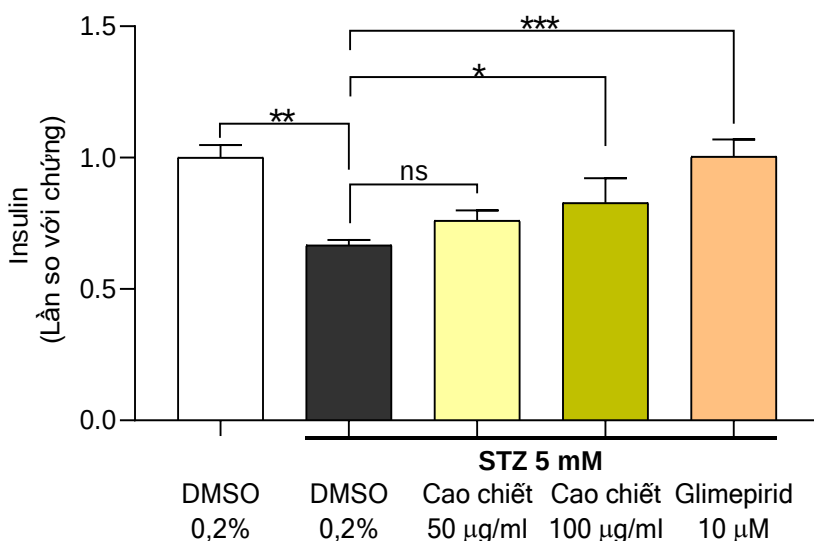
Hình 3.11. Tác dụng làm tăng tiết insulin của cao chiết ethanol trong thử nghiệm kích thích tế bào β tiểu đảo tụy bằng glucose

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); (A, C) Phần trăm sống sót tế bào tiểu đảo khi được xử lý với cao chiết và glimepirid so với đối chứng (DMSO 1%); (B, D) Mức độ insulin được giải phóng từ tiểu đảo khi được xử lý với cao chiết và glimepirid so với đối chứng (DMSO 0,2%) trong thử nghiệm GSIS; $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Như vậy, cao chiết ở nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ có tác dụng làm tăng tiết insulin trong thử nghiệm kích thích tế bào β tiểu đảo tụy bằng glucose (nồng độ 16,8 mM). Trong giới hạn của luận án, tác dụng kích thích tế bào β tiết insulin của cao chiết ethanol ở nồng độ 50 và 100 $\mu\text{g/ml}$ được tiếp tục nghiên cứu trên thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng streptozotocin.

3.2.1.2.2. Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol trên thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng streptozotocin

Tương tự với thực nghiệm *in vivo*, STZ cũng được sử dụng làm tác nhân gây tổn thương tế bào β đảo tụy để nghiên cứu tác dụng kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin.



Hình 3.12. Tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin của cao chiết ethanol trong thực nghiệm gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); Mức độ insulin được giải phóng từ tiểu đảo tụy khi được đồng xử lý với cao chiết/glimepirid và STZ sau khi được kích thích bởi glucose nồng độ cao (16,8 mM);

^{ns} $p > 0,05$, ^{*} $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,01$ và ^{***} $p < 0,001$ (Phép kiểm Tukey)

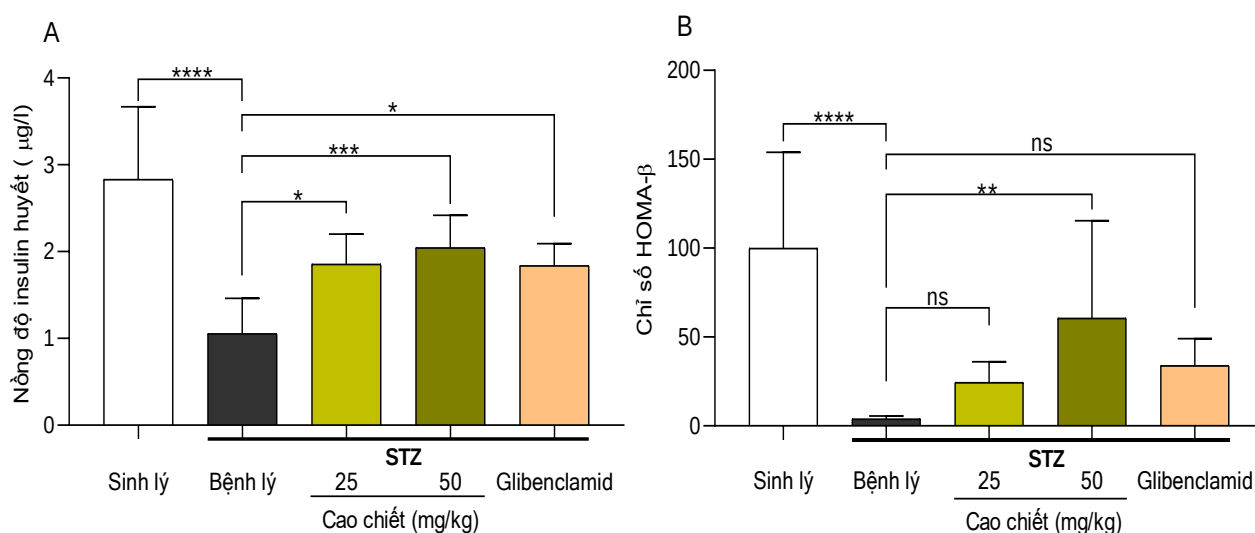
Kết quả ở **hình 3.12** cho thấy:

Hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với STZ ở nồng độ 5 mM thấp hơn đáng kể so với nhóm chứng ($p < 0,01$). Hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với cao chiết ở nồng độ 50 µg/ml không khác biệt so với nhóm STZ ($p > 0,05$). Trong khi đó, hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với cao chiết ở nồng độ 100 µg/ml và glimepirid ở nồng độ 10 µM cao hơn đáng kể so với nhóm STZ ($p < 0,05$ và $p < 0,001$).

Như vậy, cao chiết ở nồng độ 100 µg/ml có tác dụng kích thích tế bào β tiết insulin trên thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương đảo tụy bằng STZ.

3.2.1.2.3. Tác dụng cải thiện nồng độ insulin huyết của cao chiết ethanol trên mô hình chuột nhắt trắng gây tăng glucose huyết bởi streptozotocin

Nghiên cứu đã chứng minh tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol có liên quan đến tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin trên mô hình tiểu đảo tụy phân lập *in vitro*. Do đó, tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol được tiếp tục nghiên cứu trên mô hình *in vivo* gây tăng glucose huyết bằng STZ.



Hình 3.13. Tác dụng cải thiện nồng độ insulin huyết và chức năng tế bào β của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 9$); $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ và $^{****}p < 0,0001$

(Phép kiểm Tukey (A) và Dunnett (B))

Kết quả ở **hình 3.13** cho thấy:

Nồng độ insulin huyết ở lô bệnh lý thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,0001$) với phần trăm giảm insulin huyết là 62,76% so với lô sinh lý. Cao chiết ở liều 25 và 50 mg/kg làm tăng đáng kể nồng độ insulin huyết so với lô bệnh lý ($p < 0,05$ và $p < 0,001$) sau 7 ngày điều trị với phần trăm tăng insulin huyết so với lô bệnh lý tương ứng là 75,83% và 93,74%. Glibenclamid liều 5 mg/kg cũng thể hiện tác dụng tương tự với phần trăm tăng insulin huyết là 74,22% so với lô bệnh lý ($p < 0,05$).

Chỉ số HOMA- β (chỉ số đánh giá chức năng tế bào β) ở lô bệnh lý thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Chỉ số HOMA- β ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều

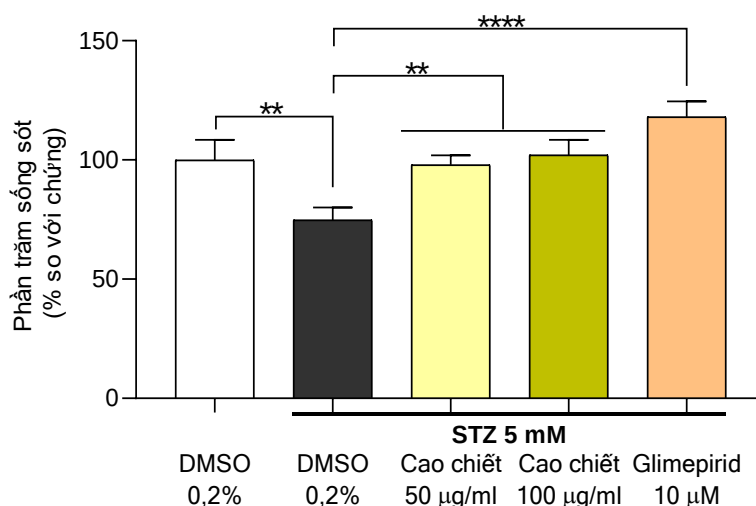
25 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Trong khi đó, chỉ số HOMA- β ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p < 0,01$).

Như vậy, cao chiết ở liều 25 và 50 mg/kg có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin và cao chiết liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện chức năng tiết insulin của tế bào β trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ.

3.2.1.3. Cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy

3.2.1.3.1. Cơ chế bảo vệ chống apoptosis tế bào tiểu đảo tụy của cao chiết ethanol trên thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng streptozotocin

Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol đã được chứng minh. Trên thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương đảo tụy bằng STZ, cao chiết ở nồng độ 50 và 100 $\mu\text{g/ml}$ có khả năng kích thích tế bào β tiết insulin. Do đó, cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo của cao chiết ethanol ở các nồng độ này được tiếp tục nghiên cứu.



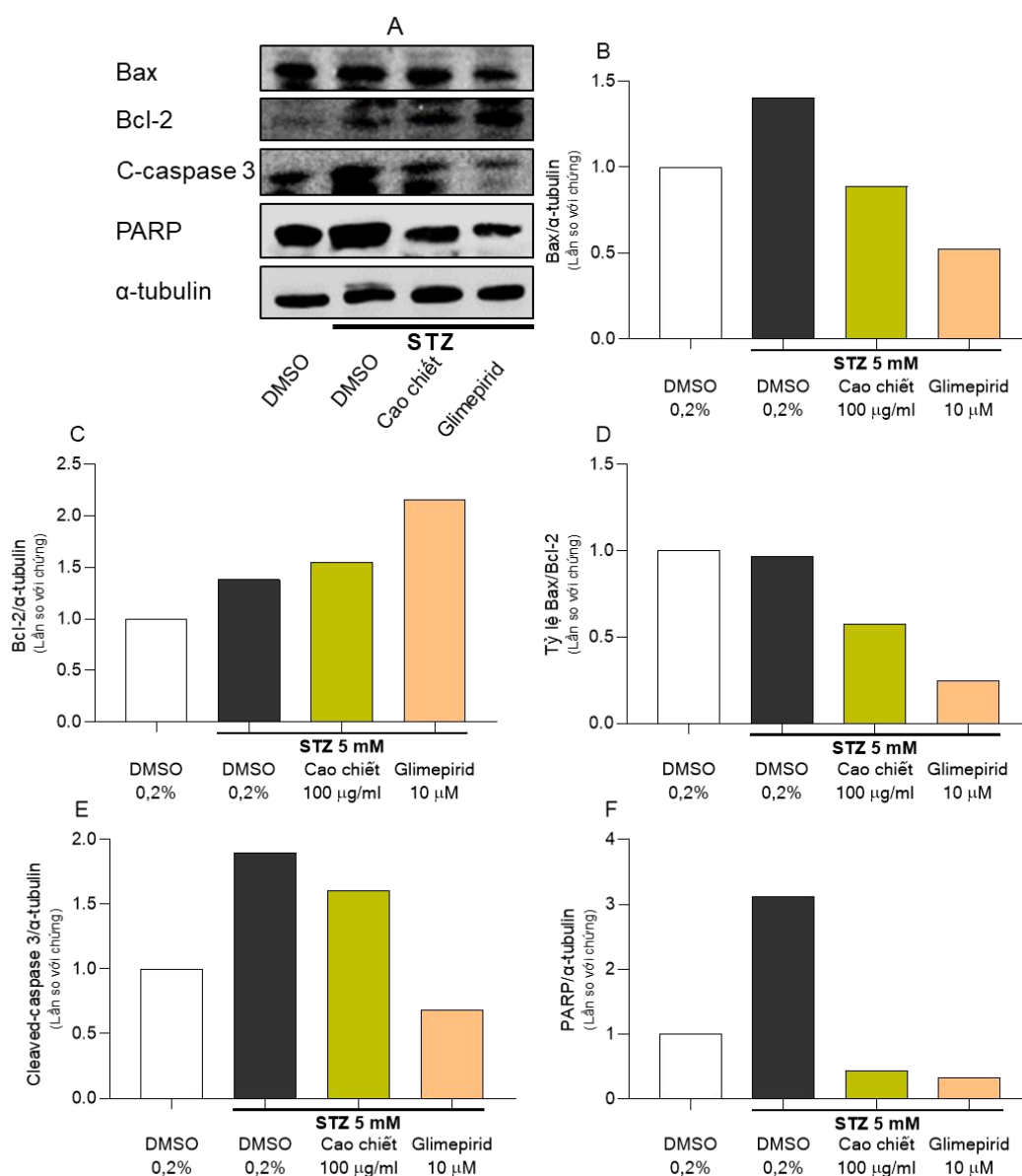
Hình 3.14. Tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy của cao chiết ethanol trong thực nghiệm gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); ** $p < 0,01$ và **** $p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.14** cho thấy:

STZ ở nồng độ 5 mM làm giảm đáng kể khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo tụy so với nhóm chứng ($p < 0,01$). Cao chiết (50 và 100 $\mu\text{g/ml}$) và glimepirid (10 μM) làm tăng

đáng kể khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo tụy so với nhóm STZ ($p < 0,01$ và $p < 0,0001$). Kết quả này cho thấy cao chiết ethanol có khả năng bảo vệ tế bào tiểu đảo chống lại độc tính của STZ. Do đó, cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy của cao chiết được tiếp tục nghiên cứu thông qua sự biểu hiện của một số protein liên quan đến con đường apoptosis tế bào bao gồm Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3 và PARP bằng kỹ thuật Western blot.



Hình 3.15. Tác động của cao chiết ethanol lên sự biểu hiện của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu apoptosis trong thực nghiệm gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ

Trung bình ($n = 2$)

Kết quả được thể hiện ở **hình 3.15** không được so sánh thống kê, có tính chất định tính do cỡ mẫu thí nghiệm nhỏ ($n = 2$), cho thấy:

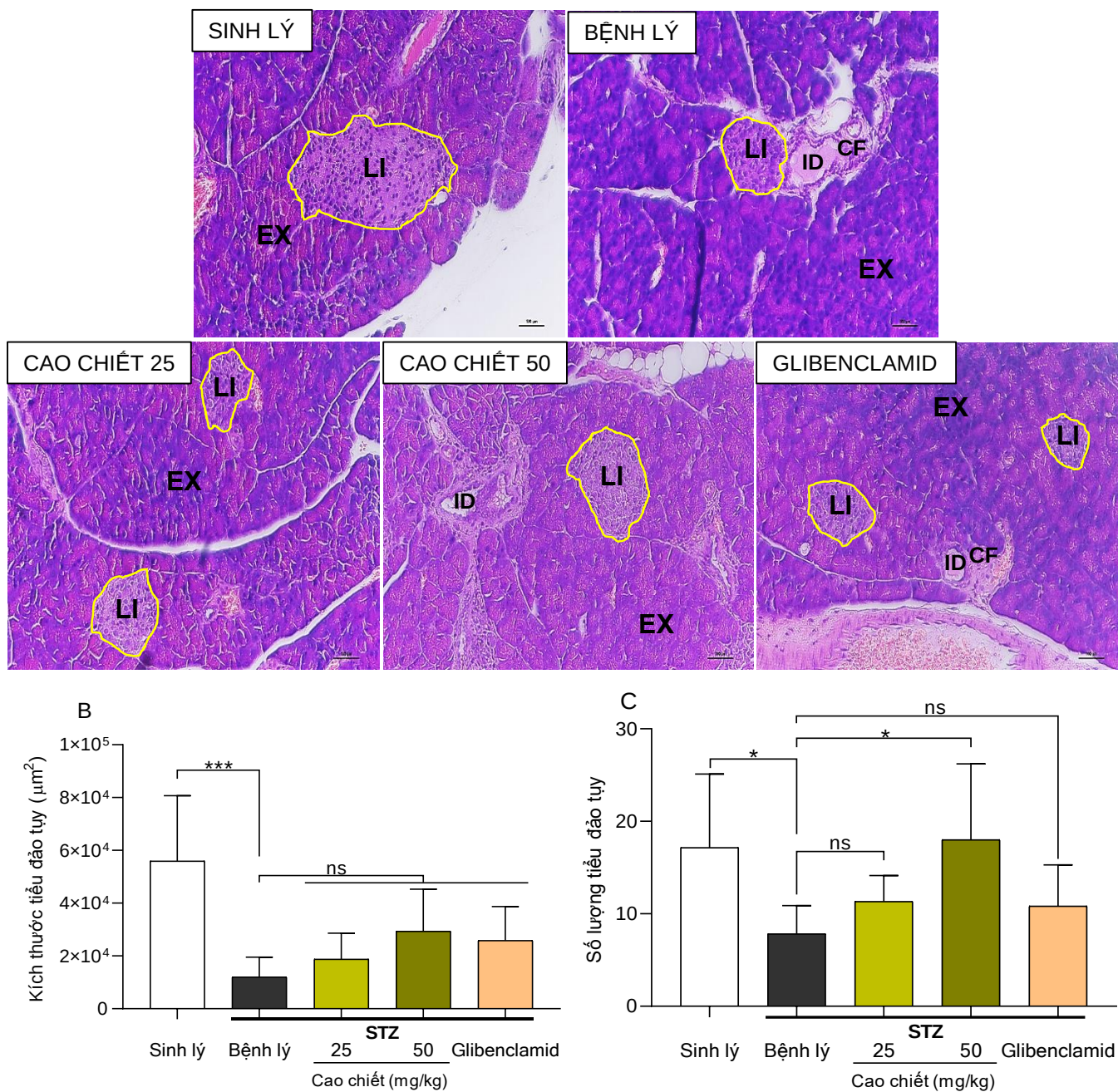
Sau 24 giờ tiếp xúc với tiểu đảo tụy, STZ ở nồng độ 5 mM có xu hướng làm tăng sự biểu hiện của Bax và Bcl-2 dẫn đến tỷ lệ Bax/Bcl-2 không thay đổi so với nhóm chứng. Cao chiết ở nồng độ 100 µg/ml và glimepirid ở nồng độ 10 µM có xu hướng làm tăng sự biểu hiện của Bcl-2 so với nhóm STZ. Cao chiết ở nồng độ 100 µg/ml và glimepirid ở nồng độ 10 µM có xu hướng làm giảm sự biểu hiện của Bax và tỷ lệ Bax/Bcl-2 so với nhóm STZ.

Sau 24 giờ tiếp xúc với tiểu đảo tụy, STZ ở nồng độ 5 mM có xu hướng làm tăng sự biểu hiện của cleaved caspase-3 và PARP so với nhóm chứng. Cao chiết ở nồng độ 100 µg/ml và glimepirid ở nồng độ 10 µM có xu hướng làm giảm sự biểu hiện của cleaved caspase-3 và PARP so với nhóm STZ.

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn thể hiện xu hướng tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy có thể thông qua cơ chế ngăn chặn quá trình apoptosis tế bào tiểu đảo do STZ gây ra thông qua sự biểu hiện của một số protein liên quan đến con đường apoptosis tế bào bao gồm Bax, cleaved caspase-3 và PARP.

3.2.1.3.2. Tác dụng bảo vệ cấu trúc tiểu đảo tụy của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng streptozotocin

Các tác động liên quan đến bảo vệ cấu trúc tiểu đảo tụy đóng vai trò quan trọng trong cải thiện tình trạng bệnh ĐTĐ. Do đó, tác động bảo vệ cấu trúc tiểu đảo tụy của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua nhuộm mô H&E.



Hình 3.16. Tác dụng cải thiện cấu trúc đảo tụy của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ

(A) Hình ảnh vi thể đại diện mô học tụy chuột (Nhuộm H&E, 200×) với tiểu đảo tụy Langerhans (LI), tụy ngoại tiết (EX), ống gian thùy (ID) và sợi collagen (CF); (B, C) Kích thước và số lượng tiểu đảo tụy/lát cắt (Trung bình ± SD, n = 6); ^{ns}p > 0,05, *p < 0,05 và ***p < 0,001 (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.16** cho thấy:

Diện tích và số lượng tiểu đảo tụy ở lô bệnh lý thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,001$ và $p < 0,05$).

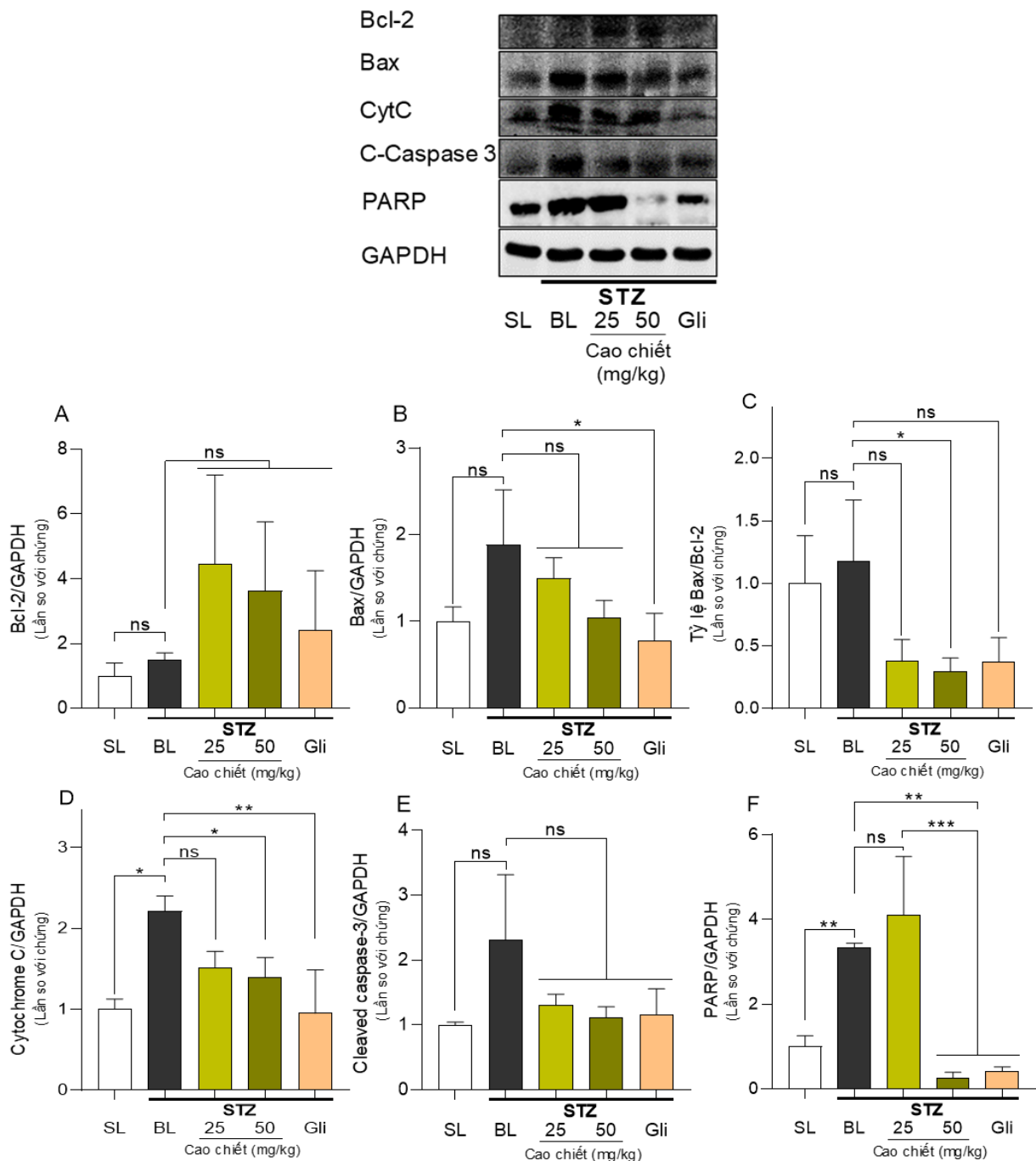
Diện tích và số lượng tiểu đảo tụy ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với lô bệnh lý ($p > 0,05$).

Diện tích tiểu đảo tụy ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg cao hơn không đáng kể so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Trong khi đó, số lượng tiểu đảo tụy ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p < 0,05$).

Như vậy, cao chiết liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện tổn thương tiểu đảo tụy trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ.

3.2.1.3.3. Cơ chế tác dụng bảo vệ chống apoptosis tế bào tụy của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng streptozotocin

Cơ chế tác dụng bảo vệ tiểu đảo tụy chống apoptosis tế bào của cao chiết ethanol đã được sơ bộ chứng minh trong thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương tiểu đảo tụy bằng STZ. Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin và cải thiện tổn thương tiểu đảo tụy của cao chiết ethanol cũng đã được chứng minh trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ. Do đó, tác dụng bảo vệ chống apoptosis tế bào tụy *in vivo* của cao chiết ethanol tiếp tục được nghiên cứu trên mô hình này thông qua sự biểu hiện của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu apoptosis tế bào bao gồm Bcl-2, Bax, cytochrom c, cleaved caspase-3 và PARP, con đường tín hiệu MAPK bao gồm p-p38 MAPK, ERK1/2, p-AMPK và JNK1, con đường tín hiệu NF- κ B bao gồm NF- κ B p65 bằng kỹ thuật Western blot.



Hình 3.17. Tác động của cao chiết ethanol lên mức độ biểu hiện tương đối của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu apoptosis ở mô tụy chuột tăng glucose huyết bởi STZ sau 7 ngày điều trị

*Gli: Glibenclamid, Trung bình $\pm$ SD (n = 3); ^{ns} $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ và *** $p < 0,001$ (Phép kiểm Tukey)*

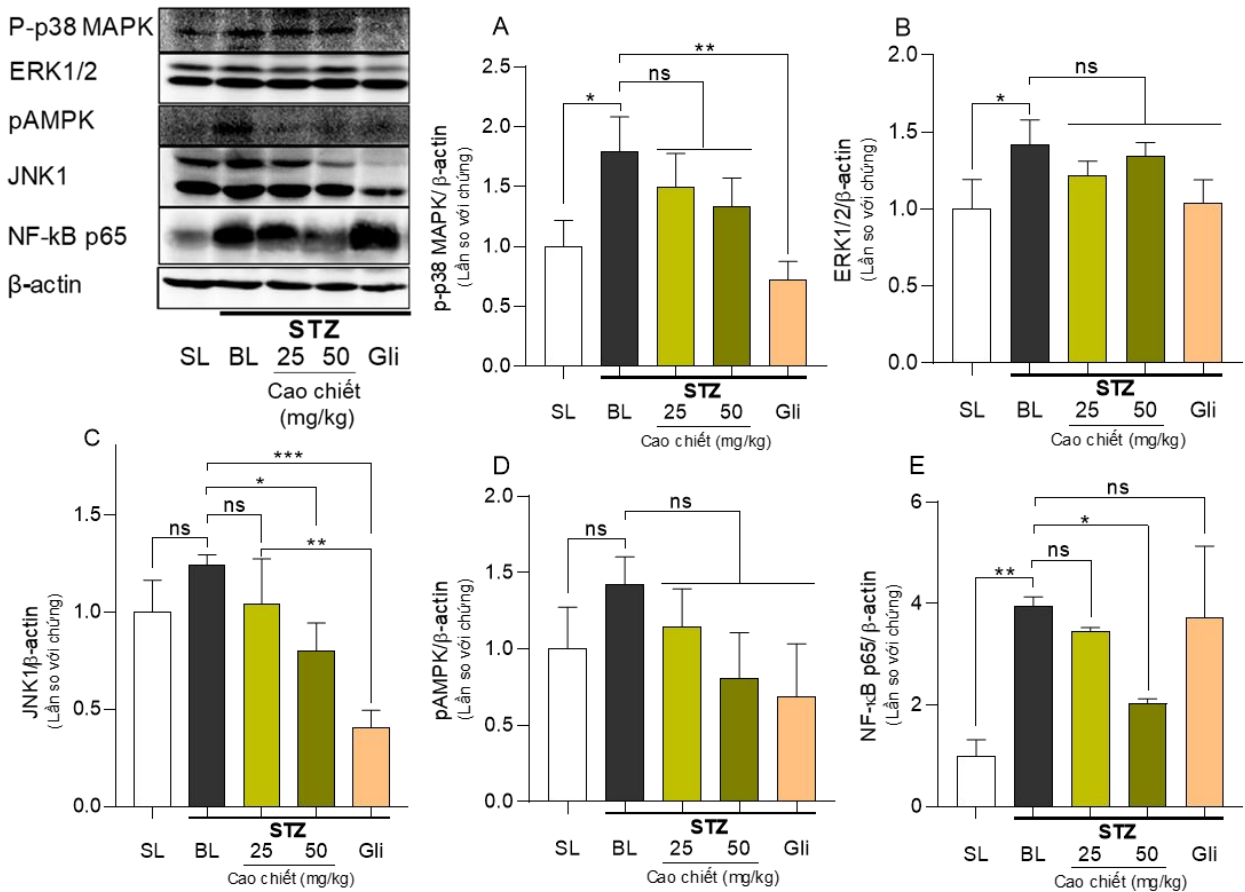
Kết quả ở **hình 3.17** cho thấy:

Mức độ biểu hiện của Bcl-2, Bax, tỷ lệ Bax/Bcl-2 và cleaved caspase-3 ở lô bệnh lý không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Mức độ biểu hiện của Bcl-2 ở các lô bệnh lý được điều trị có xu hướng cao hơn so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Mức độ biểu hiện của Bax, tỷ lệ Bax/Bcl-2 và cleaved caspase-3 ở các lô bệnh lý được điều trị có xu hướng thấp hơn so với lô bệnh lý ($p > 0,05$).

Mức độ biểu hiện của cytochrom c ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Cao chiết liều 25 mg/kg làm giảm không đáng kể mức độ biểu hiện của cytochrom c so với lô bệnh lý ($p > 0,05$); trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của cytochrom c so với lô bệnh lý ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

Mức độ biểu hiện của PARP ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,01$). Mức độ biểu hiện của PARP ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý. Trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của PARP so với lô bệnh lý ($p < 0,01$). Đồng thời, mức độ biểu hiện của PARP ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg hoặc glibenclamid liều 5 mg/kg thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg ($p < 0,001$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn liều 50 mg/kg thể hiện xu hướng tác dụng bảo vệ tụy có thể thông qua cơ chế ngăn chặn quá trình apoptosis tế bào tụy trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ bởi điều chỉnh giảm sự biểu hiện của một số protein liên quan đến apoptosis bao gồm cytochrom c và PARP.



Hình 3.18. Tác động của cao chiết ethanol lên mức độ biểu hiện tương đối của một số protein liên quan đến con đường tín hiệu MAPK và NF-κB ở mô tụy chuột tăng glucose huyết bởi STZ sau 7 ngày điều trị

*Gli: Glibenclamid, Trung bình ± SD (n = 3); ^{ns}p > 0,05, *p < 0,05, **p < 0,01 và ***p < 0,001 (Phép kiểm Tukey)*

Kết quả ở **hình 3.18** cho thấy:

Mức độ biểu hiện của p-p38 MAPK ở lô bệnh lý cao đáng kể hơn so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Cao chiết liều 25 và 50 mg/kg làm giảm không đáng kể mức độ biểu hiện của p-p38 MAPK so với lô bệnh lý ($p > 0,05$) nhưng glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của p-p38 MAPK so với lô bệnh lý ($p < 0,01$).

Mức độ biểu hiện của ERK1/2 ở lô bệnh lý cao đáng kể hơn so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Mức độ biểu hiện của ERK1/2 ở các lô bệnh lý được điều trị không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p > 0,05$).

Mức độ biểu hiện của JNK1 ở lô bệnh lý cao hơn không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Mức độ biểu hiện của JNK1 ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý. Trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của JNK1 so với lô bệnh lý ($p < 0,05$ và $p < 0,001$). Đồng thời, mức độ biểu hiện của JNK1 ở lô bệnh lý được điều trị với glibenclamid 5 mg/kg thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg ($p < 0,01$).

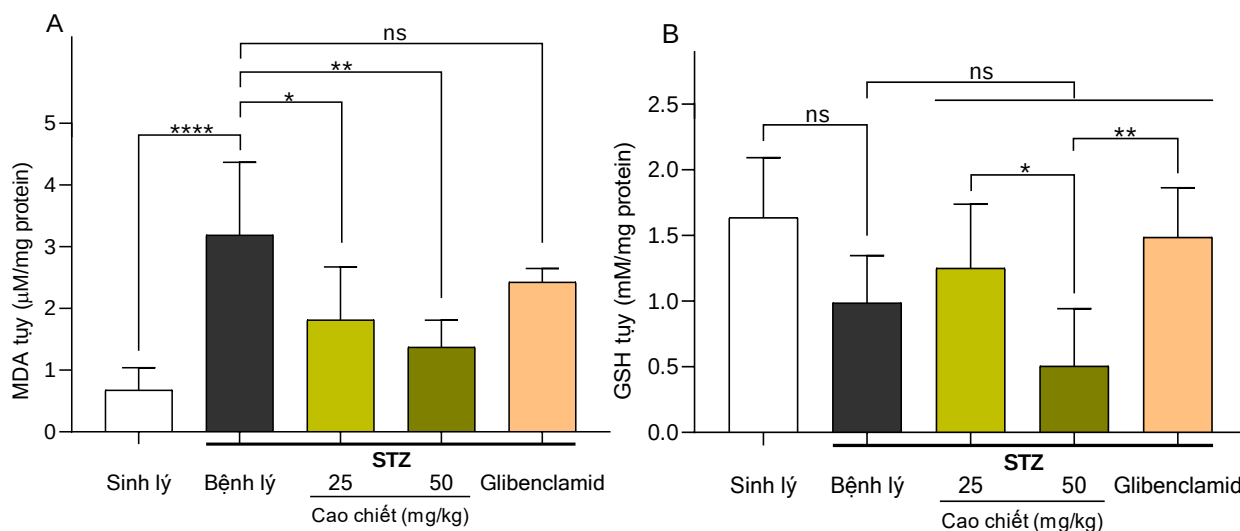
Mức độ biểu hiện của p-AMPK ở lô bệnh lý cao hơn không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Cao chiết (25 và 50 mg/kg) và glibenclamid (5 mg/kg) làm giảm không đáng kể mức độ biểu hiện p-AMPK so với lô bệnh lý ($p > 0,05$).

Mức độ biểu hiện của NF- κ B p65 ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,01$). Mức độ biểu hiện của NF- κ B p65 ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg hoặc glibenclamid liều 5 mg/kg không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện của NF- κ B p65 so với lô bệnh lý ($p < 0,05$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn liều 50 mg/kg thể hiện xu hướng tác dụng bảo vệ tuy có thể thông qua cơ chế ngăn chặn con đường tín hiệu MAPK và NF- κ B trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ bởi điều chỉnh giảm sự biểu hiện của một số protein bao gồm JNK1 và NF- κ B p65.

3.2.1.3.4. Cơ chế tác dụng cải thiện tổn thương oxy hóa tế bào tụy của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng streptozotocin

Tác dụng cải thiện tổn thương tụy của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua mức độ của các chỉ dấu stress oxy hoá bao gồm MDA và GSH trong dịch đồng thể tụy.



Hình 3.19. Tác dụng cải thiện tổn thương oxy hóa tế bào tụy của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 6$); Hàm lượng MDA (A) và GSH (B) trong mô tụy; $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.19** cho thấy:

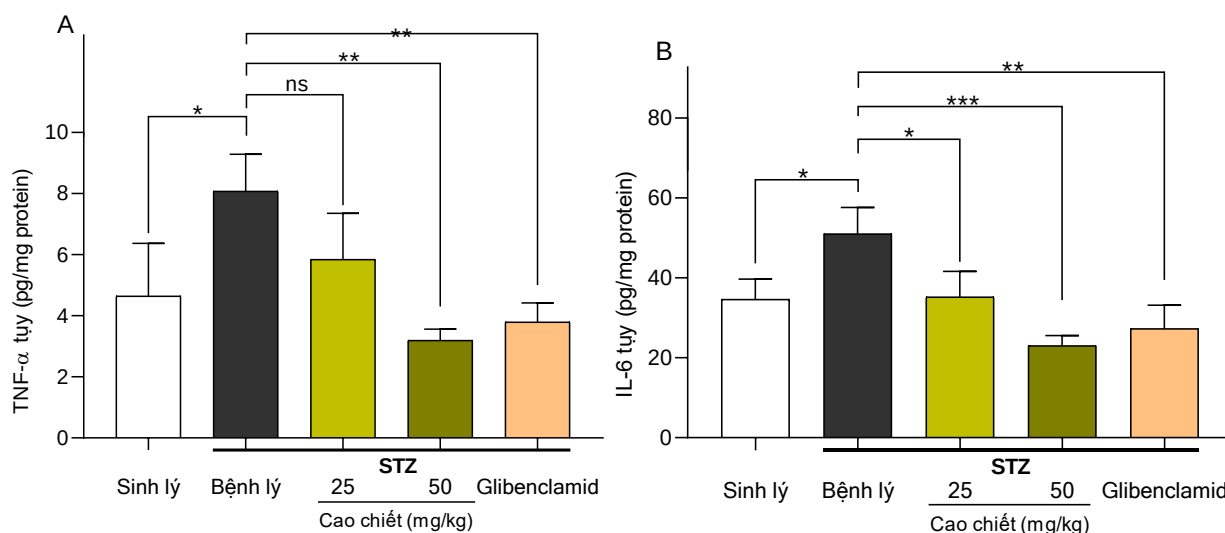
Hàm lượng MDA tụy ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Cao chiết liều 25 và 50 mg/kg làm giảm đáng kể hàm lượng MDA tụy so với lô bệnh lý ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Trong khi đó, glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm không đáng kể hàm lượng MDA tụy so với lô bệnh lý ($p > 0,05$).

Hàm lượng GSH tụy ở lô bệnh lý thấp hơn không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Hàm lượng GSH tụy ở các lô bệnh lý được điều trị không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg có hàm lượng GSH thấp hơn đáng kể so với các lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng cải thiện tổn thương tụy thông qua cơ chế chống peroxy hóa lipid màng tế bào.

3.2.1.3.5. Cơ chế tác dụng cải thiện tổn thương do viêm của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng streptozotocin

Tác dụng cải thiện tổn thương tụy của cao chiết ethanol được đánh giá thông qua mức độ của một số cytokin viêm bao gồm TNF- α và IL-6 trong dịch đồng thể tụy.



Hình 3.20. Tác dụng cải thiện tổn thương tụy do viêm của cao chiết ethanol sau 7 ngày điều trị trên chuột tăng glucose huyết bởi STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); Hàm lượng cytokin viêm TNF- α (A) và IL-6 (B) trong mô tụy;

$^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{***}p < 0,001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.20** cho thấy:

Hàm lượng TNF- α tụy ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Cao chiết liều 25 mg/kg làm giảm không đáng kể hàm lượng TNF- α tụy so với lô bệnh lý ($p > 0,05$). Trong khi đó, cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid liều 5 mg/kg làm giảm đáng kể hàm lượng TNF- α tụy so với lô bệnh lý ($p < 0,01$).

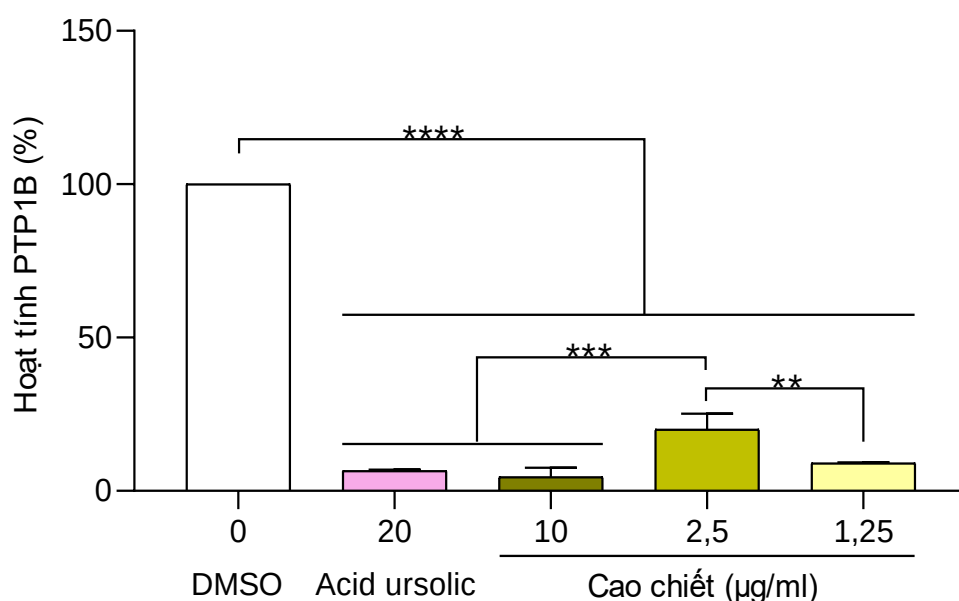
Hàm lượng IL-6 tụy ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Cao chiết (25 và 50 mg/kg) và glibenclamid (5 mg/kg) đều làm giảm đáng kể hàm lượng IL-6 tụy so với lô bệnh lý ($p < 0,05$, $p < 0,001$ và $p < 0,01$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng cải thiện tổn thương tụy thông qua cơ chế chống viêm.

3.2.1.4. Cơ chế tác dụng làm tăng độ nhạy với insulin

3.2.1.4.1. Tác dụng ức chế PTP1B của cao chiết ethanol

Tác dụng ức chế PTP1B *in vitro* của cao chiết ethanol được đánh giá để sơ bộ tìm hiểu cơ chế tác dụng của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn.



Hình 3.21. Tác dụng ức chế PTP1B *in vitro* của cao chiết ethanol

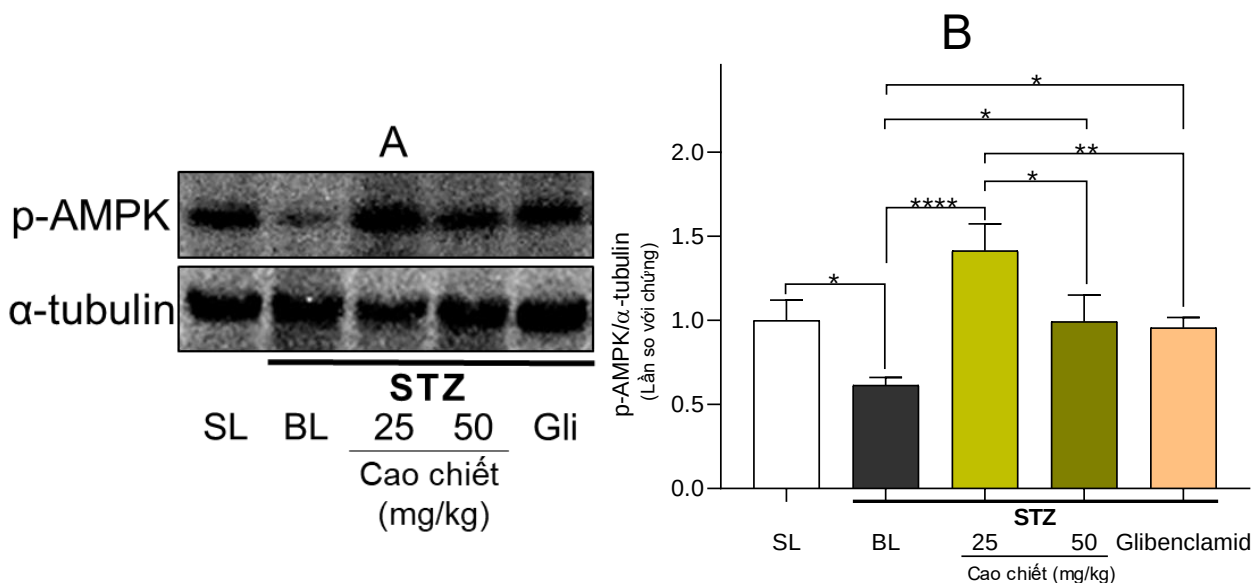
Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ và **** $p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.21** cho thấy:

Cao chiết ở các nồng độ khảo sát (1,25; 2,5 và 10 $\mu\text{g/ml}$) và acid ursolic (20 μM) đều có tác dụng ức chế PTP1B *in vitro*. Cao chiết ở nồng độ từ 1,25 đến 10 $\mu\text{g/ml}$ ức chế hơn 50% hoạt động PTP1B nên giá trị IC_{50} của cao chiết có thể nhỏ hơn 1,25 $\mu\text{g/ml}$ trong khi giá trị IC_{50} của acid ursolic là 3,70 μM (tương đương 1,69 $\mu\text{g/ml}$) (**Bảng 3.6**).

3.2.1.4.2. Tác dụng hoạt hóa AMPK ở gan của cao chiết ethanol

Tác dụng hoạt hoá AMPK ở gan của cao chiết ethanol được đánh giá trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ thông qua mức độ biểu hiện của p-AMPK ở gan bằng kỹ thuật Western blot.



Hình 3.22. Tác động của cao chiết ethanol lên sự biểu hiện của p-AMPK ở mô gan chuột tăng glucose huyết bởi STZ sau 7 ngày điều trị

Gli: Glibenclamid, Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); (A) Hình ảnh đại diện của các dải protein được phân tích bằng Western blot, (B) Mức độ biểu hiện tương đối của p-AMPK; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ và **** $p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.22** cho thấy:

Mức độ biểu hiện của p-AMPK ở lô bệnh lý thấp hơn đáng kể so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Cao chiết (25 và 50 mg/kg) và glibenclamid (5 mg/kg) đều làm tăng đáng kể mức độ biểu hiện của p-AMPK so với lô bệnh lý. Mặt khác, mức độ biểu hiện của p-AMPK ở lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg hoặc glibenclamid liều 5 mg/kg ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hoạt hoá AMPK ở gan trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ.

3.2.2. Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của một số hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn

Để xác định thành phần hoá học có thể góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Một số hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn đã được sàng lọc tác dụng ức chế α -glucosidase *in vitro*. Các hợp chất đã được phân lập từ

phân đoạn ethyl acetat (phân đoạn có khối lượng cao nhất) bao gồm afzelechin, coniferaldehyd, daucosterol, 4-hydroxybenzaldehyd, sinapaldehyd và acid trans-cinnamic. Kết quả cho thấy afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng ức chế α -glucosidase *in vitro* cao hơn so với các hợp chất còn lại (**Phụ lục 3**). Do đó, hai hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn bao gồm afzelechin và coniferaldehyd có hiện diện trong cao chiết ethanol được nghiên cứu một số tác dụng sinh học *in vitro* bao gồm ức chế α -glucosidase, kích thích tế bào β tụy tiết insulin và ức chế PTP1B.

3.2.2.1. Cơ chế tác dụng làm chậm hấp thu glucid của afzelechin và coniferaldehyd

Tác dụng làm chậm hấp thu glucid của afzelechin và coniferaldehyd được đánh giá thông qua khả năng ức chế α -glucosidase *in vitro*.

Bảng 3.5. Tác dụng ức chế α -glucosidase của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn

Hợp chất	Phần trăm ức chế (%)					IC ₅₀ (μ M)
Nồng độ (μ M)	45,58	91,15	182,30	364,60	546,91	
Afzelechin	17,51 $\pm$ 2,86	27,05 $\pm$ 3,65	48,42 $\pm$ 3,41	79,53 $\pm$ 5,08	91,68 $\pm$ 3,85	184,63 $\pm$ 5,71
Nồng độ (μ M)	17,54	35,08	70,15	140,31	280,62	
Coniferaldehyd	9,38 $\pm$ 2,88	29,99 $\pm$ 4,14	64,19 $\pm$ 4,54	90,72 $\pm$ 0,54	97,11 $\pm$ 0,16	52,84 $\pm$ 1,63
Nồng độ (μ M)	145,21	290,43	580,85	1161,70	2323,41	
Acarbose	23,04 $\pm$ 4,48	36,70 $\pm$ 6,65	44,99 $\pm$ 2,27	64,19 $\pm$ 3,27	73,31 $\pm$ 2,42	637,80 $\pm$ 78,19

Trung bình $\pm$ SD (n = 3)

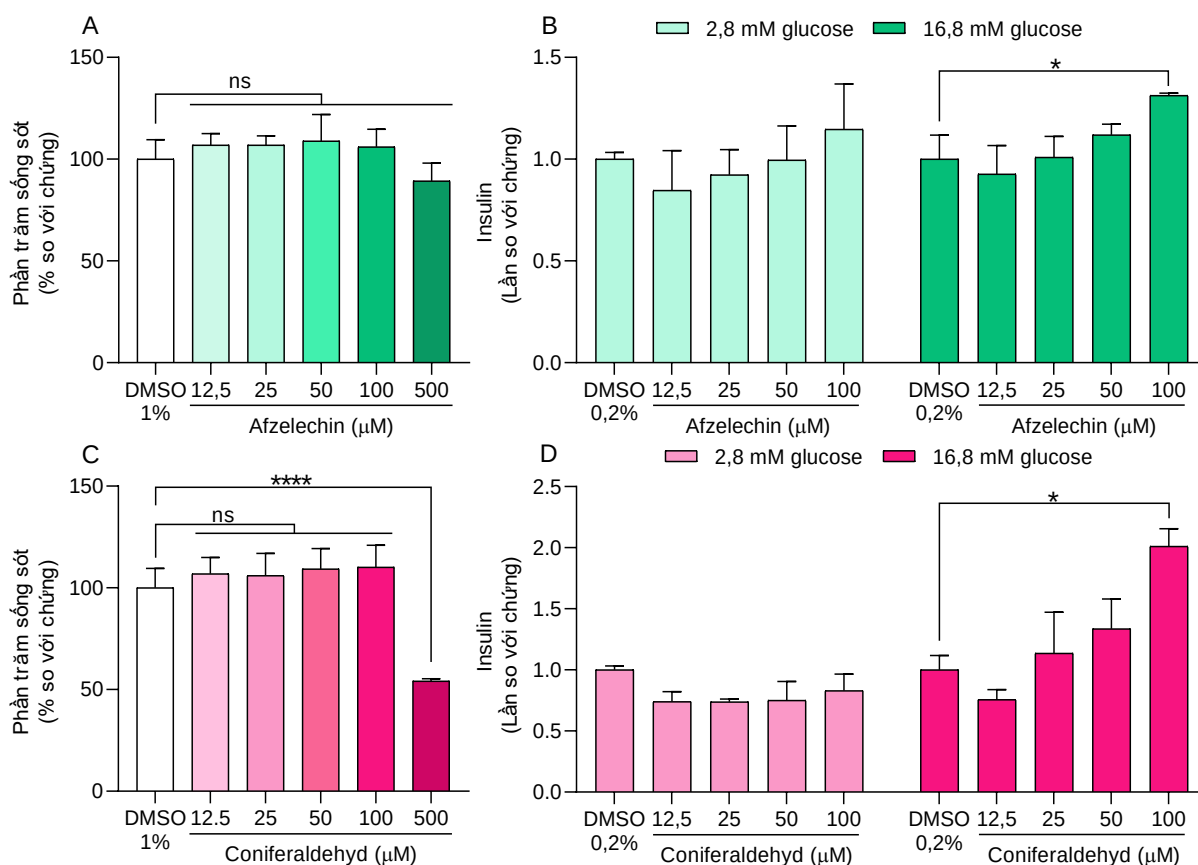
Kết quả ở **bảng 3.5** cho thấy:

Afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng ức chế α -glucosidase với IC₅₀ tương ứng là 184,63 và 52,84 μ M so với IC₅₀ của acarbose là 637,80 $\pm$ 78,19 μ M. Như vậy, coniferaldehyd có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt hơn so với afzelechin và acarbose.

Bên cạnh đó, phân tích lắp ghép phân tử *in silico* cũng cho thấy tác dụng, vị trí và loại tương tác ức chế α -glucosidase của afzelechin, coniferaldehyd và acarbose. Kết hợp kết quả phân tích CNNscore và ái lực tối thiểu có thể thấy acarbose có tác dụng thấp hơn afzelechin và coniferaldehyd, điều này tương đồng với kết quả thực nghiệm *in vitro*. Tuy nhiên, dựa trên CNNscore và ái lực tối thiểu chưa thể kết luận được tác dụng của coniferaldehyd tốt hơn afzelechin như kết quả thu được ở thực nghiệm *in vitro*, điều này có thể liên quan đến cấu trúc protein maltase được sử dụng trong phân tích *in silico* (**Phụ lục 20**).

3.2.2.2. Cơ chế tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd

Tác động của afzelechin và coniferaldehyd lên khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo được đánh giá bằng thử nghiệm MTT và khả năng kích thích tế bào β tiểu đảo tiết insulin được đánh giá bằng thử nghiệm GSIS.



Hình 3.23. Tác dụng làm tăng tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuỗi cô đơn trong thử nghiệm kích thích tế bào β tiểu đảo tụy bằng glucose

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); (A, C) Phản trăm sống sót tế bào tiểu đảo khi được xử lý với afzelechin và coniferaldehyd so với đối chứng (DMSO 1%), (B, D) Mức độ insulin được giải phóng từ tiểu đảo khi được xử lý với afzelechin và coniferaldehyd so với đối chứng (DMSO 0,2%) trong thử nghiệm GSIS; $^{ns}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.23** cho thấy:

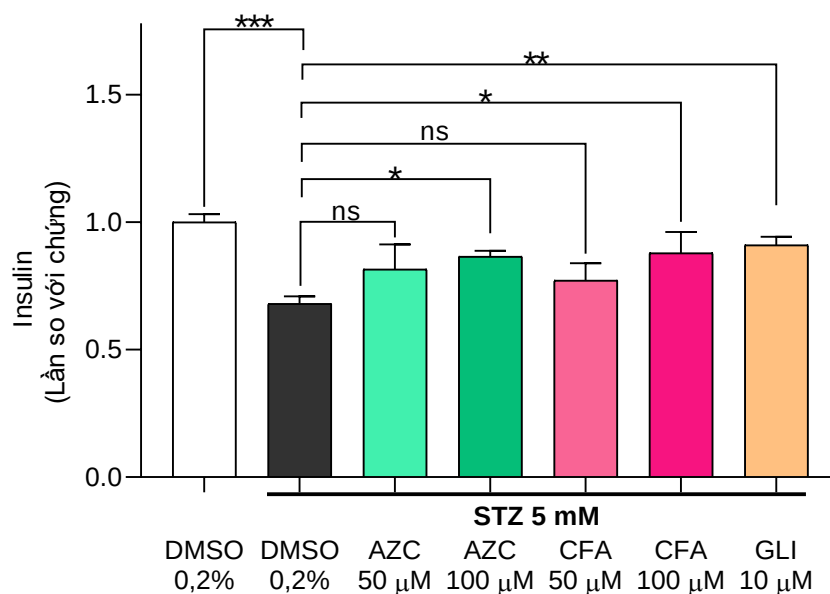
Hình A cho thấy afzelechin ở nồng độ từ 12,5 đến 500 μ M không làm ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo so với nhóm chứng ($p > 0,05$).

Hình B cho thấy afzelechin ở các nồng độ khảo sát (12,5 đến 100 $\mu\text{g/ml}$) không thể hiện tác động kích thích tiết insulin so với nhóm chứng ở điều kiện cơ bản (glucose 2,8 mM). Ở điều kiện này, hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với afzelechin ở các nồng độ không khác biệt đáng kể so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Ở điều kiện kích thích (glucose 16,8 mM), hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với afzelechin ở các nồng độ 12,5, 25 và 50 μM không khác biệt đáng kể so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Trong khi đó, afzelechin ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng tiết insulin đáng kể so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Hình C cho thấy coniferaldehyd ở nồng độ từ 12,5 đến 100 μM không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Coniferaldehyd ở nồng độ 500 μM làm giảm đáng kể phần trăm sống sót tế bào tiểu đảo so với nhóm chứng ($p < 0,0001$).

Hình D cho thấy coniferaldehyd ở các nồng độ khảo sát (12,5 đến 100 $\mu\text{g/ml}$) không thể hiện tác động kích thích tiết insulin so với nhóm chứng ở điều kiện cơ bản (glucose 2,8 mM). Ở điều kiện này, hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với coniferaldehyd ở các nồng độ khảo sát không khác biệt so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Ở điều kiện kích thích (glucose 16,8 mM), hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với coniferaldehyd ở các nồng độ 12,5, 25 và 50 μM không khác biệt đáng kể so với nhóm chứng ($p > 0,05$). Trong khi đó, coniferaldehyd ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng tiết insulin đáng kể so với nhóm chứng ($p < 0,05$).

Như vậy, afzelechin và coniferaldehyd ở nồng độ 100 μM có tác dụng làm tăng tiết insulin ở tế bào β tiểu đảo tụy phân lập từ chuột nhắt trắng khi được kích thích ở nồng độ glucose cao (16,8 mM). Tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd ở nồng độ 50 và 100 μM được tiếp tục nghiên cứu trên mô hình tiểu đảo tụy phân lập gây tổn thương bởi streptozotocin.



Hình 3.24. Tác dụng kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn trong thực nghiệm gây tổn thương đảo tụy bằng STZ

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); Mức độ insulin được giải phóng từ tiểu đảo khi được đồng xử lý với afzelechin (AZC)/coniferaldehyd (CFA)/glimepirid (GLI) và STZ sau khi được kích thích bởi glucose nồng độ cao (16,8 mM); $^{ns}p > 0,05$, $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{***}p < 0,001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.24** cho thấy:

Hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với STZ ở nồng độ 5 mM thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,001$). Hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với afzelechin hoặc coniferaldehyd ở nồng độ 50 μ M cao hơn không đáng kể so với nhóm STZ ($p > 0,05$). Trong khi đó, hàm lượng insulin ở nhóm được xử lý với afzelechin hoặc coniferaldehyd ở nồng độ 100 μ M hoặc glimepirid ở nồng độ 10 μ M cao hơn đáng kể so với nhóm STZ ($p < 0,05$, $p < 0,05$ và $p < 0,01$).

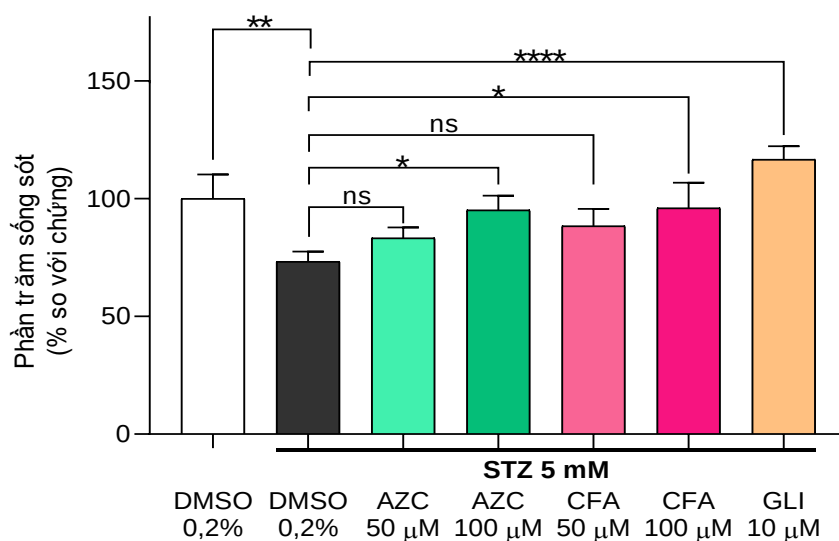
Như vậy, afzelechin và coniferaldehyd ở nồng độ 100 μ M có tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tiết insulin trên mô hình tiểu đảo tụy phân lập gây tổn thương bằng STZ.

Bên cạnh đó, phân tích lắp ghép phân tử *in silico* cũng cho thấy tác dụng, vị trí và loại tương tác ức chế kênh K_{ATP} của afzelechin, coniferaldehyd và glimepirid. Kết hợp kết quả phân tích ái lực tối thiểu có thể thấy mức độ ức chế kênh K_{ATP} theo thứ tự là glimepirid >

afzelechin > coniferaldehyd (**Phụ lục 20**), điều này khá tương đồng với kết quả thực nghiệm *in vitro*. Như vậy, tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tiết insulin của afzelechin và coniferaldehyd có thể thông qua cơ chế dự đoán là gắn và ức chế kênh K_{ATP} .

3.2.2.3. Tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy của afzelechin và coniferaldehyd

Afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin trên thực nghiệm *in vitro* gây tổn thương đảo tụy bằng STZ. Do đó, tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy hai hợp chất này được tiếp tục nghiên cứu.



Hình 3.25. Tác dụng bảo vệ tế bào tiểu đảo của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuỗi cô đơn trong thực nghiệm gây tổn thương đảo tụy bằng STZ

Afzelechin (AZC), Coniferaldehyd (CFA), Glimepirid (GLI); Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$); $^{ns}p > 0,05$, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{****}p < 0,0001$ (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **hình 3.25** cho thấy:

STZ ở nồng độ 5 mM làm giảm đáng kể phần trăm sống sót của tế bào tiểu đảo so với nhóm chứng ($p < 0,01$). Afzelechin và coniferaldehyd ở nồng độ 50 μ M không làm tăng đáng kể phần trăm sống sót của tế bào tiểu đảo so với nhóm STZ ($p > 0,05$). Trong khi đó, afzelechin và coniferaldehyd ở nồng độ 100 μ M và glimepirid ở nồng độ 10 μ M làm tăng đáng kể phần trăm sống sót của tế bào tiểu đảo so với nhóm STZ ($p < 0,05$, $p < 0,05$ và $p < 0,0001$). Kết quả này cho thấy afzelechin và coniferaldehyd có khả năng bảo vệ tế bào tiểu đảo chống lại độc tính của STZ.

3.2.2.4. Cơ chế tác dụng làm tăng độ nhạy với insulin của afzelechin và coniferaldehyd

Tác dụng làm tăng độ nhạy với insulin của afzelechin và coniferaldehyd bước đầu được đánh giá thông qua khả năng ức chế PTP1B *in vitro*.

Bảng 3.6. Tác dụng ức chế PTP1B của afzelechin và coniferaldehyd từ hạt chuối cô đơn

Hợp chất	Phần trăm ức chế (%)					IC ₅₀ (μ M)
<i>Nồng độ (μM)</i>	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0	
Afzelechin	26,82 $\pm$	34,15 $\pm$	41,00 $\pm$	52,93 $\pm$	68,55 $\pm$	7,58 $\pm$
	2,73	4,76	3,94	1,99	3,58	1,53
<i>Nồng độ (μM)</i>	0,625	2,5	10,0	20,0		
Coniferaldehyd	15,73 $\pm$	21,89 $\pm$	57,68 $\pm$	94,57 $\pm$		8,39 $\pm$
	1,95	4,11	3,25	3,05		1,42
<i>Nồng độ (μM)</i>	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0	
Acid ursolic	23,04 $\pm$	35,56 $\pm$	60,06 $\pm$	83,81 $\pm$	93,47 $\pm$	3,70 $\pm$
	4,30	2,54	1,80	5,68	0,44	0,34

Trung bình $\pm$ SD ($n = 3$)

Kết quả ở **bảng 3.6** cho thấy:

Afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng ức chế PTP1B với IC₅₀ tương ứng là 7,58 và 8,39 μ M so với IC₅₀ của acid ursolic là 3,70 μ M.

Bên cạnh đó, phân tích lắp ghép phân tử *in silico* cũng cho thấy tác dụng, vị trí và loại tương tác ức chế PTP1B của afzelechin, coniferaldehyd và acid ursolic. Kết hợp kết quả phân tích CNNscore và ái lực tối thiểu có thể thấy acid ursolic có tác dụng cao hơn afzelechin và coniferaldehyd. Tuy nhiên, dựa trên CNNscore và ái lực tối thiểu chưa thể kết luận được tác dụng của coniferaldehyd cao hay thấp hơn afzelechin (**Phụ lục 20**), điều này khá tương đồng với kết quả thực nghiệm *in vitro*.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

Họ Chuối (Musaceae) bao gồm 3 chi *Musa*, *Ensete* và *Musella*; trong đó, phần lớn các loài thuộc chi *Musa* (khoảng 70 loài), 7 loài thuộc chi *Ensete* và chỉ có một loài thuộc chi *Musella* [151]. Tại Việt Nam, chi *Ensete* có ba loài bao gồm *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman, *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman và *Ensete lecongkietii* Luu, N.L.Vu & Q.D.Nguyen. Loài *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman với tên thường gọi là chuối cô đơn, chuối mò côi, chuối tuyết hay chuối hoa sen [12, 152]. Theo kinh nghiệm dân gian, hạt chuối cô đơn được dùng để chữa sỏi tiết niệu, đau nhức xương khớp, đái tháo đường, tiểu gắt, phù nề, dị ứng da, táo bón, mụn nhọt. Tại thời điểm bắt đầu thực hiện đề tài, chưa có công bố khoa học về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của hạt chuối cô đơn [5]. Do đó, một số thử nghiệm sinh học *in vitro* đã được thực hiện để sàng lọc tác dụng của hạt chuối cô đơn định hướng theo kinh nghiệm dân gian như ức chế α -amylase, ức chế α -glucosidase, ức chế hình thành sỏi tiết niệu, ức chế xanthin oxidase, kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm. Kết quả cho thấy hạt chuối cô đơn là đối tượng tiềm năng để tiếp cận nghiên cứu theo hướng hỗ trợ điều trị ĐTD. Theo hướng hỗ trợ điều trị ĐTD, hạt của loài *E. superbum* cũng được công bố có tác dụng ức chế α -glucosidase, bảo vệ tế bào β , kháng oxy hóa [9], cải thiện chức năng thận do ĐTD [31].

Để có những minh chứng khoa học cho việc sử dụng hạt chuối cô đơn trong chữa bệnh ĐTD theo kinh nghiệm dân gian cũng như định hướng ứng dụng dược liệu này làm nguyên liệu làm thuốc hỗ trợ điều trị ĐTD trong tương lai, việc nghiên cứu về thành phần hóa học, tác dụng dược lý và làm rõ cơ chế tác dụng của dược liệu này là cần thiết. Chính vì vậy, đề tài này đã đánh giá tác dụng hạ glucose huyết, cải thiện tổn thương gan và thận trong điều kiện tăng glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn; đồng thời, xác định cơ chế tác dụng hạ glucose huyết và thành phần hóa học góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn.

4.1. Tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm

4.1.1. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol bằng nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống

Nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) là một trong những thử nghiệm được

sử dụng để chẩn đoán tiền ĐTĐ và ĐTĐ trên người. Trên động vật, thử nghiệm này được thực hiện tương đối nhanh và rẻ tiền để đo khả năng sử dụng glucose của cơ thể thông qua xác định nồng độ glucose huyết và diện tích dưới đường cong của glucose (AUC glucose, chỉ số được sử dụng rộng rãi để đánh giá hiệu quả của thuốc kiểm soát tăng glucose huyết sau bữa ăn [153]) trong một khoảng thời gian nhất định. Ở cơ địa chuột bình thường, nồng độ glucose huyết sẽ trở lại bình thường sau 2 giờ dung nạp glucose bằng đường uống, một thuốc có tác dụng cải thiện khả năng dung nạp glucose sẽ làm cho nồng độ glucose huyết giảm nhanh hơn [154]. Do đó, OGTT trên chuột bình thường được áp dụng để thăm dò liều cao chiết có tác dụng chống tăng glucose huyết. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol liều 12,5 và 25 mg/kg có tác dụng làm giảm đáng kể nồng độ glucose huyết (>30%) so với lô chứng ở thời điểm sau 30 và 60 phút dung nạp glucose. AUC glucose ở lô chuột được uống cao chiết liều 12,5 và 25 mg/kg cũng giảm rõ rệt so với lô chứng. Tuy nhiên, khi liều cao chiết tăng lên 50 mg/kg thì mức độ làm giảm glucose huyết và AUC glucose giảm. Điều này chưa thể giải thích rõ ràng do chưa có những dữ liệu khoa học trước đó về các tác dụng liên quan đến đại tháo đường của cao chiết từ hạt chuối cô đơn. Tuy nhiên, dựa vào kết quả đánh giá khả năng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol trên thực nghiệm *in vitro* GSIS (**Hình 3.11B**) cho thấy khi tăng nồng độ cao chiết lên 100 $\mu\text{g/ml}$ thì mức độ insulin được tiết ra giảm so với nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$. Điều này có thể cho thấy khi tăng liều cao chiết thì lượng insulin tiết ra giảm dẫn đến tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol đã giảm trong thử nghiệm OGTT trên chuột bình thường. Tuy nhiên, trong giới hạn của luận án chưa rõ nguyên nhân của hiện tượng này.

OGTT là một thực nghiệm mô phỏng tình trạng tăng glucose huyết sau ăn và được dùng để đánh giá mức độ hấp thu glucose vào tế bào. Cơ thể có nhiều cách thức để đáp ứng với tình trạng này giúp kiểm soát tăng glucose huyết sau ăn, chẳng hạn như tăng tiết insulin từ tế bào β tụy, tăng tổng hợp và tiết amylin (một hormon đồng tiết cùng với insulin từ tế bào β tụy, hiệp đồng với insulin làm giảm glucose huyết), tác dụng incretin (hormon ở ruột bao gồm GLP-1 và GIP có tác dụng tăng tiết insulin sau ăn khi glucose huyết tăng, giảm tiết glucagon ở tế bào α tụy), tăng hấp thu glucose vào tế bào đích,... Chính vì vậy, thử nghiệm này cũng có thể cho phép nhận định được mức độ tiết insulin của tế bào β và đề kháng insulin nên thường được sử dụng để chẩn đoán tiền ĐTĐ và ĐTĐ. Trong luận án, glibenclamid được sử dụng làm chứng dương có tác dụng làm giảm glucose huyết theo cơ chế kích thích tế bào β tụy tiết insulin. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng làm giảm glucose

huyết trong thử nghiệm OGTT có thể dự đoán thông qua một hoặc một số tác động như đã đề cập ở trên, để có những nhận định chính xác hơn thì thử nghiệm tác dụng trên mô hình tăng glucose huyết và nghiên cứu cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn là cần thiết.

Trên động vật bình thường, một thuốc có tác dụng làm giảm nồng độ glucose huyết có thể thông qua nhiều tác động như kích thích tế bào β tụy tiết insulin, làm chậm/giảm quá trình hấp thu glucid, tăng độ nhạy cảm của tế bào đích với insulin,... Những thuốc có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin không chỉ có tác dụng hạ glucose huyết ở động vật bình thường mà còn có thể tiềm ẩn nguy cơ gây hạ glucose huyết quá mức khi kích thích β tụy tiết quá nhiều insulin. Trong khi đó, đối với thuốc chỉ làm chậm/giảm quá trình hấp thu glucid hay tăng độ nhạy cảm của tế bào đích với insulin thường không gây hạ glucose huyết ở động vật bình thường. Nếu một thuốc có các tác động phối hợp dẫn đến hạ glucose huyết thì nguy cơ gây hạ glucose huyết quá mức sẽ cao hơn, khi đó các nghiên cứu về khoảng trị liệu và tác dụng phụ cần được tiến hành. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu trên chuột bình thường cũng cho thấy cao chiết ở liều 25 và 50 mg/kg không ảnh hưởng đáng kể đến nồng độ glucose huyết và thể trọng chuột sau 7 ngày uống (**Phụ lục 21**), cho thấy cao chiết ethanol ở liều khảo sát có thể không ảnh hưởng đến cân bằng nội môi glucose ở cơ địa chuột có nồng độ glucose huyết bình thường. Điều này cũng có thể được giải thích một phần bằng kết quả trong thực nghiệm *in vitro* trên tiểu đảo tụy cô lập (**Hình 3.11**), cho thấy cao chiết ethanol không làm ảnh hưởng đến lượng insulin được tiết ra ở điều kiện glucose bình thường so với nhóm chứng.

4.1.2. Mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ và tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

Streptozotocin (STZ) là tác nhân được sử dụng phổ biến để gây tình trạng đái tháo đường trên một số loài động vật do có độc tính cao và chọn lọc đối với tế bào β tụy thông qua các cơ chế bao gồm sự methyl hóa DNA, sản sinh NO và ROS, hậu quả là gây ra tình trạng tăng glucose huyết [155],[109]. STZ liều cao 150-200 mg/kg (i.p. hoặc i.v.) được báo cáo có thể gây mô hình ĐTĐ tuýp 1 trên chuột nhắt chủng Swiss hoặc BALB/c [156]; tuy nhiên, bằng chứng thực nghiệm gần đây cho thấy rằng STZ liều cao chưa đáp ứng được tình trạng ĐTĐ tuýp 1. Chuột nhắt chủng BALB/c được tiêm (i.p.) STZ liều 300 và 400 mg/kg tạo được mô hình ĐTĐ tuýp 1 hiệu quả (glucose > 300 mg/dl và C-peptid < 0,6 ng/ml, tức có thể đã phá hủy

hơn 90% khối lượng tế bào β tụy) nhưng tỷ lệ tử vong là 100% nên không thể áp dụng để nghiên cứu. Dùng liều thấp hơn (140-200 mg/kg) gây ra tăng glucose huyết kéo dài hơn ba ngày nhưng nồng độ C-peptid không đủ thấp để chẩn đoán là ĐTĐ tuýp 1. Như vậy, ở các liều này không phá hủy hoàn toàn tế bào β tuyến tụy (nồng độ C-peptid > 0,6 ng/ml) nên không có khả năng gây ra được mô hình bắt chước ĐTĐ tuýp 1 [116]. Đồng thời, cũng chưa có minh chứng đầy đủ nào cho rằng STZ liều cao có thể gây ra tình trạng đề kháng insulin tương tự như ĐTĐ tuýp 2. Mặc dù vậy, STZ vẫn là tác nhân được lựa chọn phổ biến để gây mô hình ĐTĐ vì có thể gây ra tình trạng tăng glucose huyết. Các kết quả nghiên cứu trước đây cũng cho thấy STZ là tác nhân có thể gây ra tình trạng tăng glucose huyết ổn định kéo dài cho phép nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của một tác nhân khi sử dụng trong thời gian dài. Chẳng hạn như, STZ liều duy nhất 200 mg/kg (i.p.) làm tăng glucose huyết trên 400 mg/dl sau 1-4 tuần tiêm trên chủng chuột nhắt C57BL/6J [157], STZ liều duy nhất 200 mg/kg (i.p.) làm tăng glucose huyết trên 500 mg/dl sau 3 tuần tiêm trên chủng chuột nhắt C57BL/6 [158], STZ liều duy nhất 160 mg/kg (i.p.) làm tăng glucose huyết trên 300 mg/dl sau 3 tuần tiêm trên chủng chuột nhắt BALB/c [116], STZ liều duy nhất 100 mg/kg (i.p.) làm tăng glucose huyết trên 20 mmol/l sau 5 tuần tiêm trên chủng chuột nhắt C57BL/6 [159]. Kết quả nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thị Thu Hương và cộng sự tại Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh về khảo sát liều STZ để gây mô hình tăng glucose huyết trên chủng chuột nhắt trắng *Swiss albino* cho thấy STZ liều 170 mg/kg là phù hợp để gây mô hình tăng glucose huyết với nồng độ glucose huyết trung bình sau 5 tuần tiêm vẫn cao hơn 200 mg/dl [160]. Do đó, STZ tiêm (i.p.) liều duy nhất 170 mg/kg được sử dụng để gây mô hình chuột tăng glucose huyết và áp dụng để nghiên cứu tác dụng của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn sau 1 tuần điều trị. Liều này chưa gây được mô hình ĐTĐ tuýp 1 do đảo tụy chưa bị phá hủy hoàn toàn, nồng độ insulin huyết giảm chỉ khoảng 60% so với lô chứng do tế bào β chỉ bị phá hủy một phần nên vẫn có thể đáp ứng với glibenclamid để tăng tiết insulin, làm giảm nồng độ glucose huyết. Điều này đã được thể hiện thông qua các kết quả của luận án. Liều này cũng chưa gây được mô hình ĐTĐ tuýp 2 vì chưa có minh chứng về sự kháng insulin khi chuột được tiêm STZ liều 170 mg/kg (Không thay đổi đáng kể chỉ số kháng insulin ước tính). Kết hợp lại, STZ liều 170 mg/kg gây ra mô hình tăng glucose huyết thực nghiệm là phù hợp hơn là mô hình ĐTĐ thực nghiệm.

Trong mô hình này, luận án đã sử dụng thuốc đối chiếu là glibenclamid, một sulfonyleurea có tác dụng hạ glucose huyết thông qua tác động kích thích tế bào β tiết insulin. Việc sử dụng

glibenclamid liều 5 mg/kg làm thuốc đối chiếu trên mô hình gây tăng glucose huyết bằng STZ là phù hợp vì đã được áp dụng trong nhiều nghiên cứu trước đây[117],[123],[125] và thuốc vẫn đáp ứng tốt trên mô hình này (STZ liều 170 mg/kg) với những đặc điểm đã phân tích ở trên.

Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy nồng độ glucose huyết trung bình của lô chuột bệnh lý không được điều trị vẫn cao hơn 200 mg/dl sau 14 ngày tiêm STZ liều 170 mg/kg. Trong khi các lô chuột bệnh lý được điều trị với cao chiết (12,5, 25 và 50 mg/kg) và glibenclamid (5 mg/kg) trong 7 ngày có nồng độ glucose huyết giảm rõ rệt về mức tương tự với lô chuột sinh lý, cho thấy tác dụng hạ glucose huyết đáng chú ý của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ, cao chiết liều 12,5 mg/kg thể hiện tác dụng hạ glucose huyết thấp hơn đáng kể so với cao chiết liều 50 mg/kg và glibenclamid 5 mg/kg. Do đó, trong giới hạn của luận án, cao chiết liều 25 và 50 mg/kg được chọn để tiến hành các nội dung nghiên cứu tiếp theo trên mô hình chuột tăng glucose huyết bằng STZ. Cao chiết hạt chuối cô đơn ở 2 liều này cũng có khả năng cải thiện nhẹ cân nặng chuột sau 7 ngày điều trị do tác động của STZ (**Phụ lục 22**). Bên cạnh đó, thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol trên mô hình chuột tăng glucose huyết bằng STZ đã được lặp lại để đảm bảo số lượng mẫu đánh giá đầy đủ các chỉ tiêu trong luận án. Một lần nữa, kết quả cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn liều 25 và 50 mg/kg có tác dụng hạ glucose huyết và cải thiện nhẹ trọng lượng cơ thể chuột sau 7 ngày điều trị (**Phụ lục 23**). Điều này cho phép khẳng định chắc chắn hơn về tiềm năng của hạt chuối cô đơn trong điều trị/hỗ trợ điều trị đái tháo đường.

Trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ, thử nghiệm OGTT được sử dụng để đánh giá hiệu quả hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn thông qua khả năng hấp thu glucose vào tế bào của cơ thể (có thể tăng độ nhạy cảm với insulin ở tế bào mô đích và/hoặc tăng tiết insulin từ tế bào β tụy). Kết quả cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng làm tăng khả năng dung nạp glucose của chuột tăng glucose huyết bởi STZ; trong đó, cao chiết liều 50 mg/kg thể hiện tác dụng tương đương với glibenclamid liều 5 mg/kg và tốt hơn cao chiết liều 25 mg/kg. Điều này có thể cho thấy cao chiết ở liều 25 mg/kg chưa đủ để thể hiện tác dụng do thử nghiệm được tiến hành trên mô hình bệnh lý, tế bào β đã bị gây tổn thương bởi STZ.

Thông qua quá trình tra cứu kỹ lưỡng các công bố khoa học liên quan đến cây chuối cô đơn cho thấy kết quả của luận án có thể được xem là minh chứng đầu tiên về tác dụng hạ

glucose huyết *in vivo* của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Công bố trước đây cho thấy một loài khác trong chi *Ensete* cũng có tác dụng hạ glucose huyết. *Ensete superbum* hay còn gọi là chuối vách đá, là một loài cùng chi với chuối cô đơn được chứng minh tác dụng hạ glucose huyết trên mô hình chuột cống chủng *Wistar albino* gây tăng glucose huyết bằng STZ liều 40 mg/kg [31]. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol từ hạt ở liều 400 mg/kg có tác dụng làm giảm đáng kể nồng độ glucose (giảm khoảng hơn 50%) và HbA1c (giảm khoảng gần 40%) sau 60 ngày điều trị. Như vậy, so sánh một cách tương đối có thể thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn (*E. glaucum*) có tác dụng hạ glucose huyết tốt hơn cao chiết ethanol từ hạt chuối vách đá (*E. superbum*) bởi cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn được dùng ở liều thấp hơn và trong thời gian ngắn hơn, có phần trăm hạ glucose huyết tương tự. Bên cạnh đó, cao chiết ethanol từ hạt *E. superbum* cũng không gây ra những thay đổi đáng kể về nồng độ glucose huyết và HbA1c sau 60 ngày uống trên chuột bình thường. Ghi nhận này tương tự với tác động của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn sau 7 ngày uống trên chuột bình thường. Kết hợp lại có thể nhận định sơ bộ rằng hạt của chi *Ensete* nói chung và hạt chuối cô đơn (*Ensete glaucum*) nói riêng là nguồn dược liệu tiềm năng có tác dụng hạ glucose huyết trên cơ địa tăng glucose huyết, có thể được xem xét nghiên cứu và phát triển sản phẩm theo hướng điều trị tăng glucose huyết.

Xét về mặt bản chất của cao chiết hạt chuối cô đơn, tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết là do sự tồn tại của các thành phần trong cao chiết, đặc biệt là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy hạt chuối cô đơn thu tại tỉnh Ninh Thuận và Bình Phước đều có chứa polyphenol, flavonoid, saponin và tannin [6],[7]. Kết quả cũng cho thấy sự hiện diện của polyphenol và flavonoid trong cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trong luận án (**Phụ lục 4**). Những nhóm hợp chất này đã được báo cáo có tác dụng hạ glucose huyết thông qua các hướng tác động khác nhau như ức chế enzyme tổng hợp glucose và thoái hóa glycogen, giảm đề kháng insulin, ức chế hấp thu glucose qua ruột, kích thích tiết insulin,... [42],[43]. Bên cạnh đó, hai hợp chất đã được phân lập từ hạt chuối cô đơn trong luận án bao gồm afzelechin (một flavan-3-ol thuộc nhóm flavonoid) và coniferaldehyd (một phenolic aldehyd) (**Phụ lục 5**). Các nghiên cứu trước đây cho thấy hai hợp chất này có những tác động có thể góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết hạt chuối cô đơn. Afzelechin từ *Bergenia ligulata* có tác dụng ức chế α -glucosidase với giá trị ID₅₀ (liều ức chế 50%) là 0,13 mM [161], afzelechin được sinh tổng hợp từ vi khuẩn *Escherichia coli* có tác dụng kích thích

tế bào β Min6 tiết insulin [162]. Coniferaldehyd có tác dụng cải thiện các rối loạn chuyển hóa lipid và glucose ở gan trong bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu thông qua giảm nồng độ chất béo trung tính nội bào và cholesterol toàn phần, đồng thời tăng hấp thu glucose và hàm lượng glycogen nội bào thông qua con đường tín hiệu LKB1/AMPK [163]. Ngoài ra, hai hợp chất này còn có một số tác dụng có thể hỗ trợ cải thiện chung đối với tình trạng ĐTĐ từ đó góp phần giảm nồng độ glucose huyết, chẳng hạn như afzelechin có tác dụng kháng oxy hóa [164], coniferaldehyd có tác dụng kháng oxy hóa [165], kháng viêm [166]. Nhìn chung, thành phần hóa học từ hạt chuối cô đơn cũng như những tác dụng của chúng theo hướng hạ glucose huyết vẫn chưa đầy đủ và rõ ràng nên việc nghiên cứu về thành phần hóa học của hạt chuối cô đơn và các tác dụng sinh học của chúng là cần thiết.

4.1.3. Tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận trong tình trạng tăng glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

Ở bệnh nhân ĐTĐ, nồng độ glucose huyết cao và kéo dài dẫn đến thúc đẩy tình trạng stress oxy hóa tổng thể, hậu quả là sự tiến triển của các biến chứng [167]. Tổn thương gan và biến chứng thận là những mối quan tâm ở bệnh nhân ĐTĐ vì gan và thận đảm nhiệm những chức năng quan trọng của cơ thể bao gồm chuyển hóa và thải trừ. Sự tồn tại của các gốc tự do gây tổn thương nghiêm trọng màng tế bào, ảnh hưởng đến các thành phần của tế bào dẫn đến giảm chức năng gan và thận, hậu quả là có thể hình thành các bệnh mãn tính. Giảm chức năng gan và thận do STZ và/hoặc tăng glucose huyết đã được báo cáo, STZ có thể gây tổn thương gan và thận trực tiếp thông qua chất vận chuyển glucose hoặc gián tiếp do mất kiểm soát tăng glucose huyết và sự tích tụ của AGE [123],[124]; do đó, nghiên cứu này cũng tiến hành đánh giá tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết do STZ.

4.1.3.1. Tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol

Sự tồn tại của các gốc tự do dẫn đến tổn thương gan và sự phát triển của các bệnh về gan có liên quan đến tổn thương màng tế bào gan, kích hoạt các phản ứng viêm ở gan, apoptosis các tế bào gan và tạo điều kiện cho sự hình thành các mô xơ [168]. Để đánh giá được mức độ cải thiện tổn thương gan ở những con chuột bị tăng glucose huyết được và không được điều trị với cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn, một số chỉ tiêu đã được khảo sát bao gồm AST, ALT,

ALP và GGT trong máu (chỉ số chức năng gan), MDA và GSH (chỉ dấu stress oxy hóa), IL-6 và TNF- α (chỉ dấu viêm) trong mô gan và mô học gan.

Kết quả nghiên cứu cho thấy lô chuột tăng glucose huyết không được điều trị có biểu hiện giảm chức năng gan do tăng đáng kể nồng độ AST, ALT và GGT, tăng nhẹ nồng độ ALP trong huyết thanh. Sự gia tăng nồng độ AST, ALT và GGT có thể là hậu quả của tổn thương gan, dẫn đến sự gia tăng tính thấm của màng sinh chất và giải phóng các enzym này vào máu. Hơn nữa, nồng độ ALP huyết thanh tăng nhẹ có thể là do sự bài tiết ở gan bị khiếm khuyết, phản ánh cả tổn thương hệ thống gan mật và tế bào gan [169]. Hàm lượng MDA tăng và GSH giảm cũng được ghi nhận ở lô chuột này cho thấy có sự tổn thương stress oxy hóa tế bào. Kết quả quan sát đại thể cho thấy gan ở lô bệnh lý không có dấu hiệu bất thường về màu sắc gan nhưng nhìn chung gan có kích thước nhỏ, trọng lượng giảm so với lô sinh lý (**Phụ lục 22**). Về mặt cấu trúc mô học, các hiện tượng hoại tử, viêm và thoái hóa tế bào gan được ghi nhận ở lô chuột này. Sự hoại tử và tổn thương tế bào gan do stress oxy hóa và viêm dẫn đến sự giải phóng các enzym gan từ tế bào gan vào máu. Những kết quả trong nghiên cứu này phù hợp với công bố trước đây trên mô hình chuột ĐTĐ do STZ [170],[171],[172]. Tuy nhiên, nồng độ các cytokin gây viêm ở lô bệnh lý không có sự thay đổi đáng kể (tăng nhẹ) so với lô sinh lý. Điều này có thể do đáp ứng của chuột nhắt trắng chủng Swiss khác với chuột cống trắng chủng Wistar.

Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng cải thiện chức năng gan thông qua làm giảm đáng kể nồng độ AST và ALT trong máu, chống stress oxy hóa thông qua giảm hàm lượng MDA và tăng hàm lượng GSH trong gan ở liều phù hợp, đồng thời cải thiện trọng lượng gan và cấu trúc mô học tế bào gan. Những tác dụng này được tạo nên có thể do sự hiện diện của các hợp chất trong cao chiết như polyphenol và flavonoid, đây là những hợp chất có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ gan tốt [173],[174]. Các flavonoid có đặc tính điển hình trong việc loại bỏ các gốc tự do, có thể là do các nhóm hydroxyl chứa các nguyên tử hydro linh động. Về cấu trúc, quá trình hydroxyl hóa ở vị trí 3',4'-O- và 5- của vòng B và A, bên cạnh sự có mặt của nhóm 4-carbonyl trong flavonoid, đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng chống oxy hóa của chúng [175]. Tồn tại các cấu trúc này làm tăng hiệu quả phòng chống stress và tổn thương do oxy hóa bằng cách cung cấp các nguyên tử hydro và/hoặc điện tử cho các gốc tự do, góp phần ổn định màng tế bào. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy coniferaldehyd có tác dụng chống viêm [166] và chống oxy hóa [165], bảo vệ tế bào thông qua con đường NRF2/HO-1 [176],[177]; afzelechin có các hoạt động chống oxy hóa và bảo vệ

tế bào [164],[178]. Điều này cho thấy coniferaldehyd và afzelechin cũng có thể là những hợp chất tiềm năng góp phần vào tác dụng cải thiện tổn thương gan của cao chiết ethanol từ hạt chuỗi cô đơn.

Mặt khác, kết quả của nghiên cứu cho thấy hàm lượng GSH gan tăng ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg tăng nhưng giảm ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg. Tác động này có thể do sự điều hòa các con đường sinh hóa trong tế bào/cơ thể mà chưa được biết hoặc có thể do ảnh hưởng bởi các thành phần trong cao chiết dẫn đến sự điều hòa chống stress oxy hóa của tế bào. Báo cáo trước đây cho thấy nồng độ flavonoid tương đối thấp kích thích phiên mã gen quan trọng cho quá trình tổng hợp GSH trong tế bào nhưng các tác dụng có hại của flavonoid khi tiêu thụ quá mức trên hệ thống tổng hợp chất chống oxy hóa cũng được đề cập [179]. Quá trình flavonoid loại bỏ các gốc tự do thường đòi hỏi phải tạo ra một gốc tự do bên trong hợp chất flavonoid. Ví dụ, quinon được hình thành từ quercetin trong quá trình chống oxy hóa của quercetin, những quinon này có thể tương tác với thiols [180]. Flavonoid có đặc tính chống oxy hóa và cũng có thể tự động oxy hóa. Do đó, các sản phẩm phụ của quá trình oxy hóa tự động này có thể có khả năng tham gia vào các phản ứng và có thể tương tác hoặc làm giảm nồng độ glutathion trong tế bào, như trường hợp của quercetin và myricetin [181],[182]. Đặc biệt là chúng có thể liên kết trực tiếp với GSH thông qua nhóm sulfhydryl hoặc các acid amin như cystein, glutamic acid làm giảm/ảnh hưởng đến sinh tổng hợp GSH [183]. Mặc dù vậy, nguyên tắc nội tiết tố đã gợi ý rằng stress oxy hóa tế bào nhẹ lặp đi lặp lại do flavonoid trong chế độ ăn uống giúp tăng cường hệ thống phòng thủ chống oxy hóa tế bào và về lâu dài sẽ chuyển các hệ thống phòng thủ này sang trạng thái ổn định hơn, giúp ngăn ngừa sự phát triển của bệnh hoặc giảm tác động của quá trình stress oxy hóa khi bệnh xảy ra [184]. Bên cạnh đó, coniferaldehyd là một hợp chất được dự đoán có độc tính trên gan từ kết quả phân tích độc tính *in silico* (**Phụ lục 20**) nên cũng có thể liên quan đến nguyên nhân giảm GSH. Tuy nhiên, cần phải có thêm các nghiên cứu về liều cao chiết, thời gian sử dụng cao chiết cũng như các thành phần nào trong cao chiết tạo nên tác động này để có những khuyến cáo sử dụng phù hợp.

4.1.3.2. Tác dụng cải thiện tổn thương thận của cao chiết ethanol

Bệnh thận ĐTĐ là một trong những biến chứng mạch máu nhỏ rất được quan tâm trên toàn thế giới, dẫn đến bệnh thận giai đoạn cuối [185]. Cơ chế phân tử bệnh thận ĐTĐ rất phức

tập bao gồm các rối loạn quá trình trao đổi chất, rối loạn huyết động cầu thận, viêm và xơ hóa. Sự khởi phát và tiến triển của bệnh được bắt đầu và lan truyền do tăng sự chuyển hóa glucose thông qua 4 con đường chính bao gồm con đường polyol, hexosamin, PKC và AGE. Ngoài ra, tăng protein và AGE trong chế độ ăn uống kết hợp với hệ vi sinh vật đường ruột cũng kích thích sự giải phóng các chất trung gian gây viêm cùng với những thay đổi ngoại di truyền dẫn đến sự tiến triển kéo dài của bệnh ngay cả khi glucose huyết được bình thường hóa do biểu hiện liên tục của các chất trung gian này [186],[187]. Cuối cùng, dẫn đến stress oxy hóa và viêm tế bào, làm trầm trọng dần tình trạng bệnh [188]. Chính vì vậy, ngăn ngừa tiến triển biến chứng thận ĐTĐ được chú ý trong điều trị bệnh ĐTĐ. Tương tự như các đánh giá trên gan, để đánh giá được mức độ cải thiện tổn thương thận, một số chỉ tiêu cũng được khảo sát bao gồm creatinin và BUN trong máu (chỉ số phản ánh chức năng thận), MDA và GSH (chỉ dấu stress oxy hóa), IL-6 và TNF- α (chỉ dấu viêm) trong mô thận và mô học thận.

Nghiên cứu này cho thấy lô chuột tăng glucose huyết không được điều trị có biểu hiện tổn thương cấu trúc mô thận, giảm rõ rệt chức năng thận do tăng nồng độ creatinin và BUN trong huyết thanh. Những kết quả trong nghiên cứu này phù hợp với công bố trước đây trên mô hình chuột ĐTĐ do STZ [170],[189]. Kết quả cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng cải thiện chức năng thận thông qua làm giảm đáng kể nồng độ creatinin và BUN trong huyết thanh. Sự gia tăng stress oxy hóa tế bào thận cũng được ghi nhận ở lô chuột tăng glucose huyết không được điều trị do tăng đáng kể hàm lượng MDA và giảm nhẹ hàm lượng GSH trong mô thận. Một lần nữa, tác động của cao chiết ethanol trên hàm lượng GSH thận tương tự như trên mô gan. Điều này cũng có thể được lý giải như đã đề cập ở trên và cho phép suy luận chắc chắn hơn sự tồn tại của các thành phần trong cao chiết dẫn đến sự điều biến cơ chế stress oxy hóa tế bào và có thể có tồn tại những thành phần tạo nên đáp ứng giảm GSH hoặc làm giảm các thành phần tham gia vào sinh tổng hợp GSH trong tế bào. Những suy luận này nằm ngoài giới hạn các kết quả thu được của luận án; do đó, các nghiên cứu sâu hơn theo hướng này nên được thực hiện trong tương lai để làm sáng tỏ cơ chế chống stress oxy hóa tế bào của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Tương tự với kết quả đánh giá trên gan, nồng độ các cytokin gây viêm ở lô chuột bệnh lý cũng không có sự thay đổi đáng kể (tăng nhẹ) so với lô sinh lý và cao chiết cũng không thể hiện tác dụng làm giảm nồng độ các cytokin này. Cao chiết cũng thể hiện các tác động cải thiện trọng lượng thận (**Phụ lục 22**), làm giảm tế bào viêm và cải thiện cấu trúc của mô thận. Những tác dụng này được tạo nên có thể do sự hiện diện của

các hợp chất trong cao chiết như polyphenol và flavonoid, đây là những hợp chất có tác dụng chống stress oxy hóa, chống viêm và bảo vệ thận tốt [190],[191], cũng như các hợp chất có trong hạt chuối cô đơn bao gồm afzelechin và coniferaldehyd như đã phân tích ở trên.

4.2. Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm

Kết quả nghiên cứu cho thấy bên cạnh tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hạ glucose huyết đáng chú ý. Tuy nhiên, cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của nó vẫn chưa được làm rõ, có thể có liên quan đến tác động kích thích những tế bào β tụy còn lại tiết insulin [192],[193], tái tạo một phần hoặc bảo vệ tế bào tụy, tăng cường tiết insulin từ các tế bào β được bảo vệ của tiểu đảo Langerhans [194], tăng nhạy cảm với insulin tại mô đích dẫn đến tăng cường sử dụng glucose ở ngoại vi [195],[196] hoặc các tác động chưa biết khác [197]. Do đó, chứng minh cơ chế hạ glucose huyết của cao chiết ethanol rất quan trọng và cần thiết để cung cấp những bằng chứng thuyết phục hơn về tác dụng của hạt chuối cô đơn cũng như làm cơ sở cho các nghiên cứu và phát triển sản phẩm trong tương lai.

Mục tiêu chính trong điều trị ĐTĐ là duy trì nồng độ glucose huyết ổn định trong giới hạn cho phép và làm chậm khởi phát, ngăn ngừa tiến triển các biến chứng và giảm mức độ nặng của các biến chứng. Dựa vào cơ chế bệnh sinh, các thuốc dùng trong điều trị ĐTĐ tuýp 2 có thể có các tác động chính như sau:

- Kích thích tế bào β tụy tiết insulin: Có thể kích thích trực tiếp tế bào β tụy tiết insulin, điển hình là nhóm sulfonylurea và nhóm glinid hoặc kích thích gián tiếp thông qua tác dụng incretin bao gồm nhóm đồng vận tại thụ thể GLP-1 và ức chế DPP-4.
- Làm giảm kháng insulin/tăng nhạy cảm với insulin: Nhóm biguanid với điển hình là metformin và nhóm thiazolidinedion (TZD) với điển hình là pioglitazon.
- Làm giảm/chậm sự hấp thu glucid trên đường tiêu hóa: Nhóm ức chế α -glucosidase với điển hình là acarbose, bên cạnh đó còn có pramlintid, là chất tổng hợp của hormon amylin có vai trò đồng tiết cùng với insulin. Vai trò chính của các thuốc này là hạn chế/ngăn ngừa tăng glucose huyết sau bữa ăn.
- Một số tác động khác như tác động lên sự tái hấp thu glucose tại thận thông qua ức chế chất đồng vận chuyển natri-glucose 2 (SGLT2) như cana-, dapa-, empa-gliflozin;

resin gắn acid mật như colessevelam; chất chủ vận trên thụ thể dopamin D2 như bromocriptin.

Trên cơ sở những kết quả đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn, những phân tích và dự đoán cơ chế tác động của cao chiết cùng với điều kiện phòng thí nghiệm, luận án tiếp cận nghiên cứu cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn theo các hướng như sau:

- Tác động làm giảm/chậm hấp thu glucid trên đường tiêu hóa;
- Tác động kích thích tế bào β tụy tiết insulin;
- Tác động bảo vệ tế bào β tụy;
- Tác động làm tăng độ nhạy cảm với insulin/giảm đề kháng insulin.

4.2.1. Tác dụng làm giảm hay chậm hấp thu glucid của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn

Các bằng chứng cho thấy tăng glucose huyết sau ăn có liên quan đến nguyên nhân của các bệnh chuyển hóa mãn tính như ĐTĐ tuýp 2 và yếu tố nguy cơ của bệnh tim mạch. Ngoài ra, nó còn liên quan đến các tình trạng như stress oxy hóa, viêm, sản xuất quá mức AGE,... đều là những yếu tố bất lợi đối với bệnh nhân ĐTĐ [198]. Sự hấp thu glucose ở đường tiêu hóa phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là chức năng tổng thể ở ruột. Ở người, tuyến tụy và tuyến nước bọt tổng hợp α -amylase để thủy phân tinh bột thành oligosaccharid, tiếp theo α -glucosidase phân bố nhiều ở vùng lân cận các vi nhung mao của tế bào biểu mô ruột sẽ thủy phân oligosaccharid thành monosaccharid để dễ dàng hấp thu qua ruột. Do đó, ức chế hoạt động của hai enzym này có thể làm chậm/giảm sự hấp thu glucid qua ruột, góp phần kiểm soát tăng glucose huyết sau ăn. Acarbose là thuốc điển hình có tác dụng theo hướng này, được sử dụng trên lâm sàng trong điều trị ĐTĐ tuýp 2 với các tác động có lợi như không làm tăng insulin huyết, không gây đề kháng insulin, bảo tồn tế bào β , giảm nồng độ triglycerid và giảm các biến chứng của ĐTĐ [199], đặc biệt thuốc này có thể làm giảm 25% tiến triển thành bệnh ĐTĐ [200]. Tuy nhiên, cần lưu ý khi sử dụng thuốc này vì các hạn chế đã được báo cáo như mức độ giảm HbA1c thấp (giảm 0,44% ở liều 25 mg/ngày đến 1% ở liều 300 mg/ngày, liều được phê duyệt dùng tối đa mỗi ngày là 100 mg giảm 0,74% nhưng không có sự khác biệt với nhóm chứng) nhưng có nhiều tác dụng phụ, đặc biệt trên đường tiêu hóa như tiêu chảy, đầy hơi, đau bụng, trướng bụng; gây tăng men gan, viêm gan, một số ghi nhận gây phù, ban đỏ, vàng da, ngứa, mày đay [201]. Do đó, việc nghiên cứu các hoạt chất thay thế khác có tác dụng

ức chế α -amylase và α -glucosidase với hiệu quả cao hơn, ít tác dụng phụ hơn được quan tâm. Nhiều nghiên cứu cho thấy dịch chiết từ thực vật là nguồn cung cấp các chất có tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase [202],[203],[204].

Trong nghiên cứu này và nhiều nghiên cứu trước đây [205],[206],[207] cho thấy acarbose có tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase với giá trị IC_{50} tương đối cao và sự khác biệt về giá trị IC_{50} đối với hai enzym này không lớn. Kết quả của luận án cho thấy giá trị IC_{50} của acarbose đối với α -glucosidase cao hơn khoảng 2 lần so với α -amylase. Nghiên cứu trước đây cho thấy IC_{50} của acarbose đối với hai enzym này chênh lệch khoảng 1,5 lần [205],[206],[207]. Trong khi đó, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng ức chế α -amylase tương đối thấp ($IC_{50} = 222,80 \mu\text{g/ml}$) và ức chế α -glucosidase rất mạnh ($IC_{50} = 1,58 \mu\text{g/ml}$), tốt hơn so với acarbose. Kết quả cho thấy giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol đối với α -glucosidase thấp hơn khoảng 140 lần so với α -amylase. Sự ức chế mạnh α -amylase có thể gây ra sự tích tụ tinh bột khó tiêu trong ruột kết, dẫn đến quá trình lên men đại tràng bất thường và có thể dẫn đến các biểu hiện tác dụng phụ trên đường tiêu hóa tương tự như acarbose [208]. Trong khi đó, sự ức chế nhẹ α -amylase kết hợp với sự ức chế mạnh α -glucosidase của cao chiết ethanol có thể điều chỉnh hiệu quả tăng glucose huyết sau ăn với ít tác dụng phụ hơn.

Kết quả của luận án cũng tương tự với các nghiên cứu trước đây về tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase của cao chiết ethanol 70% hạt *E. glaucum* [8], cao chiết methanol hạt *E. superum* [9], cao chiết aceton hạt *Musa balbisiana* [209]. Đáng chú ý, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trong luận án có tác dụng ức chế α -glucosidase cao hơn so với cao chiết ethanol 70% từ hạt (5,71 $\mu\text{g/ml}$), thịt quả (110,33 $\mu\text{g/ml}$) và vỏ quả (91,23 $\mu\text{g/ml}$) chuối cô đơn thu tại Bình Phước [8], cao chiết methanol hạt *E. superbum* (1,8 $\mu\text{g/ml}$) [9] và cao chiết aceton hạt *M. balbisiana* (100,61 $\mu\text{g/ml}$) trong khi cao chiết hạt chuối cô đơn ức chế α -amylase thấp hơn cao chiết aceton hạt *M. balbisiana* (36,67 $\mu\text{g/ml}$) [209]. Với giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol thu được trong luận án và cao chiết methanol hạt *E. superbum* đối với α -glucosidase cho thấy hạt của chi *Ensete* có thể là một nguồn tiềm năng để nghiên cứu các chất có tác dụng ức chế α -glucosidase.

Các thành phần hóa học trong cao chiết như polyphenol [210], flavonoid [211], saponin [212], tannin [213] có thể góp phần vào tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Chẳng hạn như, nhiều flavonoid cũng đã được chứng minh có tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase [211],[214]. Về mặt cấu trúc hóa học, liên kết đôi giữa các nhóm C2 và C3, OH tại A5 và B3 rất quan trọng cho tác dụng ức chế α -amylase

cho phép flavonoid nằm song song trên vị trí hoạt động xúc tác α -amylase, trong khi các nhóm OH tại B3 và C3 rất quan trọng cho tác dụng ức chế α -glucosidase tạo thuận lợi cho sự tiếp xúc đặc hiệu của vòng B vào vị trí hoạt động của α -glucosidase [210],[211]. Trong nghiên cứu này, afzelechin (một flavan-3-ol nhóm flavonoid) và coniferaldehyd (một phenolic aldehyd) được phân lập từ hạt chuối cô đơn có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt với giá trị IC_{50} thấp hơn acarbose tương ứng khoảng 3 và 12 lần. Điều này cho thấy tác dụng ức chế α -glucosidase của hai hợp chất này tốt hơn acarbose. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự nghiên cứu trước đây cho thấy afzelechin được phân lập từ *Bergenia ligulata* có tác dụng ức chế α -glucosidase với giá trị ID_{50} là 0,13 mM [161]. Tác dụng ức α -glucosidase của coniferaldehyd lần đầu tiên được đánh giá cho thấy tác dụng tiềm năng. Cấu trúc của afzelechin và coniferaldehyd đã được xác định (**Phụ lục 5**) cho thấy chúng tồn tại một số yếu tố cần thiết cho tác dụng ức chế α -glucosidase. Afzelechin có các nhóm OH tại A5, A7, B4 và C3 rất quan trọng cho tác dụng ức chế α -glucosidase, tạo thuận lợi cho sự tiếp xúc vào vị trí hoạt động của α -glucosidase. Nhóm OH tại vị trí số 2 vòng thơm và cấu trúc nhỏ gọn của coniferaldehyd cũng dự đoán sẽ thuận lợi để tiếp xúc với vị trí hoạt động của α -glucosidase [210],[211].

Mặc dù thử nghiệm *in vitro* cho thấy afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng ức chế α -glucosidase nhưng chưa rõ kiểu ức chế enzym này, có thể là cạnh tranh hoặc phi cạnh tranh, có thể tương tác tại trung tâm hoạt động của enzym hoặc ở những vị trí ngoài trung tâm hoạt động. Trong luận án, thử nghiệm mô phỏng phân tử được thực hiện thêm để khám phá về mối quan hệ cấu trúc-tác dụng, kết quả được trình bày ở **Phụ lục 20**. Kết quả cho thấy afzelechin, coniferaldehyd và acarbose đều là những chất ức chế cạnh tranh của α -glucosidase. Kết quả này trên acarbose phù hợp với phân tích động học trước đó [215]. Các thuốc ức chế α -glucosidase được phê duyệt để điều trị bệnh ĐTĐ tuýp 2, bao gồm acarbose, voglibose, miglitol, tất cả đều là chất ức chế cạnh tranh [216]. Những loại thuốc này là các hợp chất bất chước đường và có khả năng tương tác với các enzym liên kết đường khác (sugar-binding enzymes), dẫn đến các tác dụng phụ như rối loạn tiêu hóa [217]. Afzelechin và coniferaldehyd là những hợp chất không chứa đường nên có ít tác dụng phụ hơn. Chúng liên kết với vị trí hoạt động của α -glucosidase nhưng tương tác với các nhóm dư lượng khác nhau so với acarbose, điều này có thể giải thích phần nào hoạt tính của hai hợp chất này

cao hơn acarbose. Phân tích đặc tính ADMET (**Phụ lục 20**) của afzelechin và coniferaldehyd cho thấy chúng nằm trong phạm vi chấp nhận được đối với thuốc đường uống, trong đó afzelechin tốt hơn về khả năng thải trừ và độc tính. Afzelechin cũng không gây ra cảnh báo độc tính trong khi coniferaldehyd gây ra cảnh báo về hai loại độc tính tương tự như acarbose (độc tính trên gan và độc tính miễn dịch). Mặc dù giá trị LD₅₀ dự đoán của afzelechin và coniferaldehyd thấp hơn nhiều so với acarbose nhưng chúng vẫn nằm trong phạm vi có thể chấp nhận được (afzelechin thuộc nhóm 5-độc tính thấp và coniferaldehyd thuộc nhóm 4-độc tính trung bình theo phân loại GHS); so sánh với metformin, cũng là một loại thuốc điều trị ĐTĐ có giá trị LD₅₀ là 1000 mg/kg (thuộc nhóm 4-độc tính trung bình theo phân loại GHS) [218]. Không giống như acarbose, afzelechin và coniferaldehyd có khả năng hấp thu ở đường tiêu hóa cao, tương tự như miglitol [219]; tuy nhiên, chúng cũng có độ thanh thải cao và có thể được đào thải qua thận một cách hiệu quả. Với những đặc tính đã phân tích, afzelechin và coniferaldehyd có thể xem xét để nghiên cứu thêm cho một thuốc ức chế α -glucosidase.

Bên cạnh afzelechin và coniferaldehyd, một số hợp chất phân lập khác từ hạt chuối cô đơn cũng được sàng lọc tác dụng ức chế α -glucosidase cho thấy chúng có tác dụng ức chế α -glucosidase thấp hơn nhiều so với afzelechin và coniferaldehyd (**Phụ lục 3**). Đây cũng là một trong những lý do của việc lựa chọn afzelechin và coniferaldehyd để thực hiện nghiên cứu của luận án. Như vậy, nghiên cứu này đã chứng minh được afzelechin, coniferaldehyd và một số hợp chất góp phần vào tác dụng ức chế α -glucosidase của cao chiết hạt chuối cô đơn.

Sau quá trình thủy phân carbohydrat thành các monosaccharid, tiếp theo chúng được hấp thu qua bờ bàn chải ở ruột. Các báo cáo cũng cho thấy sự hấp thu glucose ở ruột non tăng lên ở bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2 [220]. Do đó, tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột non cô lập từ chuột của cao chiết hạt chuối cô đơn được đánh giá trong nghiên cứu này sử dụng mô hình đoạn ruột lộn ngược. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột tốt, tác động này có thể giải thích tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol, đặc biệt là các kết quả hạ glucose huyết trong thử nghiệm dung nạp glucose đường uống, cao chiết ethanol đã ức chế sự hấp thu glucose qua ruột trong thử nghiệm này. Mặt khác, sự điều chỉnh hấp thu glucose của ruột

thông qua sự biểu hiện của SGLT1 cũng như hoạt động phối hợp của SGLT1 và GLUT2 [221]. Phloridzin là một trong những chất ức chế SGLT đầu tiên được phát hiện có tác dụng ổn định glucose huyết và cải thiện đề kháng insulin [222]. Phloridzin không chỉ ức chế SGLT2 mà còn ức chế cả SGLT1 nên được sử dụng làm chứng dương trong nghiên cứu này. Một số cao chiết dược liệu và hợp chất cũng được chứng minh có tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột thông qua tác động đối với SGLT1 [137],[223]. Tới thời điểm hiện tại, chưa tìm được công bố nào liên quan đến hướng tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột của chi *Ensete*, tác dụng ức chế hấp thu glucose qua ruột của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn được chứng minh trong nghiên cứu này nhưng tác động của cao chiết đối với SGLT1 và GLUT2 cũng như thành phần hóa học tạo nên tác dụng này của cao chiết chưa được biết. Vì vậy, hướng nghiên cứu này có thể được thực hiện trong tương lai để làm rõ cơ chế tác dụng của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Tuy vậy, sự hiện diện của các nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong cao chiết cho phép dự đoán chúng có thể đóng góp vào tác dụng này, chẳng hạn như nhiều polyphenol và flavonoid có tác dụng ức chế SGLT1, SGLT2, GLUT2 và GLUT5 (vận chuyển fructose) [224-227].

4.2.2. Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn

Ở bệnh nhân ĐTD tuýp 2, sự suy giảm chức năng tổng hợp và tiết insulin của tế bào β tụy đã xảy ra nhiều năm trước khi bệnh nhân được chẩn đoán ĐTD và tiến triển theo thời gian, trung bình chức năng của tế bào β tụy của bệnh nhân ĐTD tuýp 2 giảm 5-7% mỗi năm, do đó làm giảm lượng insulin tiết ra để điều hòa glucose huyết. Chính vì vậy, các nhóm thuốc tác động vào sự tiết insulin từ tế bào β tụy đã được nghiên cứu, phát triển và ứng dụng. Bên cạnh bổ sung insulin trực tiếp, các nhóm thuốc kích thích tế bào β tụy tiết insulin bao gồm nhóm sulfonylurea, nhóm glinid và nhóm có tác dụng incretin. Tuy nhiên, một số tác dụng phụ của insulin như hạ glucose huyết, hiện tượng Somogyi (tăng glucose huyết phản ứng), dị ứng insulin, loạn dưỡng mô mỡ, tăng cân và kháng insulin miễn dịch [228]. Một số tác dụng phụ của thuốc nhóm sulfonylurea như hạ glucose huyết, tăng cân, rối loạn tiêu hóa bao gồm đau bụng, buồn nôn và tiêu chảy. Nhóm thuốc này cũng rất thận trọng ở bệnh nhân suy thận, một số thuốc không được khuyến dùng ở bệnh nhân suy thận nặng như glibenclamid và gliclazid [229]. Nhóm có tác dụng incretin có các tác dụng phụ

liên quan đến dị ứng, viêm tụy, buồn nôn và đường tiêu hóa. Vì vậy, việc tìm ra các tác nhân mới có tác dụng cải thiện chức năng tế bào β tụy để tăng tổng hợp và tiết insulin hiệu quả và an toàn hơn là cần thiết.

Trong nghiên cứu này, tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn đã được đánh giá trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập bằng thử nghiệm GSIS. Chúng dương được sử dụng trong thử nghiệm này glimepirid, một thuốc nhóm sulfonylurea có tác dụng kích thích tiết tế bào β tụy tiết insulin độc lập với mức độ glucose theo cơ chế tác động đóng kênh K_{ATP} . Kết quả nghiên cứu cho thấy glimepirid ở nồng độ 10 μ M có tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin ở cả điều kiện glucose bình thường và glucose cao. Điều này phù hợp với các báo cáo lâm sàng cho thấy sulfonylurea có thể gây hạ glucose huyết trên cơ địa bình thường [230],[231]. Dựa trên mức độ ảnh hưởng của cao chiết đến khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo tụy, tác dụng của cao chiết được khảo sát ở nồng độ từ 12,5 đến 100 μ g/ml. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ở các nồng độ khảo sát không thể hiện tác dụng kích thích tiết insulin ở điều kiện glucose bình thường trong khi đó cao chiết ở nồng độ 50 μ g/ml có tác dụng kích thích tiết insulin ở điều kiện nồng độ glucose cao. Kết quả này có thể giải thích cho tác động không ảnh hưởng đến nồng độ glucose huyết trên chuột bình thường (điều kiện glucose huyết bình thường) (**Phụ lục 21**) và tác dụng hạ glucose huyết trong thử nghiệm OGTT (điều kiện glucose huyết cao) trên chuột bình thường (**Bảng 3.1**) của cao chiết ethanol. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ cao chiết lên 100 μ g/ml thì mức độ tiết insulin giảm. Điều này có thể do nhiều nguyên nhân, tế bào β bám chặt và tương tác với các tế bào lân cận khác trong tiểu đảo tụy để điều hòa hoạt động lẫn nhau, chẳng hạn như tế bào α tiết glucagon đối kháng với sự tiết insulin hoặc tế bào δ tiết somatostatin được báo cáo ức chế tiết insulin [232],[233], khi tăng nồng độ cao chiết có thể đã làm tăng nồng độ của những hợp chất nào đó chưa được biết trong cao chiết làm tăng hoạt động của các tế bào này. Tất cả những suy đoán này nằm ngoài nội dung thực nghiệm của luận án nên cần được xem xét nghiên cứu trong tương lai để làm rõ tác động của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Mặt khác, kết quả thử nghiệm này cũng góp phần giải thích xu hướng tác dụng của cao chiết trong thử nghiệm OGTT trên chuột bình thường, khi liều cao chiết tăng có thể làm mức độ tiết insulin giảm dẫn đến khả năng hạ glucose huyết giảm.

Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hạ glucose huyết hiệu quả có thể do cơ chế kích thích tế bào β tụy tiết insulin để đáp ứng với nồng độ glucose cao ở ngoại vi bên cạnh tác động ức chế hấp thu glucose. Những tác động này của cao chiết ethanol có ý nghĩa quan trọng của việc tăng glucose huyết sau ăn vì tăng glucose huyết sau ăn không chỉ phụ thuộc vào mức độ hấp thu glucose mà còn phụ thuộc một phần vào tốc độ tiết insulin sau ăn. Sự tiết insulin từ tế bào β tụy bao gồm hai giai đoạn, giai đoạn đầu tiên nhanh và giai đoạn thứ hai tương đối chậm để đáp ứng với sự gia tăng nhanh nồng độ glucose trong máu. Giai đoạn đầu tiết insulin rất quan trọng để ức chế nhanh chóng và hiệu quả việc sản xuất glucose nội sinh sau bữa ăn. Ở những bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2, giai đoạn đầu tiết insulin bị giảm và khả năng phản ứng của giai đoạn thứ hai bị chậm lại [198].

Đồng thời, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hạ glucose huyết tốt trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ. Do đó, tác dụng kích thích tiết insulin của cao chiết cũng được đánh giá trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập gây tổn thương bằng STZ. STZ gây độc tế bào β tụy, làm suy giảm/rối loạn chức năng tế bào β và kích hoạt quá trình apoptosis tế bào β thông qua trung gian ROS không chỉ trên các mô hình *in vivo* mà cả *in vitro* [234]. STZ ở nồng độ 5 mM ức chế tiết insulin từ các tiểu đảo tụy [148], nồng độ 10-20 mM gây ra apoptosis tế bào β , trong khi ở nồng độ 30 mM gây ra hoại tử tế bào β [235]. Trong nghiên cứu này, STZ ở nồng độ 5 mM được sử dụng để gây ức chế tiết insulin từ các tiểu đảo tụy cô lập từ chuột nhắt trắng. Kết quả nghiên cứu cho thấy STZ nồng độ 5 mM làm giảm rõ lượng insulin được tiết ra từ các tiểu đảo trong khi đó glimepirid nồng độ 10 μ M làm tăng rõ lượng insulin được tiết ra từ các tiểu đảo. Dựa trên kết quả tác động của cao chiết lên sự tiết insulin từ tiểu đảo tụy ở thử nghiệm GSIS, cao chiết ở nồng độ 50 và 100 μ g/ml được đánh giá khả năng cải thiện chức năng tiết insulin của tế bào β từ các tiểu đảo tụy cô lập insulin trên mô hình tiểu đảo tụy gây tổn thương bởi STZ, cho thấy cao chiết cũng thể hiện tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin. Kết quả này cũng một phần cho thấy tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol có thể thông qua cơ chế kích thích tế bào β tụy tiết insulin. Tuy nhiên, đây là những kết quả thu được trên mô hình thử nghiệm *in vitro*, để có những nhận định chính xác hơn, tác động của cao chiết hạt chuối cô đơn trên nồng độ insulin trong máu của chuột cũng được đánh giá trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ. Kết quả nghiên cứu cho thấy STZ liều 170 mg/kg đã làm giảm đáng kể nồng độ insulin huyết trong khi đó cao chiết ethanol ở liều 25 và 50 mg/kg cũng

như glibenclamid liều 5 mg/kg làm tăng nồng độ insulin huyết. Như đã đề cập, rối loạn hay suy giảm chức năng và số lượng tế β tụy dẫn đến giảm sự tổng hợp và tiết insulin. Từ kết quả nồng độ glucose và insulin huyết, chỉ số chức năng chức năng tế bào β (HOMA- β) đã được tính toán cho thấy STZ liều 170 mg/kg làm suy giảm rõ chức năng của tế bào β trong khi đó cao chiết ethanol và glibenclamid có khả năng cải thiện chức năng tế bào β , trong đó cao chiết liều 50 mg/kg thể hiện tác dụng này rõ ràng hơn. Như vậy, tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn thông qua cơ chế kích thích tế bào β tụy tiết insulin.

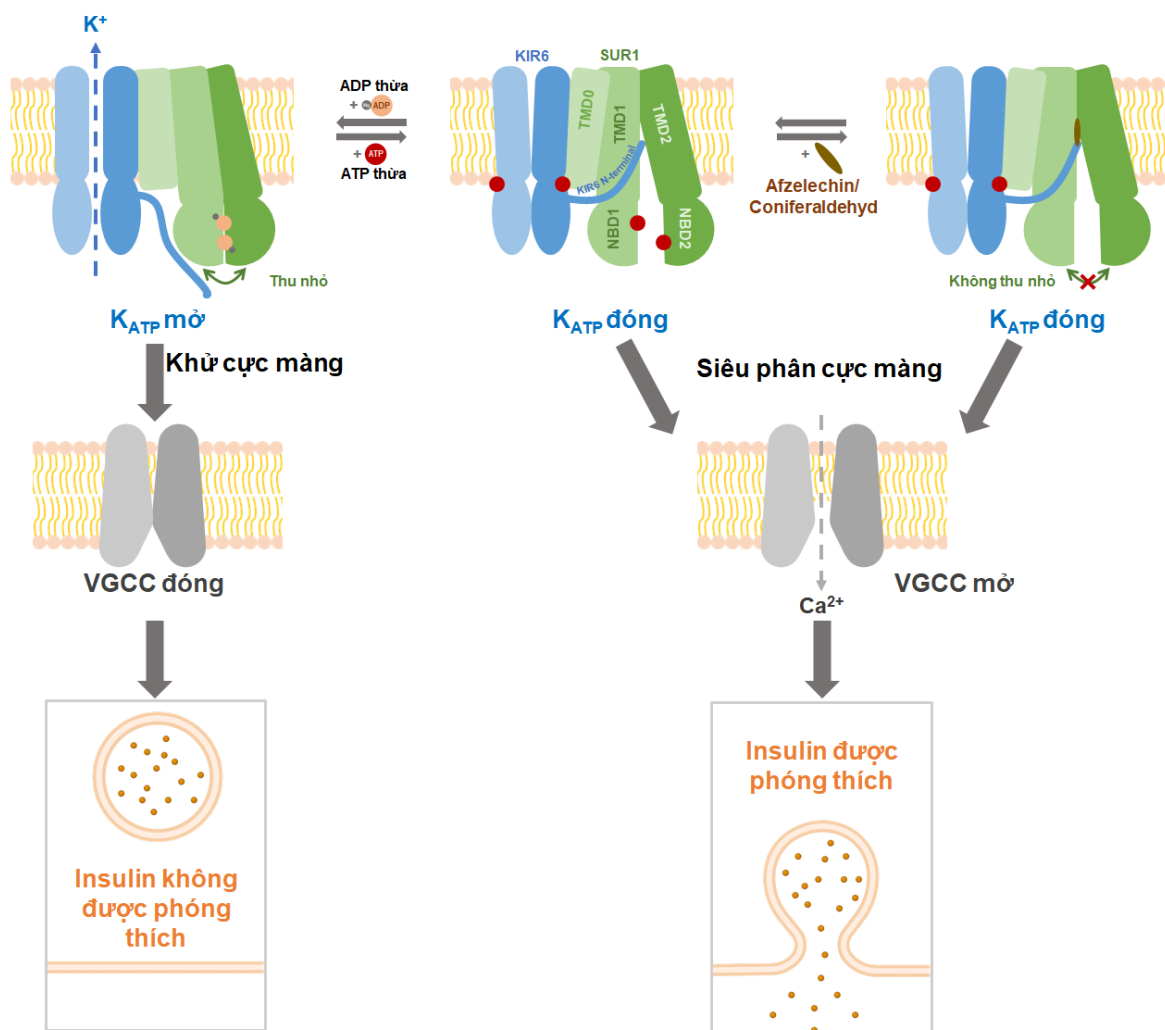
Tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn đã được chứng minh trong nghiên cứu này, một số nhóm hợp chất trong cao chiết như polyphenol [236], flavonoid [237], saponin [238] cho phép dự đoán chúng có thể góp phần vào tác dụng này của cao chiết. Trong nghiên cứu này, dựa trên mức độ ảnh hưởng của các hợp chất đến khả năng sống sót của tế bào tiểu đảo tụy, tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin của hai hợp chất lập từ hạt chuối cô đơn (Afzelechin và coniferaldehyd) được khảo sát ở nồng độ từ 12,5 đến 100 μ M bằng thử nghiệm GSIS. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai hợp chất này đều không thể hiện tác dụng kích thích tiết insulin ở các nồng độ khảo sát trong điều kiện nồng độ glucose bình thường trong khi đó cả hai hợp chất ở nồng độ 100 μ M đều có tác dụng kích thích tiết insulin trong điều kiện nồng độ glucose cao. Điều này cho thấy afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin đáp ứng với nồng độ glucose cao ở ngoại vi. Kết quả này cũng cho thấy hai hợp chất này có thể góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết trong thử nghiệm OGTT trên chuột bình thường vì kiểm soát tăng glucose huyết sau ăn một phần phụ thuộc vào tốc độ tiết insulin sau ăn. Mặt khác, xu hướng tác động của hai hợp chất này khác với cao chiết trong thử nghiệm GSIS, cho thấy afzelechin và coniferaldehyd có thể không phải là những hợp chất gây ra hiện tượng giảm tiết insulin khi tăng nồng độ của cao chiết. Nghiên cứu trước đây cho thấy afzelechin (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) được sinh tổng hợp từ vi khuẩn *Escherichia coli* có tác dụng kích thích tế bào β Min6 tiết insulin trong điều kiện nồng độ glucose cao (25 mM) và không có tác dụng kích thích tiết insulin ở điều kiện nồng độ glucose bình thường (2,5 mM) [162]. Điều này cho thấy có sự tương đồng về tác dụng kích thích tiết insulin do glucose của afzelechin trong hai nghiên cứu, nhưng nồng độ kích thích khác nhau, có thể do nghiên cứu trước đây làm trên tế bào đơn, hợp chất có thể

tiếp xúc và tương tác trực tiếp lên màng tế bào hoặc vào tế bào chỉ thông qua lớp màng tế bào trong khi đó nghiên cứu này sử dụng đảo tụy, là một hệ thống nhiều tế bào, hợp chất phải vượt qua lớp bao đảo tụy để tiếp xúc với tế bào β , đồng thời còn bị ảnh hưởng bởi sự tương tác, điều hòa của các tế bào khác trong đảo tụy nên nồng độ afzelechin thể hiện tác dụng trong nghiên cứu này cao hơn.

Bên cạnh đó, dựa trên kết quả tác động của hai hợp chất này lên sự tiết insulin từ tiểu đảo tụy ở thử nghiệm GSIS, tác dụng kích thích tiết insulin của hai hợp chất này ở nồng độ 50 và 100 μM được đánh giá trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập gây tổn thương bằng STZ. Kết quả cho thấy cả hai hợp chất đều thể hiện tác dụng kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin. Từ những kết quả thu được cho thấy afzelechin và coniferaldehyd là những hợp chất có thể góp một phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn thông qua cơ chế kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin.

Tuy nhiên, sự kích thích tế bào β tụy tiết insulin có thể thông qua nhiều cơ chế khác nhau, chẳng hạn như có thể gắn trực tiếp và gây đóng kênh K_{ATP} hoặc gián tiếp gây đóng kênh K_{ATP} thông qua chất dẫn truyền thần kinh và hormon hoặc điều hòa giảm biểu hiện UCP2 ,... [78],[239]). Trong luận án, thử nghiệm mô phỏng phân tử được tiến hành để khảo sát khả năng gắn của afzelechin và coniferaldehyd vào kênh K_{ATP} (**Phụ lục 20**).

Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy repaglinid và glibenclamid liên kết với rãnh giữa TMD1 và TMD2 của SUR1, ngăn cản quá trình thu nhỏ hai miền liên kết nucleotid (NBD, nucleotide binding domains) của nó và điều chỉnh sự tương tác giữa SUR1 và đầu N của KIR6, dẫn đến ức chế việc mở kênh K_{ATP} . Dư lượng trong SUR1 bao gồm R1246 và R1300 rất cần thiết cho sự tương tác và tác dụng ức chế của repaglinid và glibenclamid với kênh K_{ATP} [240],[241]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy afzelechin, coniferaldehyd và glimepirid cũng liên kết với cùng một rãnh tương tự như repaglinid và glibenclamid. Glimepirid cũng tương tác với R1300, W1297 và L592 tương tự như glibenclamid vì cùng một nhóm thuốc. Kết quả mô phỏng cho thấy glimepirid có ái lực gắn kết cao nhất với K_{ATP} phù hợp với kết quả kích thích tiết insulin trong thử nghiệm *in vitro*. Afzelechin và coniferaldehyd có thể có cơ chế ức chế tương tự hoặc một phần của repaglinid và glibenclamid do sự giống nhau về vị trí gắn kết của chúng. Coniferaldehyd có ái lực ít hơn so với afzelechin; tuy nhiên, coniferaldehyd cũng cho thấy tương tác với R1300, một trong những dư lượng quan trọng. Những kết quả này cũng có thể cho thấy tác dụng tương tự của hai hợp chất trong thử nghiệm *in vitro*.



Hình 4.1. Minh họa cơ chế giải phóng insulin của afzelechin và coniferaldehyd thông qua việc ức chế kênh K_{ATP}

Để đơn giản, một tiểu đơn vị SUR1 và hai tiểu đơn vị KIR6 của K_{ATP} và hai tiểu đơn vị của kênh calci phụ thuộc điện thế (VGCC) được thể hiện. Sự tương tác của ATP và/hoặc afzelechin/coniferaldehyd dẫn đến đóng các K_{ATP} trên màng tế bào, các ion K⁺ không ra ngoài tế bào làm cho bên trong tế bào tích điện dương gây ra sự siêu phân cực màng và các kênh VGCC mở ra, kết quả là sự gia tăng Ca²⁺ tự do trong tế bào giúp các hạt insulin di chuyển đến bề mặt tế bào và kích thích các hạt này giải phóng insulin

Bên cạnh đó, kết quả dự đoán cho thấy afzelechin có khả năng thâm nhập hàng rào máu não kém, điều này không ảnh hưởng đến hiệu quả của nó trong trường hợp này vì kênh K_{ATP} được nhắm mục tiêu nằm trên tế bào β tụy. Từ những kết quả thu được cho thấy afzelechin và

coniferaldehyd là những hợp chất có vai trò trong tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết hạt chuối cô đơn theo cơ chế gắn và gây ức chế mở kênh K_{ATP} . Do đó, cơ chế minh họa tác dụng của afzelechin và coniferaldehyd được trình bày trong **hình 4.1**. Mặc dù vậy, cơ chế này được dự đoán dựa trên phân tích mô phỏng phân tử nên các nghiên cứu thực nghiệm sâu hơn như *in vitro* và *in vivo* cần được thực hiện để có những nhận định chính xác hơn về tác động của những hợp chất này nhằm mục tiêu kênh K_{ATP} .

4.2.3. Tác dụng bảo vệ tế bào β tụy của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn

Mất tế bào β tiểu đảo tụy là đặc điểm sinh lý bệnh ở cả bệnh ĐTĐ tuýp 1 và tuýp 2. Ở bệnh ĐTĐ tuýp 2, độc tính với glucose và độc tính do lipid, đặc biệt sự kết hợp cả hai, làm tăng nhanh quá trình apoptosis tế bào β . Sự suy giảm số lượng và chức năng của tế bào β tụy là nguyên nhân chính làm giảm nồng độ insulin trong máu. Các thuốc được sử dụng trong điều trị ĐTĐ hiện nay có nhiều cơ chế, trong đó có cơ chế kích thích tế bào β tụy tiết insulin, kết quả nghiên cứu của luận án cũng cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn cũng có tác dụng này. Tuy nhiên, nếu một tác nhân chỉ có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin để điều chỉnh nồng độ glucose máu thì dần dần tế bào β sẽ suy yếu và có nguy cơ dẫn đến chết tế bào. Do đó, bảo vệ tế bào β tụy có vai trò quan trọng trong việc điều trị ĐTĐ [242]. Nếu một thuốc vừa có tác dụng kích thích tiết insulin vừa có tác dụng bảo vệ tế bào β tụy thì sẽ có tác dụng điều trị tối ưu hơn. Trong nghiên cứu này, tác dụng bảo vệ tế bào β tụy của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn được nghiên cứu.

4.2.3.1. Tác dụng chống apoptosis tế bào β tụy của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập

Các tế bào ở tiểu đảo tụy đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh glucose huyết ở mức bình thường. Đặc biệt, tế bào β có chức năng sản xuất và tiết insulin để đáp ứng với tăng glucose huyết. Sự thiếu hụt và khiếm khuyết chức năng tế bào β có liên quan mật thiết đến sự phát triển và tiến triển của bệnh ĐTĐ. Sự suy giảm số lượng tế bào β tăng do apoptosis dẫn đến giảm khối lượng tuyến tụy ở bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2, đặc biệt khi tế bào β thích ứng với tình trạng kháng insulin và sự bài tiết insulin của chúng tăng lên, cuối cùng dẫn đến suy kiệt và chết tế bào β [49],[243]. Vì vậy, ngăn quá trình apoptosis và bảo tồn tế bào β là vấn đề cần thiết và chiến lược hợp lý để điều trị và phòng ngừa bệnh ĐTĐ tuýp 2 [244],[49]. Tuy nhiên,

việc khôi phục số lượng tế bào β vẫn là một thách thức trong nghiên cứu điều trị ĐTĐ. Hiện nay, một số thuốc được áp dụng trên lâm sàng cũng có tác dụng này như là liệu pháp có thể bổ sung [245-247]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cũng cho thấy chiết xuất từ thực vật có tác dụng kích thích tiết insulin và bảo vệ tế bào β chống lại apoptosis [130],[248],[249] cho thấy tiềm năng của thực vật trong việc cải thiện chức năng và bảo tồn tế bào β , là những tác động tiềm năng góp phần quan trọng trong điều trị ĐTĐ. Trong luận án, tác dụng chống apoptosis tế bào β tụy *in vitro* và *in vivo* trước tác nhân gây độc STZ được nghiên cứu sử dụng kỹ thuật Western blot với các house-keeping protein bao gồm β -actin, α -tubulin và GAPDH do tính chất sẵn có và chúng cũng đã được áp dụng trên các mô hình chuột gây ĐTĐ bởi STZ [250],[251],[252].

Như đã đề cập ở trên, STZ gây độc tế bào β tụy, không chỉ làm suy giảm chức năng tế bào β mà còn kích hoạt quá trình apoptosis tế bào β [234]. Bằng chứng thực nghiệm cho thấy STZ ở nồng độ 5 mM ức chế tiết insulin từ các tiểu đảo tụy [148], nồng độ 3 mM gây ra apoptosis tế bào β INS-1 và giảm tiết insulin thông qua tăng mức độ của các yếu tố như Bax, caspase-3, p-p38, p-JNK, ROS và MDA, đồng thời giảm Bcl-2, insulin 1, insulin 2 và SOD [131], nồng độ 0,3 mM cũng gây ra hiện tượng apoptosis tế bào β INS-1 và ức chế tiết insulin thông qua việc tăng biểu hiện của NF- κ B, Bax, cleaved caspase-3, p-p38, p-JNK và làm giảm biểu hiện của Bcl-2 và Pdx-1 [248]. Kết quả trên *in vitro* trong nghiên cứu này cho thấy STZ ở nồng độ 5 mM không chỉ làm giảm sự tiết insulin từ tiểu đảo tụy mà còn có xu hướng gây ra hiện tượng apoptosis các tế bào tiểu đảo tụy thông qua việc giảm phần trăm sống sót tế bào, xu hướng làm tăng biểu hiện của các protein như Bax, cleaved caspase-3 và PARP. Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có khả năng bảo vệ các tế bào đảo tụy chống lại độc tính gây chết tế bào của STZ thông qua cải thiện khả năng sống sót của tế bào đảo tụy và xu hướng làm đảo ngược sự biểu hiện của các protein này. Mặt khác, thành phần hóa học góp phần vào tác dụng này của cao chiết sơ bộ được chứng minh. Kết quả cho thấy afzelechin và coniferaldehyd đều thể hiện tác dụng bảo vệ sự sống sót tế bào tiểu đảo tụy trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập gây tổn thương bằng STZ.

Để có những bằng chứng thuyết phục hơn về tác dụng bảo vệ tụy của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn, các nghiên cứu trên *in vivo* cũng được thực hiện. Con đường truyền tín hiệu MAPK (Mitogen-activated protein kinase) điều chỉnh nhiều quá trình sinh học khác nhau thông qua nhiều cơ chế tế bào; trong đó, các tín hiệu p38 MAPK, JNK (c-Jun N-terminal kinase) và ERK (Extracellular signal-regulated kinases) đóng vai trò điều tiết quan trọng sự

tăng sinh, biệt hóa và apoptosis của tế bào [62]. Nhiều bằng chứng cho thấy mối liên quan giữa con đường MAPK với sinh lý bệnh ĐTĐ tuýp 2 và các biến chứng của nó, đặc biệt trong chức năng và sự sống của tế bào β tụy [61],[253],[254]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy STZ có thể kích hoạt quá mức con đường tín hiệu MAPK (đặc biệt tập trung vào p38, ERK và JNK) trong tế bào β chủ yếu thông qua trung gian ROS, dẫn đến những bất lợi cho sự sống sót của tế bào [63, 64]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy STZ liều 170 mg/kg làm tăng đáng kể sự biểu hiện của p-p38 MAPK và ERK1/2, tăng nhẹ sự biểu hiện của JNK1; trong khi đó, cao chiết có xu hướng làm giảm sự biểu hiện của những protein này. Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tiềm năng bảo vệ tụy thông qua xu hướng ngăn chặn con đường tín hiệu MAPK.

Mặt khác, AMPK đóng vai trò là enzym điều hòa trao đổi chất và duy trì cân bằng cân bằng nội môi năng lượng ở sinh vật nhân thực. Mối liên hệ chặt chẽ của tín hiệu AMPK với sự khởi phát và tiến triển của bệnh ĐTĐ đã được chứng minh [255]. Các báo cáo cho thấy tăng sự biểu hiện của AMPK ở tụy sẽ kích hoạt quá trình apoptosis tế bào β , đồng thời giảm sự biểu hiện của AMPK ở tụy có thể bảo vệ các tế bào β thoát khỏi apoptosis [62], [255]. Liên quan đến con đường tín hiệu MAPK, các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng AMPK được kích hoạt có thể gây chết tế bào β tụy bằng cách kích hoạt tín hiệu JNK, một thành viên của họ MAPK, đảm nhận chức năng điều tiết quan trọng trong sự tăng sinh, biệt hóa và apoptosis của tế bào [255]. Trong điều kiện bất lợi, chẳng hạn quá tải ROS trong tế bào, mức độ JNK bị phosphoryl hóa tăng lên và JNK di chuyển đến ty thể. Sự di chuyển này làm thay đổi tính thấm của màng ngoài của ty thể, dẫn đến rối loạn chức năng ty thể và điều hòa bất thường các yếu tố gây chết tế bào sau đó, cuối cùng dẫn đến sự phá hủy tế bào [63]. Những ghi nhận này cũng phù hợp với phát hiện trong luận án, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có xu hướng làm giảm sự biểu hiện của JNK1 và p-AMPK ở mô tụy của chuột bị tăng glucose huyết do STZ, do đó cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có khả năng ngăn chặn quá trình apoptosis tế bào β tụy.

Quá trình tổn thương tụy do STZ gây ra liên quan đến việc huy động nhiều tín hiệu khác nhau bao gồm cả con đường MAPK; trong đó, ty thể là bào quan quan trọng, nơi các tín hiệu này hội tụ và bắt đầu gây ra tổn thương tế bào. Những tín hiệu này có thể trực tiếp làm hỏng ty thể hoặc gián tiếp kích hoạt các protein thuộc họ Bcl-2 sau đó. Họ protein Bcl-2 có thể được phân loại thành protein gây apoptotic và chống apoptotic dựa trên chức năng của chúng. Bax và Bad là các protein gây apoptotic trong khi Bcl-2 hoạt động như một

protein chống apoptotic [256]. Trong tổn thương tụy do STZ gây ra, họ Bcl-2 chủ yếu được tìm thấy ở màng ngoài của ty thể, làm thay đổi sự cân bằng giữa Bcl-2 và Bax để tạo ra các tín hiệu tiền apoptotic [257]. Do đó, mức độ biểu hiện của protein Bcl-2 và Bax ở mô tụy đã được kiểm tra để đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của Bax có xu hướng giảm và Bcl-2 có xu hướng tăng lên sau khi điều trị với cao chiết, điều này dẫn đến xu hướng giảm tỷ lệ Bax so với Bcl-2, cho thấy tiềm năng ngăn chặn apoptosis tế bào. Hơn nữa, trong quá trình apoptosis, cytochrom C, nằm giữa màng trong và ngoài của ty thể, được giải phóng vào tế bào chất, nơi nó liên kết với caspase-9, gây ra phản ứng tăng kích hoạt caspase-3 và cuối cùng dẫn đến apoptosis. Trong nghiên cứu này, sự kích thích do STZ gây ra đã làm tăng rõ sự biểu hiện của cytochrom c và tăng nhẹ cleaved caspase-3, đồng thời việc điều trị bằng cao chiết ethanol làm giảm đáng kể sự biểu hiện của cytochrom c và giảm nhẹ sự biểu hiện của cleaved caspase-3. Ngoài ra, ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy rằng hoạt hóa PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh ĐTĐ và các biến chứng liên quan của nó [258]. Việc kích hoạt PARP bởi ROS được thể hiện rõ thông qua sự tích tụ PAR trên mô hình chuột do STZ gây ra. Ngoài ra, PARP cần thiết cho sự di chuyển của yếu tố gây ra apoptosis từ ty thể đến nhân, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình apoptosis qua trung gian PARP-1, gần đây được cho là có liên quan đến sinh lý bệnh của bệnh ĐTĐ [259]. Tương tự kết quả thu được trên *in vitro*, STZ liều 170 mg/kg cũng làm tăng rõ rệt mức độ biểu hiện của PARP ở mô tụy chuột và cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn làm giảm đáng kể sự biểu hiện của protein này.

4.2.3.2. Tác dụng bảo vệ tế bào trước tổn thương oxy hóa của cao chiết ethanol

Nồng độ glucose huyết cao và kéo dài dẫn đến gia tăng sản xuất ROS trong tế bào, ROS tăng cao dẫn đến stress oxy hóa, là trung tâm của tình trạng suy giảm số lượng và chức năng tế bào β tụy, đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh ĐTĐ. Bình thường cơ thể cũng có cơ chế bảo vệ chống stress oxy hóa, đặc biệt là hệ thống chống oxy hóa nội sinh của tế bào với một số yếu tố như GSH, CAT, SOD,... [244]. Tuy nhiên, đảo tụy có ít enzym chống oxy hóa hơn các vị trí khác, khiến chúng dễ bị tổn thương hơn [260]. Các quan sát lâm sàng cũng cho thấy stress oxy hóa được ghi nhận ở bệnh nhân ĐTĐ. Bỏ

sung các tác nhân có tác dụng bảo vệ tế bào β tụy theo hướng chống stress oxy hóa cũng là một chiến lược trong điều trị ĐTĐ.

Trong nghiên cứu này, tác dụng bảo vệ tụy theo hướng chống oxy hóa của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn được khảo sát trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ. STZ là tác nhân có độc tính cao và chọn lọc đối với tế bào β tụy; khi vào tế bào, STZ không chỉ cung cấp tác nhân gây alkyl hóa DNA mà còn làm tăng sản xuất ROS và NO gây stress oxy tế bào [109]. Bên cạnh đó, nồng độ glucose cao sau khi tiêm STZ cũng góp phần hình thành hydrogen peroxid, tạo ra các gốc tự do có hại như O^{2-} và OH^- , chúng gây peroxid hóa lipid, dẫn đến sản sinh ra các acid béo hydroperoxy và endoperoxid. Do đó, để đánh giá mức độ stress oxy hóa trong các nghiên cứu thực nghiệm, các chỉ dấu stress oxy hóa như MDA và GSH được định lượng. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng MDA tụy tăng rõ và hàm lượng GSH tụy giảm nhẹ ở lô chuột tiêm STZ liều 170 mg/kg không được điều trị; trong khi đó, cao chiết ethanol làm giảm hiệu quả hàm lượng MDA tụy nhưng chưa thể hiện tác dụng làm tăng hàm lượng GSH tụy. Glibenclamid liều 5 mg/kg cũng làm giảm hàm lượng MDA tụy, tăng hàm lượng GSH tụy nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý. Một lần nữa, hiện tượng giảm hàm lượng GSH ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg được phát hiện trên mô tụy, tương tự như trên mô gan và thận. Điều này cũng có thể được giải thích như ở trên, có thể là sự tiêu thụ cao hợp chất chống oxy hóa như flavonoid vì nhiều flavonoid đã được báo cáo có tác dụng chống oxy hóa tốt và có những đóng góp tích cực trong cải thiện bệnh lý ĐTĐ bởi cơ chế chống stress oxy hóa [237]. Tuy nhiên, cần phải có thêm các nghiên cứu sâu hơn để làm rõ tác động này.

4.2.3.3. Tác dụng giảm cytokin gây viêm TNF- α và IL-6 của cao chiết ethanol

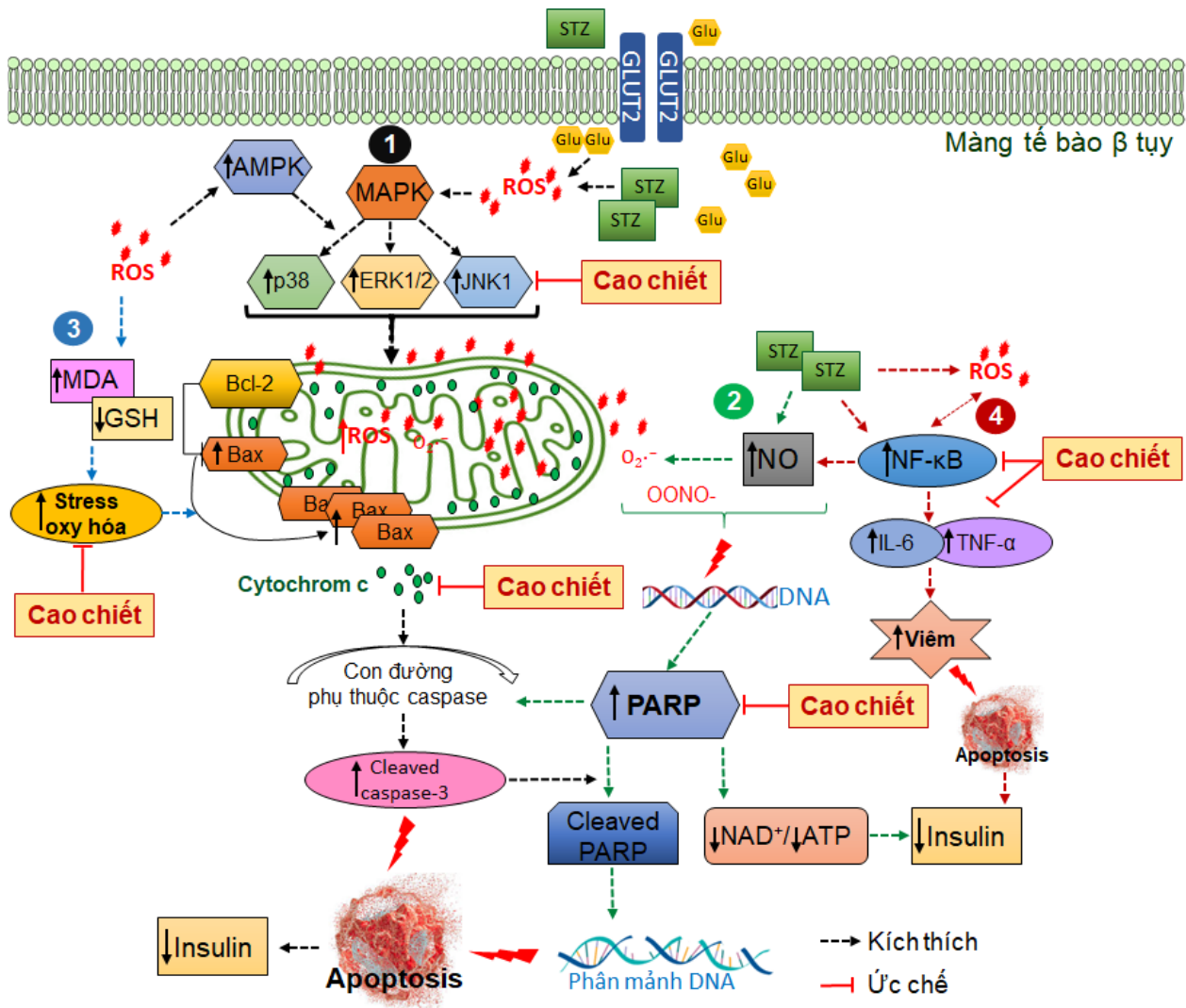
Viêm có vai trò quan trọng và tham gia vào cơ chế bệnh sinh của cả ĐTĐ tuýp 1 và tuýp 2 [261]. Tình trạng viêm cũng được báo cáo ở các bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2 [262]. Viêm đảo tụy dẫn đến giảm cả số lượng và chức năng của tế bào β . Đặc biệt, stress oxy hóa có thể kích thích tình trạng viêm cục bộ và làm thay đổi sự cân bằng giữa số lượng và chức năng tế bào β ở các tiểu đảo Langerhans [263]. Do đó, bổ sung các yếu tố kiểm soát/giảm viêm trong điều trị cũng góp phần cải thiện bệnh ĐTĐ.

Trong nghiên cứu này, tác dụng bảo vệ tụy theo hướng chống viêm của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn được khảo sát trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng

STZ. STZ gây viêm tụy trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua ROS. Các nghiên cứu cho thấy lượng ROS dồi dào có thể kích hoạt NF- κ B, một phức hợp protein có liên quan đáp ứng miễn dịch, viêm và apoptosis của tế bào. Trong điều kiện sinh lý bình thường, dưới xúc tác của ROS, I κ B (chất ức chế NF- κ B) trải qua quá trình phosphoryl hóa và thoái hóa sau đó, dẫn đến kích hoạt NF- κ B. Sự phân hủy của I- κ B cho phép các protein NF- κ B di chuyển đến nhân nơi chúng liên kết với các vị trí gắn DNA tương ứng, từ đó điều hòa sự biểu hiện của nhiều yếu tố khác nhau bao gồm các peptid kháng khuẩn, cytokin (như IL-6 và TNF- α), chemokin, protein phản ứng với stress và protein chống apoptosis [264]. Các nghiên cứu cho thấy các cytokin tiền viêm, đặc biệt là TNF- α và IL-6, đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của bệnh ĐTĐ bằng cách tác động lên các tiểu đảo Langerhans, đặc biệt là các tế bào β tiết insulin. TNF- α và IL-6 góp phần làm tăng thêm rối loạn chức năng và làm chết tế bào β , đồng thời TNF- α cũng làm gián đoạn tín hiệu và độ nhạy insulin [265]. Do đó, kiểm soát các yếu tố này có thể giúp kiểm soát phản ứng viêm. Hơn nữa, đã có báo cáo rằng NF- κ B điều chỉnh họ protein Bcl-2, có một vai trò quan trọng trong quá trình apoptosis tế bào [266]. Kết quả của luận án cho thấy STZ liều 170 mg/kg làm tăng đáng kể biểu hiện NF- κ B p65 cũng như nồng độ IL-6 và TNF- α trong mô tụy; trong khi đó, điều trị với cao chiết ethanol, đặc biệt ở nồng độ 50 mg/kg, làm giảm rõ các tín hiệu này. Như vậy, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng chống viêm có thể góp phần cải thiện chức năng và bảo vệ tế bào β tụy. Tuy nhiên, do điều kiện thực hiện của luận án nên cỡ mẫu thử nghiệm nhỏ nên nâng cỡ mẫu thử nghiệm nên được thực hiện trong tương lai để xác định chắc chắn hơn tác dụng của cao chiết.

Các nhóm hợp chất chuyển hóa thức cấp như polyphenol [44], flavonoid [45], saponin [267] cũng như các dược liệu khác [268],[269] cũng được chứng minh có tác dụng cải thiện tình trạng viêm tụy góp phần trong việc bảo vệ tế bào β tụy chống lại cơ chế apoptosis. Điều này cho thấy thực vật là nguồn nguyên liệu tiềm năng cung cấp các chất có tác dụng chống viêm và bảo vệ tế bào β tụy.

Tổng hợp lại, từ các kết quả nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng bảo vệ tế bào β tụy thông qua cơ chế chống apoptosis. Đây là nghiên cứu đầu tiên chứng minh được cơ chế bảo vệ tế bào β tụy cao chiết hạt chuối cô đơn thông qua điều hòa con đường tín hiệu MAPK, viêm và chống stress oxy hóa, góp phần ngăn chặn quá trình apoptosis tế bào. Cơ chế đề xuất về tác dụng bảo vệ tế bào β tụy được thể hiện trong **Hình 4.2**. Những phát hiện này cho thấy tiềm năng quan trọng của hạt chuối cô đơn như một nguồn nguyên liệu tiềm năng cho nghiên cứu và phát triển liệu pháp điều trị ĐTĐ.



Hình 4.2. Cơ chế đề xuất tác dụng bảo vệ tế bào β tụy do STZ và/hoặc tăng glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

Tóm tắt cơ chế đề xuất: (1) Sự gia tăng ROS bởi STZ và/hoặc glucose huyết dẫn đến kích hoạt các tín hiệu kinase bao gồm các protein họ MAPK (p38, JNK1, ERK1/2) và AMPK, tăng biểu hiện của p38, JNK1 và ERK1/2, đặc biệt là sự chuyển vị của JNK1 đến ty thể làm thay đổi tính thấm của màng ty thể dẫn đến rối loạn chức năng ty thể và kích hoạt các yếu tố gây apoptosis tế bào sau đó. Sự gia tăng biểu hiện của Bax dẫn đến hình thành các lỗ trên màng ty thể, tạo điều kiện cho việc giải phóng cytochrom c từ ty thể vào tế bào chất. Khi cytochrom c tích tụ trong tế bào chất sẽ tạo phức hợp với pro-caspase-9 và Apaf-1 để tạo thành thể “apoptosom”, dẫn đến kích hoạt các tầng tín hiệu caspase, đặc biệt là sự hoạt hóa caspase-3,

cuối cùng dẫn đến apoptosis tế bào. Hơn nữa, sự phân cắt caspase-3 tăng lên sẽ kích thích sự phân cắt PARP dẫn đến phân mảnh DNA và gây chết tế bào. Việc mất một số lượng lớn tế bào β do apoptosis dẫn đến lượng insulin được tổng hợp và bài tiết cũng giảm. Bên cạnh xu hướng tác động làm giảm nhẹ sự biểu hiện của một số tín hiệu như p-AMPK, p-p38, ERK1/2, Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, cao chiết hạt chuỗi cô đơn làm giảm sự biểu hiện của JNK1 và cytochrom c nên có thể ngăn chặn quá trình apoptosis tế bào β tụy. **(2)** STZ xâm nhập vào tế bào β thông qua GLUT2 và sự thoái hóa của nó trong tế bào chất tạo ra các tác nhân alkyl hóa DNA và dẫn đến đứt gãy sợi DNA. Khi DNA bị tổn thương, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) được kích hoạt để tham gia sửa chữa DNA. Tuy nhiên, PARP hoạt động quá mức và kéo dài dẫn đến thiếu hụt NAD^+ và giảm tổng hợp ATP, dẫn đến ức chế tổng hợp và tiết insulin. Đồng thời, tăng biểu hiện cleaved PARP từ PARP cũng dẫn đến phân mảnh DNA và gây chết tế bào β . Hơn nữa, cấu trúc nitrosourea của STZ là nguyên nhân làm tăng sản xuất NO trong tế bào, gây tổn thương DNA dẫn đến PARP hoạt động quá mức để sửa chữa và hậu quả là sự suy giảm tổng hợp, bài tiết insulin và chết tế bào β . Cao chiết hạt chuỗi cô đơn làm giảm đáng kể sự biểu hiện của PARP cho thấy cao chiết có tác dụng ngăn ngừa sự tổn thương DNA. **(3)** Sự gia tăng ROS bởi STZ và/hoặc glucose huyết cũng làm tăng các phản ứng gây tổn thương tế bào tạo ra các sản phẩm thứ cấp (như MDA), suy giảm các chất chống oxy hóa nội sinh (như GSH) trong tế bào dẫn đến tăng stress oxy hóa tế bào, từ đó gây ra sự thay đổi tính thấm màng ty thể và giải phóng các thành phần của ty thể dẫn đến kích hoạt con đường apoptosis tế bào β . Cao chiết hạt chuỗi cô đơn có khả năng chống stress oxy hóa tế bào β thông qua làm giảm hàm lượng MDA. **(4)** Kích hoạt NF- κ B do STZ và ROS làm tăng sản xuất các cytokin gây viêm như IL-6 và TNF- α làm khuếch đại tình trạng viêm, góp phần vào cái chết tế bào β tụy, hậu quả cũng dẫn đến giảm insulin. Bên cạnh đó, tăng biểu hiện của NF- κ B cũng dẫn đến gia tăng sản xuất NO và ROS làm khuếch đại tình trạng stress oxy hóa và rối loạn chức năng ty thể, làm tăng apoptosis tế bào. Cao chiết hạt chuỗi cô đơn làm giảm đáng kể sự biểu hiện NF- κ B, hàm lượng IL-6 và TNF- α , góp phần làm giảm viêm và apoptosis tế bào β tụy. Tổng hợp lại, cao chiết ethanol từ hạt chuỗi cô đơn có tác động trên nhiều tín hiệu khác nhau nên góp phần cải thiện chức năng và bảo vệ tế bào β hiệu quả hơn.

Bằng chứng cho thấy chiết xuất từ thực vật có khả năng kích thích các tế bào β còn lại tự đổi mới, tái tạo tế bào β và các tiểu đảo Langerhans, đặc biệt trong giai đoạn đầu của bệnh [270]. Với tác dụng mang tính tích hợp của cao chiết ethanol từ hạt chuỗi cô đơn như đã phân

tích ở trên có thể dẫn đến những thay đổi đáng kể trong đại thể và vi thể tụy chuột. Cao chiết có khả năng cải thiện trọng lượng và trọng lượng tương đối mô tụy (**Phụ lục 22**) cho thấy tác dụng bảo vệ chống mất mát tế bào tụy của cao chiết. Phân tích mô bệnh học cho thấy sự cải thiện đáng kể về số lượng và kích thước của tiểu đảo Langerhans ở lô chuột tăng glucose huyết do STZ được điều trị với cao chiết, điều này đã góp phần quan trọng trong việc cải thiện nồng độ insulin huyết. Nồng độ insulin huyết tăng là điều kiện quan trọng để giảm nồng độ glucose huyết ở những lô này.

Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác động trên nhiều tín hiệu khác nhau như vậy có thể là do sự tồn tại của nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong cao chiết. Có những hợp chất sẽ tác động theo con đường (tín hiệu) này, cũng có những hợp chất tác động theo con đường (tín hiệu) khác và những con đường (tín hiệu) khác nhau có thể điều hòa qua lại lẫn nhau trong tế bào. Điều này có thể dẫn đến cao chiết có thể hiện tác động trên một số tín hiệu nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nhiều báo cáo cho thấy polyphenol có tác dụng giảm đề kháng insulin, cải thiện chức năng và chống mất tế bào β tụy [271],[272]; flavonoid có tác dụng bảo tồn sự sống và chức năng của tế bào β tụy [237],[251]. Tuy nhiên, hợp chất cụ thể nào trong cao chiết có tác dụng bảo vệ tế bào β tụy chưa được làm rõ; vì vậy, các nghiên cứu về hướng này cần được thực hiện.

4.2.4. Tác dụng làm tăng độ nhạy cảm với insulin của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn

Ở bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2, bên cạnh sự thiếu hụt insulin thì tình trạng đề kháng insulin cũng là một mối quan tâm hàng đầu. Mặc dù insulin được tiết ra nhưng kém nhạy cảm với thụ thể insulin ở tế bào mô đích thì glucose cũng không vào tế bào để thực hiện con đường chuyển hóa, khi đó nồng độ glucose ở ngoại vi vẫn giữ ở mức cao. Bên cạnh đó, kháng insulin cũng gián tiếp dẫn đến suy giảm chức năng tiết insulin của tế bào β vì tế bào β phải tăng tiết insulin để bù trừ hiện tượng kháng insulin và dần dần tế bào β sẽ suy kiệt. Do đó, các thuốc làm tăng nhạy cảm với insulin đóng vai trò quan trọng trong điều trị ĐTĐ. Một số tác động có thể làm tăng nhạy cảm với insulin như hoạt hóa AMPK, hoạt hóa thụ thể PPAR γ , ức chế PTP1B, ức chế PKC, ức chế GSK-3,... [273],[274],[275]. Trong giới hạn của luận án, tác dụng ức chế PTP1B và hoạt hóa AMPK ở gan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn được đánh giá.

4.2.4.1. Tác dụng ức chế PTP1B của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập

PTP1B là một PTP nội bào được định vị trên mạng lưới nội chất. Miền phosphatase của PTP1B hướng tới tế bào chất và được biểu hiện rộng rãi trong các mô của con người như mô mỡ, gan, cơ và não. Nghiên cứu đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá mức của PTP1B có thể cản trở quá trình truyền tín hiệu ở cả gần và xa thụ thể insulin. Khi insulin liên kết với thụ thể insulin, thụ thể này sẽ trải qua quá trình tự phosphoryl hóa, kích hoạt protein kinase. Tuy nhiên, PTP1B tương tác và loại bỏ tyrosin phosphat khỏi thụ thể insulin. Ngoài ra, PTP1B có khả năng khử phosphoryl hóa các protein cơ chất của thụ thể insulin, do đó làm giảm và có khả năng ngăn chặn việc truyền tín hiệu insulin [276]. Trong con đường leptin, PTP1B liên kết và khử phosphoryl hóa thụ thể leptin (LepR) và Janus kinase (JAK2), chất nằm ở hạ lưu của thụ thể làm tăng tổng hợp acid béo, giảm quá trình oxy hóa acid béo [274]. Báo cáo cho thấy rằng những con chuột thiếu gen PTP1B có mức độ nhạy cảm insulin cao hơn và cũng có khả năng chống lại béo phì do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra [277]. Do đó, các chất ức chế PTP1B có thể mang lại lợi ích trong điều trị ĐTĐ tuýp 2, đặc biệt ở bệnh nhân có béo phì và kém nhạy cảm với insulin. Tuy nhiên, cho đến nay, không có loại thuốc ức chế PTP1B nào được sử dụng trong điều trị và chỉ có một số tiền chất đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng nên việc tìm kiếm các chất có tác dụng ức chế PTP1B vẫn đang được quan tâm. Các báo cáo tổng hợp cho thấy nhiều chiết xuất từ thực vật có tác dụng ức chế PTP1B, là một trong những nguồn tiềm năng để sàng lọc và nghiên cứu thuốc ức chế PTP1B [278],[279]. Kết quả cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng ức chế PTP1B cho thấy tiềm năng cải thiện độ nhạy cảm với insulin của cao chiết cũng như việc nghiên cứu các hợp chất trong cao chiết có tác dụng ức chế enzym này. Trong nghiên cứu này, tác dụng ức chế PTP1B của các hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn bao gồm afzelechin và coniferaldehyd cũng được đánh giá, cho thấy cả hai hợp chất đều có tác dụng ức chế PTP1B tốt, tuy nhiên giá trị IC_{50} còn cao hơn so với acid ursolic khoảng 2 lần.

Mặc dù có nhiều hợp chất được chứng minh có tác dụng ức chế PTP1B nhưng chưa có thuốc được ứng dụng trên lâm sàng vì nhiều nguyên nhân như chưa có chất có tính chọn lọc cao đối với PTP1B do vị trí xúc tác được bảo tồn cao giữa các thành viên trong họ PTP; enzym này phân bố rộng rãi trong cơ thể nên khó có chất đạt được hiệu quả nếu sử dụng hệ thống phân phối thuốc thông thường; vì vị trí xúc tác mang điện tích dương cao nên các phối tử mang điện tích âm (ví dụ như các chất có gốc phosphat tích điện âm trong phân tử) có thể ức chế tốt

PTP1B trong các nghiên cứu *in vitro* nhưng chúng có độ xuyên màng thấp nên nghiên cứu tác dụng trên *in vivo* có thể bị giới hạn [86],[87]. Do đó, việc tìm kiếm các chất có khả năng ức chế PTP1B có ít hoặc tốt nhất là không có nhóm phosphat sẽ khắc phục được nhược điểm này. Một trong những hướng tiếp cận hiện nay là nghiên cứu tổng hợp chất mới hoặc khám phá các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế PTP1B có lợi về mặt cấu trúc để thuận lợi vào bên trong tế bào. Trong giới hạn sự hiểu biết, tác dụng ức PTP1B của cao chiết ethanol, afzelechin và coniferaldehyd lần đầu tiên được đánh giá trong nghiên cứu này cho thấy hai hợp chất này có tiềm năng ức chế PTP1B. Mặc dù afzelechin và acid ursolic có khả năng thâm nhập qua hàng rào máu não kém nhưng coniferaldehyd có khả năng thâm nhập qua hàng rào máu não được dự đoán tốt nên cũng có thể được xem là một hợp chất tiềm năng ức chế PTP1B cần được nghiên cứu thêm.

Mặt khác, thử nghiệm *in vitro* cho thấy afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng ức chế PTP1B nhưng chưa rõ chúng gắn vào vị trí nào của enzym để tạo nên các tác động. Trong luận án, thử nghiệm mô phỏng phân tử được thực hiện thêm để khám phá về mối quan hệ cấu trúc-tác dụng, kết quả được trình bày ở **Phụ lục 20**. Kết quả cho thấy afzelechin, coniferaldehyd và acid ursolic đều là những chất ức chế dị lập thể. Các vị trí liên kết được dự đoán của afzelechin và coniferaldehyd chưa được báo cáo trước đây, mặc dù các vị trí của coniferaldehyd gần với vị trí dị lập thể L16 (dư lượng 237 – 243) [280]. Acid ursolic liên kết với L192, F280 và có tương tác kỵ nước với N193, Phe196 và E276, tất cả đều là một phần của vị trí dị lập thể quan trọng được hình thành bởi ba chuỗi xoắn: $\alpha 3$ - $\alpha 6$ - $\alpha 7$; chất ức chế liên kết với vị trí này đã được báo cáo là có tác dụng ổn định PTP1B ở dạng mở, không hoạt động [281]. Điều này có thể giải thích phần nào tác dụng ức chế PTP1B *in vitro* của acid ursolic tốt hơn so với afzelechin và coniferaldehyd.

Các kết quả trong nghiên cứu này được thu từ thử nghiệm *in vitro* và *in silico* nên chưa thể nhận định được cao chiết ethanol, afzelechin và coniferaldehyd có tác dụng ức chế PTP1B nội bào hay trên *in vivo* hay không. Điều này quan trọng vì PTP1B là một protein nội bào, một hợp chất ức chế trực tiếp PTP1B phải vào được tế bào. Bên cạnh đó, PTP1B có hiện diện ở não nên các chất ức chế PTP1B cần được xem xét khả năng qua hàng rào máu não cũng như có hay không gây ra các tác dụng phụ. Những mặt này nằm ngoài giới hạn của nội dung nghiên cứu nên các nghiên cứu trong tương lai nên được xem xét thực hiện.

4.2.4.2. Tác dụng hoạt hóa AMPK ở gan của cao chiết ethanol

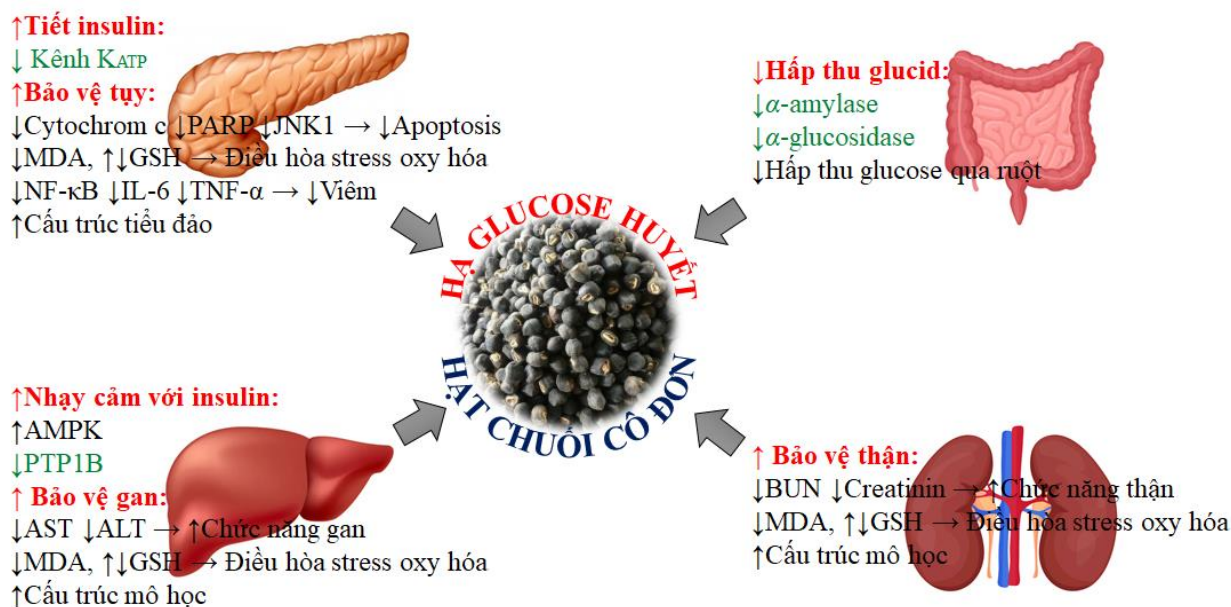
AMPK là một protein kinase, được coi là cảm biến năng lượng nội bào của tế bào, kinase này được kích hoạt khi năng lượng nội bào thấp và điều chỉnh các quá trình của tế bào. Hoạt động AMPK được điều hòa cả về mặt lập thể bởi AMP và thông qua quá trình phosphoryl hóa thuận nghịch ở Thr-172 của tiểu đơn vị α bởi một kinase ngược dòng. Kích hoạt AMPK gây ra sự hấp thu glucose và oxy hóa lipid để tạo ra năng lượng, đồng thời ức chế các quá trình tiêu thụ năng lượng bao gồm sản xuất glucose và lipid để khôi phục cân bằng năng lượng. AMPK kiểm soát cân bằng nội môi glucose toàn cơ thể bằng cách điều chỉnh quá trình trao đổi chất ở nhiều mô ngoại biên gan, cơ xương và mô mỡ [282],[283]. Metformin là thuốc đầu tay cho bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2 có tác dụng hoạt hóa AMPK. Thuốc này có hiệu quả khi dùng đơn trị liệu và kết hợp với các thuốc hạ glucose huyết khác. Tuy nhiên, những trường hợp dung nạp metformin kém hoặc phải sử dụng metformin liều cao có thể gây ra nhiều bất tiện và tác dụng phụ, đặc biệt cần thận trọng với bệnh nhân mắc bệnh thận hoặc gan do tăng nguy cơ nhiễm toan lactic [284]. Hiện nay, hiệu quả của phối hợp giữa metformin và sulfonylurea cũng đã được chứng minh và ứng dụng trên lâm sàng. Phối hợp này vừa có tác dụng giảm đề kháng insulin của metformin vừa có tác dụng kích thích tiết insulin của sulfonylurea [285]. Tuy nhiên, cũng cần thận trọng về tác dụng phụ và chống chỉ định của phối hợp này, đặc biệt là tình trạng hạ glucose huyết quá mức. Do đó, các tác nhân có tác dụng hiệp đồng kích thích tiết insulin và tăng độ nhạy insulin ở tế bào mô đích ngày càng nhận được sự quan tâm nghiên cứu. Trong đó, chiết xuất thực vật là một trong những nguồn quan trọng có thể áp dụng cho phương pháp này do sự tồn tại của nhiều chất chuyển hóa thứ cấp có thể tạo ra tác dụng hiệp đồng [249].

Trong nghiên cứu này, STZ liều 170 mg/kg làm giảm mức độ biểu hiện của p-AMPK ở gan tương tự như đã được công bố trước đây sử dụng STZ liều 150 mg/kg [286]. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn ở cả 2 liều khảo sát đều làm tăng mức độ biểu hiện của p-AMPK ở gan trên mô hình chuột gây bởi STZ. Điều này cho thấy cao chiết ethanol có tác dụng hoạt hóa AMPK ở gan. Tuy nhiên, mức độ tác dụng của cao chiết ở liều 50 mg/kg thấp hơn đáng kể so với cao chiết ở liều 25 mg/kg. Điều này có thể liên quan đến hàm lượng GSH, kết quả cho thấy hàm lượng GSH gan ở lô chuột được điều trị với cao chiết liều 50 mg/kg thấp hơn đáng kể so với lô chuột được điều trị với cao chiết liều 25 mg/kg. Các báo cáo trước đây cho thấy tăng tổng hợp GSH dẫn đến kích hoạt AMPK góp phần giảm đề kháng insulin [287],[288], cao chiết liều 50 mg/kg làm giảm hàm lượng GSH nên mức độ hoạt hoá AMPK cũng giảm ở liều này. Mặt khác, cơ chế chính của glibenclamid là gắn vào và

Tổng hợp lại, cao chiết từ hạt chuối cô đơn có thể là một liệu pháp cho nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ĐTĐ vì cao chiết có các tác dụng bao gồm giảm hấp thu glucid ở ruột, kích thích tế bào β tụy tiết insulin, bảo vệ tế bào β tụy và tăng nhạy cảm với insulin.

4.3. Bàn luận chung về tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

Các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chi *Ensete* nói chung và loài chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman) nói riêng rất ít. Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu một cách có hệ thống tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng hạ glucose trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng streptozotocin. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol có thể thông qua các tác động trên cơ quan chính (tụy) và các cơ quan chuyển hóa (ruột, gan) với các cơ chế chính bao gồm (1) kích thích tế bào β tụy tiết insulin và bảo vệ tụy, (2) giảm hấp thu glucid ở ruột và (3) tăng nhạy cảm với insulin. Bên cạnh đó, cao chiết cũng có các tác dụng cải thiện chức năng gan và thận cũng góp phần chung vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn (**Hình 4.4**).



Hình 4.4. Tổng hợp các cơ chế tác động góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman)

Thông tin bôi xanh lá thể hiện tác dụng dự đoán bằng thử nghiệm *in silico* và/hoặc *in vitro*

Mặt khác, nghiên cứu này cũng bước đầu khám phá được một số hợp chất trong hạt chuối cô đơn đã góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bao gồm afzelechin và coniferaldehyd. Hai hợp chất này có các tác dụng như kích thích tế bào β tụy tiết insulin được dự đoán thông qua khả năng gắn và gây đóng kênh K_{ATP} , bảo vệ tế bào β tụy, giảm/chậm hấp thu glucid thông qua khả năng ức chế α -glucosidase *in vitro* và tăng nhạy cảm với insulin thông qua khả năng ức chế PTP1B *in vitro*.

Tụy là cơ quan chính trong nghiên cứu và điều trị ĐTĐ. Đối với ĐTĐ tuýp 1, liệu pháp insulin là bắt buộc để điều hòa nồng độ glucose huyết bởi tình trạng thiếu tuyệt đối insulin do chết khoảng 90% tế bào β . Tuy nhiên, các thuốc có tác dụng kích thích tế bào β tụy còn lại tiết insulin được sử dụng phổ biến trong điều trị ĐTĐ tuýp 2. Trong nghiên cứu này, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin; trong đó, afzelechin và coniferaldehyd là hai hợp chất trong hạt chuối cô đơn được chứng minh có tác dụng kích thích tiết insulin thông qua cơ chế có thể gắn và gây đóng kênh K_{ATP} , tương tự như cơ chế của nhóm thuốc sulfonylurea và glinid được sử dụng trong điều trị ĐTĐ tuýp 2 hiện nay. Điều này mở ra một triển vọng nghiên cứu và phát triển thuốc có tác dụng hạ glucose huyết từ hạt chuối cô đơn theo cơ chế gắn và gây đóng kênh K_{ATP} làm kích thích tế bào β tụy tiết insulin.

Bên cạnh tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn còn có tác dụng bảo vệ tế bào β tụy. Điều này quan trọng trong điều trị ĐTĐ tuýp 2 vì sự chết tế bào β tụy sẽ tiến triển theo thời gian do tăng glucose huyết và/hoặc kích thích tế bào β tụy tiết insulin. Kết quả cho thấy cao chiết có tác dụng giảm/ngăn chặn apoptosis tế bào β tụy thông qua làm giảm một số tín hiệu có liên quan đến con đường apoptosis tế bào bao gồm Cytochrom c, PARP và JNK1. Cao chiết có tác dụng chống stress oxy hóa thông qua khả năng làm giảm hàm lượng MDA tụy. Cao chiết có tác dụng chống viêm thông qua khả năng làm giảm mức độ biểu hiện của NF- κ B, giảm hàm lượng IL-6 và TNF- α trong mô tụy. Từ đó, góp phần quan trọng vào tác dụng cải thiện mô học tụy, đặc biệt là cấu trúc tiểu đảo tụy. Tổng hợp lại, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn vừa có tác dụng cải thiện chức năng tế bào β vừa có tác dụng bảo vệ tế bào β .

Bên cạnh các thuốc điều trị ĐTĐ tác động vào cơ quan chính là tụy thì các thuốc tác động lên các cơ quan đích của insulin cũng được quan tâm. Nhiều bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2 có tình trạng đề kháng insulin, nếu insulin được tiết ra mà không tương tác và kích hoạt được con đường truyền tin nội bào của insulin thì glucose cũng không vào tế bào được; do đó, các thuốc có tác dụng làm tăng độ nhạy cảm với insulin hay giảm đề kháng insulin được chú ý. Có nhiều

đích tác động có thể làm tăng độ nhạy cảm với insulin, điển hình là AMPK, metformin là thuốc được ưu tiên hàng đầu trong điều trị ĐTĐ tuýp 2 có tác dụng hoạt hóa AMPK. Tuy nhiên, thuốc này không có tác dụng đáng kể lên sự bài tiết insulin nên cũng được sử dụng phối hợp với sulfonylurea. Phối hợp metformin và sulfonylurea mang lại hiệu quả điều trị cho bệnh nhân ĐTĐ tuýp 2, đặc biệt bệnh nhân có tình trạng đề kháng insulin. Trong nghiên cứu này, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn không chỉ có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin mà còn làm tăng độ nhạy cảm với insulin thông qua tác dụng hoạt hóa AMPK ở gan, đồng thời cao chiết cũng có tác dụng ức chế PTP1B *in vitro* cũng có thể góp phần vào tác dụng này. Trong đó, afzelechin và coniferaldehyd là hai hợp chất trong hạt chuối cô đơn được chứng minh có tác dụng ức chế PTP1B *in vitro* có thể góp phần vào tác dụng này của cao chiết.

Chế độ dinh dưỡng rất quan trọng trong điều trị ĐTĐ vì bữa ăn cung cấp một lượng đáng kể glucid có thể chuyển hóa và hấp thu ở đường tiêu hóa dẫn đến tăng glucose huyết sau ăn. Do đó, để kiểm soát glucose huyết sau bữa ăn, các thuốc có tác dụng làm giảm hay chậm hấp thu glucid cũng được sử dụng trong điều trị ĐTĐ tuýp 2, đơn cử là acarbose có tác dụng chính là ức chế α -glucosidase. Trong nghiên cứu này, cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn cho thấy tác dụng ức chế α -amylase và α -glucosidase *in vitro*; trong đó, afzelechin và coniferaldehyd là hai hợp chất trong hạt chuối cô đơn được chứng minh có tác dụng này. Đồng thời, cao chiết cũng ức chế sự hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập từ chuột. Các kết quả này cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn cũng là một đối tượng tiềm năng có khả năng kiểm soát tăng glucose huyết sau bữa ăn.

Trong điều trị ĐTĐ, bên cạnh kiểm soát nồng độ glucose huyết trong giới hạn cho phép thì trì hoãn sự tiến triển của các biến chứng được chú ý, đặc biệt là biến chứng thận mạn. Sự tổn thương các cơ quan trong biến chứng ĐTĐ cũng gây khó khăn trong kiểm soát nồng độ glucose huyết. Cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn không chỉ có những tác dụng chính là làm giảm nồng độ glucose huyết mà còn có tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận do tăng glucose huyết thông qua cải thiện các chỉ số chức năng gan và thận, chống stress oxy hóa và cải thiện cấu trúc mô học.

Liệu pháp phối hợp ngày càng được chú ý trong điều trị ĐTĐ, có thể mang lại lợi ích lâm sàng đáng kể trong khi kiểm soát glucose huyết, cân nặng và huyết áp cũng như giảm thiểu các tổn thương do một số biến chứng và trì hoãn sự tiến triển của các biến chứng ĐTĐ [292]. Cao chiết được liệu là một đối tượng tiềm năng có thể tiếp cận theo hướng này vì sự tồn tại của nhiều hoạt chất trong cao chiết tạo nên các tác dụng phối hợp góp phần làm giảm đáng kể nồng độ glucose huyết.

Mặt khác, afzelechin và coniferaldehyd là hai hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn và được chứng minh có một số tác dụng sinh học *in vitro* như ức chế α -glucosidase, ức chế PTP1B, kích thích tế bào β tiểu đảo tụy tiết insulin và bảo vệ tế bào β tiểu đảo tụy trước độc tính của streptozotocin. Các kết quả này cho thấy afzelechin và coniferaldehyd là những hợp chất có góp phần vào tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn. Đồng thời, nghiên cứu này cũng cho thấy afzelechin và coniferaldehyd là những hoạt chất trong hạt chuối cô đơn do chúng đều là những hợp chất tự nhiên có các hoạt tính sinh học được đánh giá trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, luận án chưa định lượng afzelechin và coniferaldehyd trong hạt chuối cô đơn, chỉ mới phân lập được một số ít hợp chất và chưa xác định hàm lượng của chúng trong hạt chuối cô đơn nên chưa xác định rõ afzelechin và coniferaldehyd có phải là những hợp chất chính của hạt chuối cô đơn hay không. Do đó, các nghiên cứu về thành phần hóa học của hạt chuối cô đơn nên được thực hiện sâu hơn nữa trong tương lai để có những nhận định phù hợp và chính xác hơn.

Mặc dù vậy, nghiên cứu này vẫn còn tồn tại một số hạn chế như sau (1) chưa chứng minh được cơ chế kích thích tế bào β tụy tiết insulin của cao chiết và các hợp chất phân lập bằng thực nghiệm *in vitro* hay *in vivo* cũng như nguyên nhân giảm tiết insulin khi tăng liều cao chiết; (2) chưa làm sáng tỏ hợp chất nào trong cao chiết có tác dụng bảo vệ tụy theo cơ chế chống apoptosis, chống oxy hóa và chống viêm; (3) chưa làm rõ được cơ chế ức chế hấp thu glucose qua ruột, ví dụ như liên quan đến GLUT2 và SGLT1, chưa làm sáng tỏ hợp chất nào trong cao chiết góp phần vào tác dụng này; (4) chưa làm sáng tỏ hợp chất nào trong cao chiết có tác dụng hoạt hóa AMPK ở gan, chưa làm rõ liều cao chiết và các hợp chất phân lập có tác dụng ức chế PTP1B nội bào hay không; (5) chưa làm sáng tỏ hợp chất nào trong cao chiết có tác dụng cải thiện tổn thương gan và cơ chế ở mức phân tử; (6) chưa làm sáng tỏ cơ chế chống stress oxy hóa của cao chiết cũng như thành phần hóa học trong cao chiết; (7) chưa đánh giá được tính an toàn của cao chiết khi sử dụng dài ngày (độc tính bán trường diễn); (8) chưa định lượng được các hợp chất trong cao chiết; (9) cỡ mẫu đánh giá một số chỉ tiêu còn nhỏ như TNF- α , IL-6 và Western blot. Chính vì vậy, các nghiên cứu trong tương lai nên được xem xét thực hiện để giải quyết các hạn chế của luận án.

Về định hướng nghiên cứu ứng dụng, bên cạnh nguồn hạt chuối cô đơn ngoài tự nhiên vẫn đang được khai thác và buôn bán ở dạng thô trên thị trường, kết quả nghiên cứu của đề tài khoa học và công nghệ cấp tỉnh Ninh Thuận do nhóm thực hiện cũng đã nhân giống và xây dựng thành công mô hình 150 m² bảo tồn cây chuối cô đơn và mô hình trồng chuối cô đơn 5000 m² theo hướng làm nguyên liệu cho sản xuất dược liệu với năng suất thu được khoảng 2 kg hạt khô/buồng để đảm bảo trữ lượng nguồn dược liệu hạt chuối cô đơn cho định hướng phát

triển các sản phẩm. Đồng thời, kết hợp với các kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn là đối tượng được lựa chọn để nghiên cứu ứng dụng theo hướng phát triển sản phẩm có tác dụng hỗ trợ và ổn định glucose huyết, hỗ trợ và ngăn ngừa biến chứng của đái tháo đường. Trong nghiên cứu này, cao chiết liều 25 và 50 mg/kg đều có tác dụng theo hướng hỗ trợ điều trị đái tháo đường. Xét tổng thể các chỉ tiêu nghiên cứu, cao chiết liều 50 mg/kg có thể được lựa chọn như liều có tác dụng tiềm năng.

4.4. Đóng góp mới của luận án

Trong luận án này, lần đầu tiên tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman) được nghiên cứu và chứng minh, cung cấp bằng chứng khoa học cho việc sử dụng cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trong điều trị đái tháo đường:

- Công bố đầu tiên về tác dụng hạ glucose huyết và tăng khả năng dung nạp glucose của cao chiết (12,5, 25 và 50 mg/kg) trên mô hình động vật.
- Trên sự hấp thu glucid: Cao chiết có tác dụng làm giảm hay chậm hấp thu glucid có thể thông qua các cơ chế bao gồm ức chế α -amylase ($IC_{50} = 222,80 \mu\text{g/ml}$), ức chế α -glucosidase ($IC_{50} = 1,58 \mu\text{g/ml}$) và ức chế hấp thu glucose qua ruột (2,5 và 5 mg/ml). Hợp chất afzelechin ($IC_{50} = 184,63 \mu\text{M}$) và coniferaldehyd ($IC_{50} = 52,84 \mu\text{M}$) được phân lập từ hạt chuối cô đơn có tác dụng ức chế α -glucosidase.
- Trên sự tiết insulin và tế bào β : Cao chiết (50 mg/kg trên *in vivo*, 100 $\mu\text{g/ml}$ trên *in vitro*) có tác dụng kích thích tế bào β tụy tiết insulin và bảo vệ tế bào β tụy thông qua cơ chế chống stress oxy hóa, chống viêm và chống apoptosis. Hợp chất afzelechin (100 μM) và coniferaldehyd (100 μM) được phân lập từ hạt chuối cô đơn có tác dụng bảo vệ sự sống sót của tế bào đảo tụy và kích thích tế bào β tụy tiết insulin theo cơ chế được dự đoán là gắn và làm đóng kênh kali nhạy cảm ATP (K_{ATP}).
- Trên độ nhạy với insulin: Cao chiết có tác dụng làm tăng độ nhạy cảm với insulin thông qua cơ chế hoạt hóa AMPK ở gan (25 và 50 mg/kg) và có thể là sự ức chế PTP1B. Hợp chất afzelechin ($IC_{50} = 7,58 \mu\text{M}$) và coniferaldehyd ($IC_{50} = 8,39 \mu\text{M}$) được phân lập từ hạt chuối cô đơn có tác dụng ức chế PTP1B.
- Trên chức năng gan và thận: Cao chiết (50 mg/kg) có tác dụng cải thiện chức năng và tổn thương gan và thận thông qua tác động cải thiện tình trạng peroxy hóa lipid màng tế bào và cấu trúc mô bệnh học.

KẾT LUẬN

L luận án này đã thực hiện nghiên cứu tác dụng dược lý theo hướng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm. Từ các kết quả thu được, một số kết luận được đưa ra như sau:

Tác dụng hạ glucose huyết và các tác dụng liên quan của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình gây tăng glucose huyết thực nghiệm:

Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết: Cao chiết liều 12,5 và 25 mg/kg có tác dụng hạ glucose huyết trong nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên chuột bình thường. Cao chiết liều 12,5, 25 và 50 mg/kg có tác dụng hạ glucose huyết trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ liều 170 mg/kg. Cao chiết liều 25 và 50 mg/kg có tác dụng hạ glucose huyết trong nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ liều 170 mg/kg.

Tác dụng cải thiện tổn thương gan và thận của cao chiết: Cao chiết liều 50 mg/kg có tác dụng cải thiện chức năng gan và thận thông qua giảm nồng độ AST, ALT, creatinin và BUN huyết thanh, giảm hàm lượng MDA trong mô gan, thận và cải thiện cấu trúc mô gan và thận. Cao chiết liều 25 mg/kg có tác dụng làm tăng hàm lượng GSH trong mô gan.

Cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol và một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn trên các mô hình thực nghiệm:

Các cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết bao gồm: **(1)** Làm giảm/chậm hấp thu glucid bởi tác dụng ức chế α -amylase với IC_{50} là 222,80 μ g/ml, ức chế α -glucosidase với IC_{50} là 1,58 μ g/ml và ức chế hấp thu glucose qua đoạn ruột non cô lập ở nồng độ 2,5 và 5 mg/ml; **(2)** Kích thích tế bào β tụy tiết insulin ở nồng độ 50 hoặc 100 μ g/ml trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập và ở liều 25 và 50 mg/kg trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bằng STZ liều 170 mg/kg; **(3)** Bảo vệ tế bào tiểu đảo tụy ở nồng độ 100 μ g/ml có thể thông qua cơ chế chống apoptosis trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập gây tổn thương bởi STZ; bảo vệ tế bào tụy ở liều 50 mg/kg thông qua cơ chế chống peroxy hóa lipid màng tế bào, chống viêm và chống apoptosis trên mô hình chuột gây tổn thương bởi STZ; **(4)** Làm tăng độ nhạy

cảm với insulin thông qua cơ chế hoạt hóa AMPK gan ở liều 25 và 50 mg/kg trên mô hình chuột gây tổn thương bởi STZ và có thể là cơ chế ức chế PTP1B.

Các cơ chế tác dụng hạ glucose huyết một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn: Afzelechin và coniferaldehyd có các tác dụng góp phần vào cơ chế hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bao gồm: **(1)** Làm giảm/chậm hấp thu glucid bởi tác dụng ức chế α -glucosidase với IC_{50} tương ứng là 184,63 và 52,84 μ M; **(2)** Kích thích tế bào β tụy tiết insulin ở nồng độ 100 μ M trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập với cơ chế được dự đoán là gắn và làm đóng kênh kali nhạy cảm ATP (K_{ATP}); **(3)** Bảo vệ tế bào β tụy ở nồng độ 100 μ M trên mô hình tiểu đảo tụy cô lập gây tổn thương bởi STZ; **(4)** Làm tăng độ nhạy với insulin bởi tác dụng ức chế PTP1B với IC_{50} tương ứng là 7,58 và 8,39 μ M.

KIẾN NGHỊ

Thông qua các kết quả nghiên cứu đạt được, một số kiến nghị được đưa ra như sau:

- Nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của afzelechin và coniferaldehyd trên mô hình chuột tăng glucose huyết.
- Nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình chuột ĐTD tuýp 2 kèm béo phì/đề kháng insulin.
- Khảo sát tính an toàn của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn thông qua thử nghiệm độc tính bán trường diễn.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIỀN SĨ DƯỢC HỌC

1. **Ly Hai Trieu**, Le Van Minh, Nguyen Thi Thu Huong (2023). Postprandial glyceimic regulating effect of *Ensete glaucum* seed extract. *Journal of Medicinal Materials*, 28(6), 371-378.
2. **Hai Trieu Ly**, Khuong Duy Pham, Phung Hien Le, Thi Hong Tuoi Do, Thi Thu Huong Nguyen, Van Minh Le (2024). Pharmacological properties of *Ensete glaucum* seed extract: Novel insights for antidiabetic effects via modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis and MAPK signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 320, 117427.
3. **Ly Hai Trieu**, Nguyen Thi Thu Huong, Le Van Minh (2024). Involvement of pancreatic islet protection and AMPK activation in antihyperglycemic activity of *Ensete glaucum* seed extract. *Journal of Medicinal Materials*, 29(2), 119-125.
4. **Ly Hai Trieu**, Le Phung Hien, Le Thi Kim Anh, Lam Bich Thao, Nguyen Minh Khoi, Nguyen Thi Thu Huong, Le Van Minh (2024). Stimulation of insulin secretion and inhibition of K_{ATP} channels by afzelechin and coniferaldehyde from *Ensete glaucum* seeds. *Biomedical Research and Therapy*, 11(4), 6363-6378.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Magliano D.J., Boyko E.J. (2021), IDF Diabetes Atlas 0th edition scientific committee. IDF Diabetes Atlas [Internet]. Brussels: International Diabetes Federation; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581934/>.
2. Ahda M., Jaswir I., Khatib A., Ahmed Q.U., Mahfudh N., Ardini Y.D. (2023), "A review on selected herbal plants as alternative anti-diabetes drugs: chemical compositions, mechanisms of action, and clinical study", *International Journal of Food Properties*, 26(1), pp. 1414-1425.
3. Naikawadi V., Devikar S., Shirke H., Naikawadi V., Penna S., Nikam T. (2022), "Wild banana (genus *Ensete*) - An underutilised plant as source of food, fodder, fibre and medicine and need for biotechnological interventions", *Crop and Pasture Science*, 74(11), pp. 925-943.
4. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2007), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Vol. 1, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 462.
5. Laldingliani T.B.C., Thangjam N.M., Zomuanawma R., Bawitlung L., Pal A., Kumar A. (2022), "Ethnomedicinal study of medicinal plants used by Mizo tribes in Champhai district of Mizoram, India", *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 18(1), pp. 22.
6. Le T.K.O., Ly H.T., Le V.M. (2022), "Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman seeds", *Journal of Medicinal Materials*, 27(2), pp. 95-101.
7. Ly H.T., Khuong H.T., Do T.G., Nguyen T.P., Phan T.A.D. (2022), "Extraction and Phytochemical Composition of *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman Fruits in Bu Gia Map National Park, Binh Phuoc Province", *Journal of Technical Education Science*, (70B), pp. 116-120.
8. Nguyen L.N. Vo P.A.T., Vong B.L., Ly H.T., Khuong H.T., Nguyen T.T.H., Le D.T., Pham V.T., Phan T.A.D. (2023), "The first study on the bioactivities of *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman", *The 8th analytica Vietnam Conference, Vietnam National University Press, Hanoi*, pp. 321-328.
9. Habtemariam S., Varghese G.K. (2017), "Antioxidant, anti-alpha-glucosidase and pancreatic beta-cell protective effects of methanolic extract of *Ensete superbum* Cheesm seeds", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), pp. 121-125.
10. Borrell J., Goodwin M., Blomme G., Jacobsen K., Wendawek A., Gashu D., Lulekal E., Asfaw Z., Demissew S., Wilkin P. (2020), "Enset-based agricultural systems in Ethiopia: A systematic review of production trends, agronomy, processing and the wider food security applications of a neglected banana relative", *Plants, People, Planet*, 2(3), pp. 212-228.
11. Kidane S.A., Haukeland S., Meressa B.H., Hvoslef-Eide A.K., Coyne D.L. (2021), "Planting Material of Enset (*Ensete ventricosum*), a Key Food Security Crop in Southwest Ethiopia, Is a Key Element in the Dissemination of Plant-Parasitic Nematode Infection", *Front Plant Sci*, 12, pp. 664155.

12. Joe A., Sreejith P.E., Sabu M. (2016), "Genus *Ensete* (Musaceae) in India", *Telopea Journal of Plant Systematics*, 19, pp. 99-112.
13. Jagtap S., Deokule S.S., Bhosle S.V. (2008), "Ethnomedicobotanical uses of endemic and RET plants utilised by the Korku tribe of Amravati district, Maharashtra", *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 7(2), pp. 284-287.
14. Kumar V S., Nair J., Arunachalam A., Sooraj N.P. (2015), "Ethnobotany and distribution status of *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman in India: A geo-spatial review", *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 1, pp. 54-58.
15. Tabuti J.R.S., Sd S., Lye K. (2003), "Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: Plants, use and administration", *J Ethnopharmacol*, 88, pp. 19-44.
16. Tesfaye A., Alemu A., Melese M. (2016), "Phytochemistry, pharmacology and nutraceutical potential of Enset (*Ensete ventricosum*)", *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 6, pp. 201-207.
17. Bekele E., Shigeta M. (2011), "Phylogenetic relationships between *Ensete* and *Musa* species as revealed by the trnT trnF region of cpDNA", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58, pp. 259-269.
18. Afolayan M., Abubakar S., Adebisi A., Doyinsola I., Adebisi F. (2014), "In vitro antioxidant, antimicrobial and phytochemical properties of wild banana [*Ensete gillettii* (E. A. J. DE Wildman)] seeds extract", *International Journal of Advanced Chemistry*, 2, pp. 59-61.
19. Joga R., Sangma E., Karmakar B., Lyngdoh V., Aochen C. (2020), "Phytochemical investigations on the therapeutic properties of *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman", *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 20, pp. 68-73.
20. Hong D.N.D., Dung N.T., Trang N.T.T., Hai L.V., Tinh P.T.T., Khang M.T., Tuyen P.T.M., Tin C.P.G., Loan H.T. (2023), "Investigation of extraction conditions and evaluation of the ability of antioxidants and lowering blood glucose levels of the *Ensete glaucum* extract", *HCMCOUJS-Engineering and Technology*, 13(2), pp. 24-36.
21. Vasundharan S.K., Raghunathan J., Arunachalam A., Koppala Narayana S.K. (2013), "Investigation into the pharmacognostical and phytochemical features of seeds of *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman: An unexplored medicinal plant of India", *Pharmacognosy Journal*, 5(4), pp. 163-169.
22. Ramasamy N.K. (2018), "Phytochemical Characterization of Bioactive Compound from the *Ensete superbum* Seed Powder", *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6, pp. 635-643.
23. Kachroo M., Agrawal S.S., Arya A. (2009), "Isolation, Characterization and Anti-Fertility Activity of the Active Moiety from the Seeds of *Ensete superbum* Cheesm (Banakadali)", *Journal of Natural Remedies*, 9, pp. 12-20.
24. Sethiya N.K., Shekh M.R., Singh P.K. (2019), "Wild banana [*Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman.]: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological overview", *J Ethnopharmacol*, 233, pp. 218-233.
25. Sethiya N., Brahmhat K., Chauhan B., Mishra s.H. (2016), "Pharmacognostic and phytochemical investigation of *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman pseudostem", *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 7, pp. 51-58.

26. Kumar P., Badgujar S.K., VN N. (2013), "Preliminary screening of different phytochemicals from *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman: a highly medicinal plant of Indian origin", *International Journal of Phytochemistry and Pharmacology*, 3(1), pp. 57-60.
27. Dubiwak A.D., Damtew T.W., Senbetu M.W., Yewhalaw D., Asere T.G., Nemo G., Baye M.F. (2021), "Hepatoprotective Effect of Corm of *Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman Extract against Isoniazid and Rifampicin Induced Hepatotoxicity in Swiss Albino Mice", *J Toxicol*, 2021, pp. 4760455.
28. Birhanu T., Adiko T., Duraisamy R. (2023), "Phytochemical Screening and Multivariate Analysis on Physicochemical and Nutraceutical Value of Kocho from False Banana (Enset)", *Int J Food Sci*, 2023, pp. 6666635.
29. Holscher D., Schneider B. (1998), "Phenylphenalenones from *Ensete ventricosum*", *Oxford Phytochemistry*, 49, pp. 2155-2157.
30. Tanko E., Dauda, B.E.N., Mann, A., Oyeleke, S.B., Fadipe, L. A., Mathew, J.T. (2020), "Phytochemical and Antibacterial Studies of *Ensete gillettii* (E.A.J. De Wildman) Stem Extract and Fractions", *Nigerian Research Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 5(1), pp. 390-398.
31. Sreekutty M.S., Mini S. (2016), "*Ensete superbum* ameliorates renal dysfunction in experimental diabetes mellitus", *Iran J Basic Med Sci*, 19(1), pp. 111-8.
32. Mathew N.S., Negi P.S. (2021), "Phenolic content and anti-oxidative attributes of various parts of wild banana (*Ensete superbum* Roxb. Cheesman) plant", *J Food Biochem*, 45(4), pp. e13657.
33. Sasipriya G., Maria C.L., Siddhuraju P. (2014), "Influence of pressure cooking on antioxidant activity of wild (*Ensete superbum*) and commercial banana (*Musa paradisiaca* var. Monthan) unripe fruit and flower", *J Food Sci Technol*, 51(10), pp. 2517-25.
34. Mathew N.S., Kurrey N.K., Bettadaiah B.K., Negi P.S. (2021), "Anti-proliferative activity of *Ensete superbum* Roxb. Cheesman extract and its active principles on human colorectal cancer cell lines", *J Food Sci*, 86(11), pp. 5026-5040.
35. Mathew N.S., Muthukumar S.P., Bettadaiah B.K., Negi P.S. (2022), "Efficacy of a functional food ingredient from *Ensete superbum* Roxb. Cheesman peel in reducing the severity of ulcerative colitis in a murine model", *Food Funct*, 13(6), pp. 3732-3745.
36. Sethiya N., Brahmabhat K., Chauhan B., Mishra H. (2017), "Anti-urolithiatic activity of *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman (wild banana) pseudostem on ethylene glycol induced urolithiasis in rats", *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 16, pp. 303-309.
37. Diana K.J., George K.V. (2013), "Urinary stone formation: Efficacy of seed extract of *Ensete superbum* (Roxb.) Cheesman on growth inhibition of calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals", *Journal of Crystal Growth*, 363, pp. 164-170.
38. Sarwar A., Arif M., Thakur S.C. (2014), "In vitro study of the contraceptive spermicidal activity of *Ensete superbum* on human sperm", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, pp. 205-207.
39. Kumar A., Gullaiya S., Dubey V., Nagar A., Singh V., Agrawal S.S. (2014), "Contraceptive activity of 4-(4-hydroxy-3-methyl-hex-5-enyl)-chroman-2,7-diol via

- inhibiting ovulation in Gonadotropin-primed immature rat model", *Biomedicine & Aging Pathology*, 4(1), pp. 43-47.
40. Dubiwak A.D., Gerema U., Abdisa D., Tofik E., Reta W. (2022), "Amelioration of Nephrotoxicity in Mice Induced by Antituberculosis Drugs Using *Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman Corm Extract", *Int J Nephrol*, 2022, pp. 6941509.
 41. Forsido S.F., Rupasinghe H.P.V., Astatkie T. (2013), "Antioxidant capacity, total phenolics and nutritional content in selected ethiopian staple food ingredients", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), pp. 915-920.
 42. Golovinskaia O., Wang C.K. (2023), "The hypoglycemic potential of phenolics from functional foods and their mechanisms", *Food Science and Human Wellness*, 12(4), pp. 986-1007.
 43. Sok Yen F., Shu Qin C., Tan Shi Xuan S., Jia Ying P., Yi Le H., Darmarajan T., Gunasekaran B., Salvamani S. (2021), "Hypoglycemic Effects of Plant Flavonoids: A Review", *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, pp. 2057333.
 44. Krawczyk M., Burzynska-Pedziwiatr I., Wozniak L.A., Bukowiecka-Matusiak M. (2023), "Impact of Polyphenols on Inflammatory and Oxidative Stress Factors in Diabetes Mellitus: Nutritional Antioxidants and Their Application in Improving Antidiabetic Therapy", *Biomolecules*, 13(9), pp. 1402.
 45. Shamsudin N.F., Ahmed Q.U., Mahmood S., Shah S.A.A., Sarian M.N., Khattak M., Khatib A., Sabere A.S.M., Yusoff Y.M., Latip J. (2022), "Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and Meta-Analysis", *Int J Mol Sci*, 23(20), pp. 12605.
 46. American Diabetes Association (2022), "Standards of Care in Diabetes-2023 Abridged for Primary Care Providers", *Clin Diabetes*, 41(1), pp. 4-31.
 47. ElSayed N.A., Aleppo G., Aroda V.R., Bannuru R.R., Brown F.M., Bruemmer D., Collins B.S., Hilliard M.E., Isaacs D., Johnson E.L., Kahan S., Khunti K., Leon J., Lyons S.K., Perry M.L., Prahalad P., Pratley R.E., Seley J.J., Stanton R.C., Gabbay R.A., on behalf of the American Diabetes A. (2023), "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023", *Diabetes Care*, 46(Suppl 1), pp. S19-S40.
 48. Clark A., Wells C.A., Buley I.D., Cruickshank J.K., Vanhegan R.I., Matthews D.R., Cooper G.J., Holman R.R., Turner R.C. (1988), "Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes", *Diabetes Res*, 9(4), pp. 151-9.
 49. Ruze R., Liu T., Zou X., Song J., Chen Y., Xu R., Yin X., Xu Q. (2023), "Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, pp. 1161521.
 50. Mambiya M., Shang M., Wang Y., Li Q., Liu S., Yang L., Zhang Q., Zhang K., Liu M., Nie F., Zeng F., Liu W. (2019), "The Play of Genes and Non-genetic Factors on Type 2 Diabetes", *Front Public Health*, 7, pp. 349.
 51. Donath M.Y., Halban P.A. (2004), "Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications", *Diabetologia*, 47(3), pp. 581-589.

52. Singh R., Kaur N., Kishore L., Gupta G.K. (2013), "Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach", *J Ethnopharmacol*, 150(1), pp. 51-70.
53. Figueroa-Romero C., Sadidi M., Feldman E.L. (2008), "Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy", *Rev Endocr Metab Disord*, 9(4), pp. 301-14.
54. Bensellam M., Laybutt D.R., Jonas J.C. (2012), "The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions", *Mol Cell Endocrinol*, 364(1-2), pp. 1-27.
55. Oh Y.S., Bae G.D., Baek D.J., Park E.Y., Jun H.S. (2018), "Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, pp. 384.
56. Lytrivi M., Castell A.L., Poitout V., Cnop M. (2020), "Recent Insights Into Mechanisms of β -Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes", *J Mol Biol*, 432(5), pp. 1514-1534.
57. Moulle V.S., Ghislain J., Poitout V. (2017), "Nutrient regulation of pancreatic beta-cell proliferation", *Biochimie*, 143, pp. 10-17.
58. Cnop M., Welsh N., Jonas J.C., Jörns A., Lenzen S., Eizirik D.L. (2005), "Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities", *Diabetes*, 54 Suppl 2, pp. S97-107.
59. Véret J., Coant N., Berdyshev E.V., Skobeleva A., Therville N., Bailbé D., Gorshkova I., Natarajan V., Portha B., Le Stunff H. (2011), "Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 β -cells", *Biochem J*, 438(1), pp. 177-89.
60. Franco R., Schoneveld O.J., Pappa A., Panayiotidis M.I. (2007), "The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases", *Arch Physiol Biochem*, 113(4-5), pp. 234-58.
61. He X., Gao F., Hou J., Li T., Tan J., Wang C., Liu X., Wang M., Liu H., Chen Y., Yu Z., Yang M. (2021), "Metformin inhibits MAPK signaling and rescues pancreatic aquaporin 7 expression to induce insulin secretion in type 2 diabetes mellitus", *Journal of Biological Chemistry*, 297(2), pp. 101002.
62. Yue J., López J.M. (2020), "Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis", *Int J Mol Sci*, 21(7), pp. 2346.
63. Seki E., Brenner D.A., Karin M. (2012), "A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches", *Gastroenterology*, 143(2), pp. 307-20.
64. Boucher J., Kleinridders A., Kahn C.R. (2014), "Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(1), pp. a009191.
65. Draznin B. (2006), "Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85 α : the two sides of a coin", *Diabetes*, 55(8), pp. 2392-7.
66. Saini V. (2010), "Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus", *World J Diabetes*, 1(3), pp. 68-75.

67. Morino K., Petersen K.F., Shulman G.I. (2006), "Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction", *Diabetes*, 55 Suppl 2(Suppl 2), pp. S9-S15.
68. Guo S. (2014), "Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms", *J Endocrinol*, 220(2), pp. T1-T23.
69. Petersen M.C., Shulman G.I. (2018), "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance", *Physiol Rev*, 98(4), pp. 2133-2223.
70. Kodiha M., Stochaj U. (2011), "Targeting AMPK for Therapeutic Intervention in Type 2 Diabetes, Medical Complications of Type 2 Diabetes", *Front Biosci*, 14(9), pp. 3380-400.
71. Coughlan K.A., Valentine R.J., Ruderman N.B., Saha A.K. (2014), "AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes?", *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7, pp. 241-53.
72. Joshi T., Singh A.K., Haratipour P., Sah A.N., Pandey A.K., Naseri R., Juyal V., Farzaei M.H. (2019), "Targeting AMPK signaling pathway by natural products for treatment of diabetes mellitus and its complications", *J Cell Physiol*, 234(10), pp. 17212-17231.
73. Muoio D.M., Newgard C.B. (2008), "Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), pp. 193-205.
74. Antuna-Puente B., Feve B., Fellahi S., Bastard J.P. (2008), "Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity", *Diabetes Metab*, 34(1), pp. 2-11.
75. Oe H., Ozaki S. (2008), "Hypoglycemic effect of 13-membered ring thiocyclitol, a novel alpha-glucosidase inhibitor from Kothala-himbutu (*Salacia reticulata*)", *Biosci Biotechnol Biochem*, 72(7), pp. 1962-4.
76. Chen L., Tuo B., Dong H. (2016), "Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters", *Nutrients*, 8(1), pp. 43.
77. Merino B., Fernandez-Diaz C.M., Cozar-Castellano I., Perdomo G. (2019), "Intestinal Fructose and Glucose Metabolism in Health and Disease", *Nutrients*, 12(1), pp. 94.
78. Parnis J., Rutter G.A. (2019), Chapter 9 - Contributions of Mitochondrial Dysfunction to β Cell Failure in Diabetes Mellitus, *Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes*, pp. 217-243.
79. ElSayed N.A., Aleppo G., Aroda V.R., Bannuru R.R., Brown F.M., Bruemmer D., Collins B.S., Cusi K., Das S.R., Gibbons C.H., Giurini J.M., Hilliard M.E., Isaacs D., Johnson E.L., Kahan S., Khunti K., Kosiborod M., Leon J., Lyons S.K., Murdock L., Perry M.L., Prahalad P., Pratley R.E., Seley J.J., Stanton R.C., Sun J.K., Woodward C.C., Young-Hyman D., Gabbay R.A., Association o.b.o.t.A.D. (2022), "Summary of Revisions: Standards of Care in Diabetes—2023", *Diabetes Care*, 46(Supplement_1), pp. S5-S9.
80. Tsai Y.Y., Gu Y.S., Jiang Y.D. (2024), "An update of contemporary insulin therapy", *Editorial J Diabetes Investig*, 15(8), pp. 1000-1002.
81. Bailey C.J. (2012), "Diabetes: insulin plus metformin for T2DM--are there benefits?", *Nat Rev Endocrinol*, 8(8), pp. 449-50.
82. Fathima F., Lakshmanan B. (2016), "Thiazolidinediones as a privileged structural scaffold in PPAR agonists: A review", *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, 6, pp. 124-141.

83. Gum R.J., Gaede L.L., Koterski S.L., Heindel M., Clampit J.E., Zinker B.A., Trevillyan J.M., Ulrich R.G., Jirousek M.R., Rondinone C.M. (2003), "Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice", *Diabetes*, 52(1), pp. 21-8.
84. Muthusamy V.S., Saravanababu C., Ramanathan M., Bharathi Raja R., Sudhagar S., Anand S., Lakshmi B.S. (2010), "Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and regulation of insulin signalling markers by caffeoyl derivatives of chicory (*Cichorium intybus*) salad leaves", *Br J Nutr*, 104(6), pp. 813-23.
85. Xue B., Kim Y.B., Lee A., Toschi E., Bonner-Weir S., Kahn C.R., Neel B.G., Kahn B.B. (2007), "Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance", *J Biol Chem*, 282(33), pp. 23829-40.
86. Ala P.J., Gonneville L., Hillman M.C., Becker-Pasha M., Wei M., Reid B.G., Klabe R., Yue E.W., Wayland B., Douty B., Polam P., Wasserman Z., Bower M., Combs A.P., Burn T.C., Hollis G.F., Wynn R. (2006), "Structural basis for inhibition of protein-tyrosine phosphatase 1B by isothiazolidinone heterocyclic phosphonate mimetics", *J Biol Chem*, 281(43), pp. 32784-95.
87. Zhang X., Jiang H., Li W., Wang J., Cheng M. (2017), "Computational Insight into Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition: A Case Study of the Combined Ligand- and Structure-Based Approach", *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2017, pp. 4245613.
88. Cowie M.R., Fisher M. (2020), "SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control", *Nat Rev Cardiol*, 17(12), pp. 761-772.
89. Dirir A.M., Daou M., Yousef A.F., Yousef L.F. (2022), "A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes", *Phytochemistry Reviews*, 21(4), pp. 1049-1079.
90. Mahraoui L., Rodolosse A., Barbat A., Dussaulx E., Zweibaum A., Rousset M., Brot-Laroche E. (1994), "Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption", *Biochem J*, 298(3), pp. 629-33.
91. Jung S.M., Kim S. (2021), "In vitro Models of the Small Intestine for Studying Intestinal Diseases", *Front Microbiol*, 12, pp. 767038.
92. Tretola M., Bee G., Dohme-Meier F., Silacci P. (2023), "Review: Harmonised *in vitro* digestion and the Ussing chamber for investigating the effects of polyphenols on intestinal physiology in monogastrics and ruminants", *Animal*, 17(5), pp. 100785.
93. Wilson T., Wiseman G. (1953), "A method for studying intestinal metabolism and absorption", *The Journal of physiology*, 121(2), pp. 45P.
94. Tomimatsu T., Horie T. (2005), "Enhanced glucose absorption in the rat small intestine following repeated doses of 5-fluorouracil", *Chemico-biological interactions*, 155(3), pp. 129-139.
95. Persaud S.J., Hauge-Evans A.C., Jones P.M. (2014), Chapter 15 - Insulin-Secreting Cell Lines: Potential for Research and Diabetes Therapy, *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, pp. 239-256.

96. Corbin K.L., West H.L., Brodsky S., Whitticar N.B., Koch W.J., Nunemaker C.S. (2021), "A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment Revisited", *Biological Procedures Online*, 23(1), pp. 7.
97. Yudhani R.D., Sari Y., Nugrahaningsih D.A.A., Sholikhah E.N., Rochmanti M., Purba A.K.R., Khotimah H., Nugrahenny D., Mustofa M. (2023), "In Vitro Insulin Resistance Model: A Recent Update", *J Obes*, 2023, pp. 1964732.
98. Wong C.Y., Al-Salami H., Dass C.R. (2020), "C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage", *Journal Pharmacy and Pharmacology*, 72(12), pp. 1667-1693.
99. Zhou M., Konigsberg W.H., Hao C., Pan Y., Sun J., Wang X. (2023), "Bioactivity and mechanisms of flavonoids in decreasing insulin resistance", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), pp. 2199168.
100. Baranowski M.R., Wu J., Han Y.N., Lambert L.J., Cosford N.D.P., Tautz L. (2022), "Protein Tyrosine Phosphatase Biochemical Inhibition Assays", *Bio Protoc*, 12(18), pp. e4510.
101. Kleinert M., Clemmensen C., Hofmann S.M., Moore M.C., Renner S., Woods S.C., Huypens P., Beckers J., de Angelis M.H., Schürmann A., Bakhti M., Klingenspor M., Heiman M., Cherrington A.D., Ristow M., Lickert H., Wolf E., Havel P.J., Müller T.D., Tschöp M.H. (2018), "Animal models of obesity and diabetes mellitus", *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), pp. 140-162.
102. Fang J.Y., Lin C.H., Huang T.H., Chuang S.Y. (2019), "In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity", 11(3), pp. 530.
103. Yagihashi S. (2023), "Contribution of animal models to diabetes research: Its history, significance, and translation to humans", *J Diabetes Investig*, 14(9), pp. 1015-1037.
104. Schlotterer A., Kukudov G., Bozorgmehr F., Hutter H., Du X., Oikonomou D., Ibrahim Y., Pfisterer F., Rabbani N., Thornalley P., Sayed A., Fleming T., Humpert P., Schwenger V., Zeier M., Hamann A., Stern D., Brownlee M., Bierhaus A., Nawroth P., Morcos M. (2009), "C. elegans as model for the study of high glucose-mediated life span reduction", *Diabetes*, 58(11), pp. 2450-6.
105. Miao Y., Chen R., Wang X., Zhang J., Tang W., Zhang Z., Liu Y., Xu Q. (2022), "Drosophila melanogaster diabetes models and its usage in the research of anti-diabetes management with traditional Chinese medicines", *Front Med (Lausanne)*, 9, pp. 953490.
106. van de Venter M., Didloff J., Reddy S., Swanepoel B., Govender S., Dambuza N.S., Williams S., Koekemoer T.C., Venables L. (2020), "Wild-Type Zebrafish (Danio rerio) Larvae as a Vertebrate Model for Diabetes and Comorbidities: A Review", *Animals (Basel)*, 11(1), pp. 54.
107. Adin C.A., Gilor C. (2017), "The Diabetic Dog as a Translational Model for Human Islet Transplantation", *Yale J Biol Med*, 90(3), pp. 509-515.
108. Zou X., Ouyang H., Yu T., Chen X., Pang D., Tang X., Chen C. (2019), "Preparation of a new type 2 diabetic miniature pig model via the CRISPR/Cas9 system", *Cell Death & Disease*, 10(11), pp. 823.

109. Goyal S.N., Reddy N.M., Patil K.R., Nakhate K.T., Ojha S., Patil C.R., Agrawal Y.O. (2016), "Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics", *Chem Biol Interact*, 244, pp. 49-63.
110. Fritz R. (1971), "Mode of action of streptozotocin", *J. Bacteriol*, 105(1971), pp. 580-588.
111. Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi M.R., Jamshidi S., Farhangi A., Verdi A.A., Mofidian S.M.A., Rad B.L. (2007), "Induction of diabetes by Streptozotocin in rats", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2), pp. 60-64.
112. Lenzen S. (2008), "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes", *Diabetologia*, 51(2), pp. 216-226.
113. Arivazhahan A. (2022), Screening Methods for the Evaluation of Antidiabetic Drugs, *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 3 : Experimental Pharmacology : Research Methodology and Biostatistics*, pp. 453-463.
114. Ghasemi A., Khalifi S., Jeddy S. (2014), "Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes", *Acta physiologica Hungarica*, 101, pp. 408-20.
115. Skovsø S. (2014), "Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin", *J Diabetes Investig*, 5(4), pp. 349-358.
116. Wszola M., Klak M., Kosowska A., Tymicki G., Berman A., Adamiok-Ostrowska A., Olkowska-Truchanowicz J., Uhrynowska-Tyszkiewicz I., Kaminski A. (2021), "Streptozotocin-Induced Diabetes in a Mouse Model (BALB/c) Is Not an Effective Model for Research on Transplantation Procedures in the Treatment of Type 1 Diabetes", *Biomedicines*, 9(12), pp. 1790.
117. Ly H.T., Nguyen T.T.H., Tran T.T.L., Lam B.T., Phung T.T.H., Le V.M. (2019), "Hypoglycemic and antioxidant activities of *Clerodendrum inerme* leaf extract on streptozotocin-induced diabetic models in mice", *Chinese Herbal Medicines*, 11(4), pp. 387-393.
118. Ighodaro O.M., Adeosun A.M., Akinloye O.A. (2017), "Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies", *Medicina*, 53(6), pp. 365-374.
119. Hasan M.M., Ahmed Q.U., Mat Soad S.Z., Tunna T.S. (2018), "Animal models and natural products to investigate *in vivo* and *in vitro* antidiabetic activity", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, pp. 833-841.
120. Fajarwati I., Solihin D.D., Wresdiyati T., Batubara I. (2023), "Self-recovery in diabetic *Sprague Dawley* rats induced by intraperitoneal alloxan and streptozotocin", *Heliyon*, 9(5), pp. e15533.
121. Pedro P.F., Tsakmaki A., Bewick G.A. (2020), "The Glucose Tolerance Test in Mice", *Methods Mol Biol*, 2128, pp. 207-216.
122. Tai M.M. (1994), "A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves", *Diabetes Care*, 17(2), pp. 152-4.
123. Oliveira E.S.C., Acho L.D.R., Morales-Gamba R.D., do Rosário A.S., Barcellos J.F.M., Lima E.S., Machado M.B. (2023), "Hypoglycemic effect of the dry leaf extract of *Myrcia multiflora* in streptozotocin-induced diabetic mice", *J Ethnopharmacol*, 307, pp. 116241.

124. Liu Y.H., Lin Y.S., Sie Y.Y., Wang C.C., Chang C.I., Hou W.C. (2023), "Vitisin B, a resveratrol tetramer from *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana*, ameliorates impaired glucose regulations in nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetic mice", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13(5), pp. 479-488.
125. Hammeso W.W., Emiru Y.K., Ayalew Getahun K., Kahaliw W. (2019), "Antidiabetic and Antihyperlipidemic Activities of the Leaf Latex Extract of *Aloe megalacantha* Baker (Aloaceae) in Streptozotocin-Induced Diabetic Model", *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, pp. 8263786.
126. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. (1985), "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man", *Diabetologia*, 28(7), pp. 412-9.
127. Buege J.A., Aust S.D. (1978), [30] Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 52, pp. 302-310.
128. Kielkopf C.L., Bauer W., Urbatsch I.L. (2020), "Bradford Assay for Determining Protein Concentration", *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(4), pp. 102269.
129. Sedlak J., Lindsay R.H. (1968), "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent", *Analytical Biochemistry*, 25, pp. 192-205.
130. Zhang Y., Mei H., Shan W., Shi L., Chang X., Zhu Y., Chen F., Han X. (2016), "Lentinan protects pancreatic β cells from STZ-induced damage", 20(10), pp. 1803-1812.
131. Liu Y., Han J., Zhou Z., Li D. (2019), "Paeoniflorin protects pancreatic β cells from STZ-induced damage through inhibition of the p38 MAPK and JNK signaling pathways", *European Journal of Pharmacology*, 853, pp. 18-24.
132. Applegate K.B., Cheek P.R., Inlow J.K. (2019), "Analysis of kombucha to teach biochemical concepts and techniques to undergraduate students", *Biochem Mol Biol Educ*, 47(4), pp. 459-467.
133. Trieu L.H., Minh L.V., Huong N.T.T. (2018), "In vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of crude and fractionated extracts of *Clerodendrum inerme* leaves collected from Phu Quoc Island", *Journal of Medicinal Materials*, 23(5), pp. 283-289.
134. Lankatillake C., Luo S., Flavel M., Lenon G.B., Gill H., Huynh T., Dias D.A. (2021), "Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays", *Plant Methods*, 17(1), pp. 3.
135. Wilson T.H., Wiseman G. (1954), "Metabolic activity of the small intestine of the rat and golden hamster (*Mesocricetus auratus*)", *J Physiol*, 123(1), pp. 126-30.
136. Mateer S.W., Cardona J., Marks E., Goggin B.J., Hua S., Keely S. (2016), "Ex Vivo Intestinal Sacs to Assess Mucosal Permeability in Models of Gastrointestinal Disease", *J Vis Exp*, (108), pp. e53250.
137. Therasa S.V., Thirumalai T., Tamilselvan N., David E. (2014), "In-vivo and ex-vivo inhibition of intestinal glucose uptake: A scope for antihyperglycemia", *Journal of Acute Disease*, 3(1), pp. 36-40.

138. Saliba Y., Bakhos J.-J., Itani T., Farès N. (2017), "An optimized protocol for purification of functional islets of Langerhans", *Laboratory Investigation*, 97(1), pp. 70-83.
139. Zmuda E.J., Powell C.A., Hai T. (2011), "A method for murine islet isolation and subcapsular kidney transplantation", *J Vis Exp*, (50), pp. 2096.
140. Khiatah B., Qi M., Wu Y., Chen K.T., Perez R., Valiente L., Omori K., Isenberg J.S., Kandeel F., Yee J.K., Al-Abdullah I.H. (2019), "Pancreatic human islets and insulin-producing cells derived from embryonic stem cells are rapidly identified by a newly developed Dithizone", *Sci Rep*, 9(1), pp. 9295.
141. Chandravanshi B., Dhanushkodi A., Bhonde R. (2014), "High Recovery of Functional Islets Stored at Low and Ultralow Temperatures", *Rev Diabet Stud*, 11(3-4), pp. 267-78.
142. Fridlyand L.E., Jacobson D.A., Philipson L.H. (2013), "Ion channels and regulation of insulin secretion in human β -cells: a computational systems analysis", *Islets*, 5(1), pp. 1-15.
143. Banerjee M., Bhonde R.R. (2003), "Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: in vitro studies depicting in vivo differentiation", *JOP*, 4(4), pp. 137-45.
144. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. (2018), "Analysis of Cell Viability by the MTT Assay", *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6), doi: 10.1101/pdb.prot095505.
145. Kuete V., Karaosmanoğlu O., Sivas H. (2017), Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables, *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 2017, pp. 271-297.
146. Al Rijjal D., Wheeler M.B. (2022), "A protocol for studying glucose homeostasis and islet function in mice", *STAR Protoc*, 3(1), pp. 101171.
147. Rahimifard M., Baeri M., Bahadar H., Moini-Nodeh S., Khalid M., Haghi-Aminjan H., Mohammadian H., Abdollahi M. (2020), "Therapeutic Effects of Gallic Acid in Regulating Senescence and Diabetes: An *In Vitro* Study", *Molecules*, 25(24), pp. 5875.
148. Samaddar S., Jha D., Koneri R. (2020), "Optimization of pancreatic islet isolation from rat and evaluation of islet protective potential of a saponin isolated from fruits of *Momordica dioica*", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10, pp. 89-099.
149. Mercan F., Bennett A.M. (2010), "Analysis of protein tyrosine phosphatases and substrates", *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 18, pp. Unit 18.16. doi:10.1002/0471142727.mb1816s91.
150. Yue J., Xu J., Cao J., Zhang X., Zhao Y. (2017), "Cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. and their inhibitory activity against α -glucosidase, α -amylase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)", *Journal of Functional Foods*, 37, pp. 624-631.
151. Janssens S.B., Vandeloock F., De Langhe E., Verstraete B., Smets E., Vandenhouwe I., Swennen R. (2016), "Evolutionary dynamics and biogeography of Musaceae reveal a correlation between the diversification of the banana family and the geological and climatic history of Southeast Asia", *New Phytol*, 210(4), pp. 1453-65.
152. Majumdar K., Sarkar A., Deb D., Majumder J., Datta B. (2013), "Distribution record of *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesm. (Musaceae) in Tripura, Northeast India: a rare wild primitive banana", *Asian Journal of Conservation Biology*, 2, pp. 164-167.

153. Sakaguchi K., Takeda K., Maeda M., Ogawa W., Sato T., Okada S., Ohnishi Y., Nakajima H., Kashiwagi A. (2016), "Glucose area under the curve during oral glucose tolerance test as an index of glucose intolerance", *Diabetol Int*, 7(1), pp. 53-58.
154. Achi N.K., Ohaeri O.C., Ijeh I.I., Eleazu C. (2017), "Modulation of the lipid profile and insulin levels of streptozotocin induced diabetic rats by ethanol extract of *Cnidioscolus aconitifolius* leaves and some fractions: Effect on the oral glucose tolerance of normoglycemic rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, pp. 562-569.
155. Furman B.L. (2015), "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats", *Curr Protoc Pharmacol*, 70, pp. 5.47.1-5.47.20.
156. Arivazhahan A. (2022), Screening Methods for the Evaluation of Antidiabetic Drugs, *In book: Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology*, 2022, pp. 453-463.
157. Kishi K., Kaji N., Kurosawa T., Aikiyo S., Hori M. (2019), "Hyperglycemia in the early stages of type 1 diabetes accelerates gastric emptying through increased networks of interstitial cells of Cajal", *PLoS One*, 14(10), pp. e0222961.
158. Furman B.L. (2021), "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats", *Curr Protoc*, 1(4), pp. e78.
159. Yu X., Tesiram Y.A., Towner R.A., Abbott A., Patterson E., Huang S., Garrett M.W., Chandrasekaran S., Matsuzaki S., Szweda L.I., Gordon B.E., Kem D.C. (2007), "Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI)", *Cardiovasc Diabetol*, 6, pp. 6.
160. Nguyễn Thị Thu Hương, Nguyễn Hoàng Minh, Huỳnh Ngọc Trung Dung (2012), "Tác dụng hạ đường huyết của các cao chiết từ quả ổi", *Tạp chí Dược liệu*, 17(5), pp. 268-275.
161. Saijyo J., Suzuki Y., Okuno Y., Yamaki H., Suzuki T., Miyazawa M. (2008), "Alpha-glucosidase inhibitor from *Bergenias ligulata*", *J Oleo Sci*, 57(8), pp. 431-5.
162. Chemler J.A., Lock L.T., Koffas M.A., Tzanakakis E.S. (2007), "Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion", *Appl Microbiol Biotechnol*, 77(4), pp. 797-807.
163. Gai H., Zhou F., Zhang Y., Ai J., Zhan J., You Y., Huang W. (2020), "Coniferaldehyde ameliorates the lipid and glucose metabolism in palmitic acid-induced HepG2 cells via the LKB1/AMPK signaling pathway", *J Food Sci*, 85(11), pp. 4050-4060.
164. Li D.L., Li X.M., Peng Z.Y., Wang B.G. (2007), "Flavanol derivatives from *Rhizophora stylosa* and their DPPH radical scavenging activity", *Molecules*, 12(5), pp. 1163-9.
165. Alanon M.E., Diaz-Maroto M.C., Diaz-Maroto I.J., Vila-Lameiro P., Perez-Coello M.S. (2011), "Cyclic polyalcohols: fingerprints to identify the botanical origin of natural woods used in wine aging", *J Agric Food Chem*, 59(4), pp. 1269-74.
166. Kim K.M., Heo D.R., Kim Y.A., Lee J., Kim N.S., Bang O.S. (2016), "Coniferaldehyde inhibits LPS-induced apoptosis through the PKC α/β II/Nrf-2/HO-1 dependent pathway in RAW264.7 macrophage cells", *Environ Toxicol Pharmacol*, 48, pp. 85-93.
167. Susztak K., Raff A.C., Schiffer M., Böttinger E.P. (2006), "Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy", *Diabetes*, 55(1), pp. 225-33.

168. Wronka M., Krzeminska J., Mlynarska E., Rysz J., Franczyk B. (2022), "The Influence of Lifestyle and Treatment on Oxidative Stress and Inflammation in Diabetes", *Int J Mol Sci*, 23(24), pp. 15743.
169. Liu W., Du J.J., Li Z.H., Zhang X.Y., Zuo H.D. (2021), "Liver injury associated with acute pancreatitis: The current status of clinical evaluation and involved mechanisms", *World J Clin Cases*, 9(34), pp. 10418-10429.
170. Al-Attar A.M., Alsalmi F.A. (2019), "Influence of olive leaves extract on hepatorenal injury in streptozotocin diabetic rats", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), pp. 1865-1874.
171. Al-Jaghthmi O.H.A., Zeid I. (2020), "Hypoglycemic and hepatoprotective effect of *Rhizophora mucronata* and *Avicennia marina* against streptozotocin-induced diabetes in male rats", *J Adv Vet Anim Res*, 7(1), pp. 177-185.
172. Soliman A.M. (2016), "Potential impact of *Paracentrotus lividus* extract on diabetic rat models induced by high fat diet/streptozotocin", *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, pp. 8-20.
173. Saha P., Talukdar A.D., Nath R., Sarker S.D., Nahar L., Sahu J., Choudhury M.D. (2019), "Role of Natural Phenolics in Hepatoprotection: A Mechanistic Review and Analysis of Regulatory Network of Associated Genes", *Front Pharmacol*, 10, pp. 509.
174. Majee C., Mazumder R., Choudhary A.N., Salahuddin. (2023), "An Insight into the Hepatoprotective Activity and Structure-activity Relationships of Flavonoids", *Mini Rev Med Chem*, 23(2), pp. 131-149.
175. Wang T.Y., Li Q., Bi K.S. (2018), "Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate", *Asian J Pharm Sci*, 13(1), pp. 12-23.
176. Cai D., Wang J., Chen S., Jiang L., Chen J., Wu J., Qin J. (2021), "Coniferaldehyde prevents articular cartilage destruction in a murine model via Nrf2/HO-1 pathway", *Mol Med Rep*, 23(3), pp. 224.
177. Dong Y., Stewart T., Bai L., Li X., Xu T., Iliff J., Shi M., Zheng D., Yuan L., Wei T., Yang X., Zhang J. (2020), "Coniferaldehyde attenuates Alzheimer's pathology via activation of Nrf2 and its targets", *Theranostics*, 10(1), pp. 179-200.
178. Li G., Min B.S., Zheng C., Lee J., Oh S.R., Ahn K.S., Lee H.K. (2005), "Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis*", *Arch Pharm Res*, 28(7), pp. 804-9.
179. Moskaug J.Ø., Carlsen H., Myhrstad M.C.W., Blomhoff R. (2005), "Polyphenols and glutathione synthesis regulation", *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), pp. 277S-283S.
180. Boots A.W., Kubben N., Haenen G.R., Bast A. (2003), "Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation", *Biochem Biophys Res Commun*, 308(3), pp. 560-5.
181. Miura Y.H., Tomita I., Watanabe T., Hirayama T., Fukui S. (1998), "Active oxygens generation by flavonoids", *Biol Pharm Bull*, 21(2), pp. 93-6.
182. Tian L., Shi M.M., Forman H.J. (1997), "Increased Transcription of the Regulatory Subunit of γ -Glutamylcysteine Synthetase in Rat Lung Epithelial L2 Cells Exposed to

- Oxidative Stress or Glutathione Depletion", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342(1), pp. 126-133.
183. Joyner P.M. (2021), "Protein Adducts and Protein Oxidation as Molecular Mechanisms of Flavonoid Bioactivity", 26(16), pp. 5102.
 184. Bukowski J.A., Lewis R.J. (2000), "Hormesis and health: a little of what you fancy may be good for you", *South Med J*, 93(4), pp. 371-4.
 185. Adiga U.S., Malawadi B.N. (2016), "Association of Diabetic Nephropathy and Liver Disorders", *J Clin Diagn Res*, 10(10), pp. Bc05-bc07.
 186. Tuttle K.R., Agarwal R., Alpers C.E., Bakris G.L., Brosius F.C., Kolkhof P., Uribarri J. (2022), "Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease", *Kidney International*, 102(2), pp. 248-260.
 187. Kleibert M., Zygmunciak P., Łakomska K., Mila K., Zgliczyński W., Mrozikiewicz-Rakowska B. (2023), "Insight into the Molecular Mechanism of Diabetic Kidney Disease and the Role of Metformin in Its Pathogenesis", 24(17), pp. 13038.
 188. Mahmoodnia L., Aghadavod E., Beigrezaei S., Rafieian-Kopaei M. (2017), "An update on diabetic kidney disease, oxidative stress and antioxidant agents", *J Renal Inj Prev*, 6(2), pp. 153-157.
 189. Tzeng T.-F., Liou S.-S., Chang C.J., Liu I.M. (2013), "The Ethanol Extract of *Zingiber zerumbet* Attenuates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, pp. 340645.
 190. Ashkar F., Bhullar K.S., Wu J. (2022), "The Effect of Polyphenols on Kidney Disease: Targeting Mitochondria", *Nutrients*, 14(15), pp. 3115.
 191. Peng P., Zou J., Zhong B., Zhang G., Zou X., Xie T. (2023), "Protective Effects and Mechanisms of Flavonoids in Renal Ischemia-Reperfusion Injury", *Pharmacology*, 108(1), pp. 27-36.
 192. Proks P., Reimann F., Green N., Gribble F., Ashcroft F. (2002), "Sulfonylurea stimulation of insulin secretion", *Diabetes*, 51 Suppl 3, pp. S368-76.
 193. Aggarwal S., Shailendra G., Ribnicky D.M., Burk D., Karki N., Qingxia Wang M.S. (2015), "An extract of *Artemisia dracunculus* L. stimulates insulin secretion from β cells, activates AMPK and suppresses inflammation", *Journal of Ethnopharmacology*, 170, pp. 98-105.
 194. Mahmoud M.F., Abdelaal S., Mohammed H.O., El-Shazly A.M., Daoud R., El Raey M.A., Sobeh M. (2021), "*Syzygium jambos* extract mitigates pancreatic oxidative stress, inflammation and apoptosis and modulates hepatic IRS-2/AKT/GLUT4 signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, pp. 112085.
 195. Herman R., Kravos N.A., Jensterle M., Janež A., Dolžan V. (2022), "Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport", *Int J Mol Sci*, 23(3), pp. 1264.
 196. Hadrich F., Mahmoudi A., Chamkha M., Isoda H., Sayadi S. (2023), "Olive Leaves Extract and Oleuropein Improve Insulin Sensitivity in 3T3-L1 Cells and in High-Fat Diet-Treated Rats via PI3K/AkT Signaling Pathway", *Oxid Med Cell Longev*, 2023, pp. 6828230.

197. Feingold K.R. (2022), Oral and Injectable (Non-Insulin) Pharmacological Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes. [Updated 2022 Aug 26]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279141/>.
198. Hiyoshi T., Fujiwara M., Yao Z. (2017), "Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes", *J Biomed Res*, 33(1), pp. 1-16.
199. Rosak C., Mertes G. (2012), "Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations", *Diabetes Metab Syndr Obes*, 5, pp. 357-67.
200. Chiasson J.L., Josse R.G., Gomis R., Hanefeld M., Karasik A., Laakso M. (2003), "Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial", *Jama*, 290(4), pp. 486-94.
201. McIver L.A., Tripp J. (2022), Acarbose. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493214/>.
202. Jaber S.A. (2023), "In vitro alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activity and in vivo antidiabetic activity of *Quercus coccifera* (Oak tree) leaves extracts", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(7), pp. 103688.
203. Haguet Q., Le Joubioux F., Chavanelle V., Groult H., Schoonjans N., Langhi C., Michaux A., Otero Y.F., Boisseau N., Peltier S.L., Sirvent P., Maugard T. (2023), "Inhibitory Potential of Alpha-Amylase, Alpha-Glucosidase, and Pancreatic Lipase by a Formulation of Five Plant Extracts: TOTUM-63", *International Journal of Molecular Science*, 24(4), pp. 3652.
204. Kifle Z.D., Debeb S.G., Belayneh Y.M. (2021), "In Vitro α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory and Antioxidant Activities of the Crude Extract and Solvent Fractions of *Hagenia abyssinica* Leaves", *BioMed Research International*, 2021, pp. 6652777.
205. Li K., Yao F., Xue Q., Fan H., Yang L., Li X., Sun L., Liu Y. (2018), "Inhibitory effects against α -glucosidase and α -amylase of the flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots and interpretation of structure–activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method", *Chemistry Central Journal*, 12(1), pp. 82.
206. Moein S., Moein M., Javid H. (2022), "Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase of Anthocyanin Isolated from *Berberis integerrima* Bunge Fruits: A Model of Antidiabetic Compounds", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, pp. 6529590.
207. Ogundajo A., Ashafa A.T. (2017), "Phytochemical Compositions and In vitro Assessments of Antioxidant and Antidiabetic Potentials of Fractions from *Ehretia cymosa* Thonn", *Pharmacogn Mag*, 13(Suppl 3), pp. S470-S480.
208. Etxeberria U., de la Garza A.L., Campion J., Martinez J.A., Milagro F.I. (2012), "Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase", *Expert Opin Ther Targets*, 16(3), pp. 269-97.
209. Gopalan G., Prabha B., Joe A., Reshmitha T.R., Sherin D.R., Abraham B., Sabu M., Manojkumar T.K., Radhakrishnan K.V., Nisha P. (2019), "Screening of *Musa balbisiana*

- Colla. seeds for antidiabetic properties and isolation of apiforol, a potential lead, with antidiabetic activity", *J Sci Food Agric*, 99(5), pp. 2521-2529.
210. Ćorković I., Gašo-Sokač D., Pichler A., Šimunović J., Kopjar M. (2022), "Dietary Polyphenols as Natural Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase", *Life (Basel)*, 12(11), pp. 1692.
 211. Lim J., Ferruzzi M.G., Hamaker B.R. (2022), "Structural requirements of flavonoids for the selective inhibition of α -amylase versus α -glucosidase", *Food Chemistry*, 370, pp. 130981.
 212. Anh H.L.T., Vinh L.B., Lien L.T., Cuong P.V., Arai M., Ha T.P., Lin H.N., Dat T.T.H., Cuong L.C.V., Kim Y.H. (2021), "In vitro study on α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of a new stigmastane-type steroid saponin from the leaves of *Vernonia amygdalina*", *Nat Prod Res*, 35(5), pp. 873-879.
 213. Barrett A., Ndou T., Hughey C.A., Straut C., Howell A., Dai Z., Kaletunc G. (2013), "Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes", *J Agric Food Chem*, 61(7), pp. 1477-86.
 214. Zhu J., Chen C., Zhang B., Huang Q. (2020), "The inhibitory effects of flavonoids on α -amylase and α -glucosidase", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(4), pp. 695-708.
 215. Peytam F., Adib M., Shourgeshty R., Mohammadi-Khanaposhtani M., Jahani M., Imanparast S., Faramarzi M.A., Mahdavi M., Moghadamnia A.A., Rastegar H., Larijani B. (2020), "Design and synthesis of new imidazo[1,2-b]pyrazole derivatives, in vitro α -glucosidase inhibition, kinetic and docking studies", *Molecular Diversity*, 24(1), pp. 69-80.
 216. Alssema M., Ruijgrok C., Blaak E.E., Egli L., Dussort P., Vinoy S., Dekker J.M., Denise Robertson M. (2021), "Effects of alpha-glucosidase-inhibiting drugs on acute postprandial glucose and insulin responses: a systematic review and meta-analysis", *Nutrition & Diabetes*, 11(1), pp. 11.
 217. Aoki K., Muraoka T., Ito Y., Togashi Y., Terauchi Y. (2010), "Comparison of Adverse Gastrointestinal Effects of Acarbose and Miglitol in Healthy Men: A Crossover Study", *Internal Medicine*, 49(12), pp. 1085-1087.
 218. Bretnall A.E., Clarke G.S. (1998), Metformin Hydrochloride, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 25, pp. 243-293.
 219. Scott L.J., Spencer C.M. (2000), "Miglitol", *Drugs*, 59(3), pp. 521-549.
 220. Gromova L.V., Fetisov S.O., Gruzdkov A.A. (2021), "Mechanisms of Glucose Absorption in the Small Intestine in Health and Metabolic Diseases and Their Role in Appetite Regulation", *Nutrients*, 13(7), pp. 2474.
 221. Boles E., André B. (2004), Role of transporter-like sensors in glucose and amino acid signalling in yeast, *Topics in Current Genetics*, 9, pp. 155-178.
 222. Rossetti L., Smith D., Shulman G.I., Papachristou D., DeFronzo R.A. (1987), "Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats", *J Clin Invest*, 79(5), pp. 1510-5.
 223. Oranje P., Gouka R., Burggraaff L., Vermeer M., Chalet C., Duchateau G., van der Pijl P., Geldof M., de Roo N., Clauwaert F., Vanpaeschen T., Nicolai J., de Bruyn T., Annaert

- P., AP I.J., van Westen G.J.P. (2019), "Novel natural and synthetic inhibitors of solute carriers SGLT1 and SGLT2", *Pharmacol Res Perspect*, 7(4), pp. e00504.
224. Schulze C., Bangert A., Schwanck B., Vollert H., Blaschek W., Daniel H. (2015), "Extracts and flavonoids from onion inhibit the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) *in vitro* but show no anti-hyperglycaemic effects *in vivo* in normoglycaemic mice and human volunteers", *Journal of Functional Foods*, 18, pp. 117-128.
 225. Blaschek W. (2017), "Natural Products as Lead Compounds for Sodium Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors", *Planta Med*, 83(12-13), pp. 985-993.
 226. Loureiro G., Martel F. (2019), "The effect of dietary polyphenols on intestinal absorption of glucose and fructose: Relation with obesity and type 2 diabetes", *Food Reviews International*, 35(4), pp. 390-406.
 227. Choi C.I. (2016), "Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitors from Natural Products: Discovery of Next-Generation Antihyperglycemic Agents", *Molecules*, 21(9), pp. 1136.
 228. Thota S., Akbar A. (2023), Insulin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560688/>.
 229. Costello R.A., Nicolas S., Shivkumar A. (2023), Sulfonylureas. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513225/>.
 230. Mifsud S., Schembri E.L., Fava S. (2019), "A case of severe relapsing sulphonylurea-induced hypoglycaemia", *BMJ Case Rep*, 12(12), pp. e231368.
 231. Klein-Schwartz W., Stassinis G.L., Isbister G.K. (2016), "Treatment of sulfonylurea and insulin overdose", *Br J Clin Pharmacol*, 81(3), pp. 496-504.
 232. Jain R., Lammert E. (2009), "Cell–cell interactions in the endocrine pancreas", 11(s4), pp. 159-167.
 233. Meda P. (2013), "Protein-mediated interactions of pancreatic islet cells", *Scientifica (Cairo)*, 2013, pp. 621249.
 234. Yuan J., Li S., Peng H., Ma Y., Li L., Fu L., Liu J., Jiang H. (2022), "Artesunate protects pancreatic β -cells from streptozotocin-induced diabetes via inhibition of the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway", *Gen Comp Endocrinol*, 326, pp. 114068.
 235. Saini K.S., Thompson C., Winterford C.M., Walker N.I., Cameron D.P. (1996), "Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1", *Biochem Mol Biol Int*, 39(6), pp. 1229-36.
 236. Domínguez Avila J.A., Rodrigo García J., González Aguilar G.A., De la Rosa L.A. (2017), "The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling", 22(6), pp. 903.
 237. Ghorbani A., Rashidi R., Shafiee-Nick R. (2019), "Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, pp. 947-957.

238. Liu Y., Mu S., Chen W., Liu S., Cong Y., Liu J., Jia N. (2021), "Saponins of *Momordica charantia* increase insulin secretion in INS-1 pancreatic β -cells via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway", *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*, 68(5), pp. 329-337.
239. Inoue R., Tsuno T., Togashi Y., Okuyama T., Sato A., Nishiyama K., Kyohara M., Li J., Fukushima S., Kin T., Miyashita D., Shiba Y., Atobe Y., Kiyonari H., Bando K., Shapiro A.M.J., Funakoshi K., Kulkarni R.N., Terauchi Y., Shirakawa J. (2022), "Uncoupling protein 2 and aldolase B impact insulin release by modulating mitochondrial function and Ca^{2+} release from the ER", *iScience*, 25(7), pp. 104603.
240. Ding D., Wang M., Wu J.X., Kang Y., Chen L. (2019), "The Structural Basis for the Binding of Repaglinide to the Pancreatic K_{ATP} Channel", *Cell Rep*, 27(6), pp. 1848-1857.e4.
241. Martin G.M., Kandasamy B., DiMaio F., Yoshioka C., Shyng S.L. (2017), "Anti-diabetic drug binding site in a mammalian K_{ATP} channel revealed by Cryo-EM", *Elife*, 6, pp. e31054.
242. Bhatti J.S., Sehrawat A., Mishra J., Sidhu I.S., Navik U., Khullar N., Kumar S., Bhatti G.K., Reddy P.H. (2022), "Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives", *Free Radic Biol Med*, 184, pp. 114-134.
243. Dlodla P.V., Mabhida S.E., Ziqubu K., Nkambule B.B., Mazibuko-Mbeje S.E., Hanser S., Basson A.K., Pfeiffer C., Kengne A.P. (2023), "Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: Implications of inflammation and oxidative stress", *World J Diabetes*, 14(3), pp. 130-146.
244. Bhatti J.S., Sehrawat A., Mishra J., Sidhu I.S., Navik U., Khullar N., Kumar S., Bhatti G.K., Reddy P.H. (2022), "Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives", *Free Radical Biology and Medicine*, 184, pp. 114-134.
245. Huang H., Lorenz B.R., Zelmanovitz P.H., Chan C.B. (2021), "Metformin Preserves β -Cell Compensation in Insulin Secretion and Mass Expansion in Prediabetic Nile Rats", *Int J Mol Sci*, 22(1), pp. 421.
246. Daems C., Welsch S., Boughaleb H., Vanderroost J., Robert A., Sokal E., Lysy P.A. (2019), "Early Treatment with Empagliflozin and GABA Improves β -Cell Mass and Glucose Tolerance in Streptozotocin-Treated Mice", *J Diabetes Res*, 2019, pp. 2813489.
247. Tamura K., Minami K., Kudo M., Iemoto K., Takahashi H., Seino S. (2015), "Liraglutide Improves Pancreatic Beta Cell Mass and Function in Alloxan-Induced Diabetic Mice", *PLOS ONE*, 10(5), pp. e0126003.
248. Liang H., Pan Y., Teng Y., Yuan S., Wu X., Yang H., Zhou P. (2020), "A proteoglycan extract from *Ganoderma lucidum* protects pancreatic beta-cells against STZ-induced apoptosis", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(12), pp. 2491-2498.
249. Wickramasinghe A.S.D., Kalansuriya P., Attanayake A.P. (2021), "Herbal Medicines Targeting the Improved β -Cell Functions and β -Cell Regeneration for the Management of Diabetes Mellitus", *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, pp. 2920530.
250. Tuohetaerbaike B., Zhang Y., Tian Y., Zhang N.N., Kang J., Mao X., Zhang Y., Li X. (2020), "Pancreas protective effects of Urolithin A on type 2 diabetic mice induced by

- high fat and streptozotocin via regulating autophagy and AKT/mTOR signaling pathway", *J Ethnopharmacol*, 250, pp. 112479.
251. Lee M.S., Chyau C.C., Wang C.P., Wang T.H., Chen J.H., Lin H.H. (2020), "Flavonoids Identification and Pancreatic Beta-Cell Protective Effect of Lotus Seedpod", *Antioxidants (Basel)*, 9(8), pp. 658.
 252. Chen X., Zhao H., Lu Y., Liu H., Meng F., Lu Z., Lu Y. (2022), "Surfactin Mitigates a High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes through Improving Pancreatic Dysfunction and Inhibiting Inflammatory Response", *Int J Mol Sci*, 23(19), pp. 11086.
 253. Jubaidi F.F., Zainalabidin S., Taib I.S., Abdul Hamid Z., Mohamad Anuar N.N., Jalil J., Mohd Nor N.A., Budin S.B. (2022), "The Role of PKC-MAPK Signalling Pathways in the Development of Hyperglycemia-Induced Cardiovascular Complications", *Int J Mol Sci*, 23(15), pp. 8582.
 254. Sidarala V., Kowluru A. (2017), "The Regulatory Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathways in Health and Diabetes: Lessons Learned from the Pancreatic β -Cell", *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 10(2), pp. 76-84.
 255. Brun T., Jiménez-Sánchez C., Madsen J.G.S., Hadadi N., Duhamel D., Bartley C., Oberhauser L., Trajkovski M., Mandrup S., Maechler P. (2020), "AMPK Profiling in Rodent and Human Pancreatic Beta-Cells under Nutrient-Rich Metabolic Stress", *Int J Mol Sci*, 21(11), pp. 3982.
 256. Qian S., Wei Z., Yang W., Huang J., Yang Y., Wang J. (2022), "The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy", *Front Oncol*, 12, pp. 985363.
 257. Sung K.F., Odinokova I.V., Mareninova O.A., Rakonczay Z., Jr., Hegyi P., Pandol S.J., Gukovsky I., Gukovskaya A.S. (2009), "Prosurvival Bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis", *Exp Cell Res*, 315(11), pp. 1975-89.
 258. Obrosova I.G., Li F., Abatan O.I., Forsell M.A., Komjati K., Pacher P., Szabo C., Stevens M.J. (2004), "Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy", *Diabetes*, 53(3), pp. 711-20.
 259. Gallyas F., Jr., Sumegi B. (2020), "Mitochondrial Protection by PARP Inhibition", *Int J Mol Sci*, 21(8), pp. 2767.
 260. Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M. (1996), "Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues", *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), pp. 463-466.
 261. Tsalamandris S., Antonopoulos A.S., Oikonomou E., Papamikroulis G.A., Vogiatzi G., Papaioannou S., Deftereos S., Tousoulis D. (2019), "The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives", *Eur Cardiol*, 14(1), pp. 50-59.
 262. Ellulu M.S., Samouda H. (2022), "Clinical and biological risk factors associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus", *BMC Endocrine Disorders*, 22(1), pp. 16.
 263. Halban P.A., Polonsky K.S., Bowden D.W., Hawkins M.A., Ling C., Mather K.J., Powers A.C., Rhodes C.J., Sussel L., Weir G.C. (2014), " β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment", *Diabetes Care*, 37(6), pp. 1751-8.

264. Wang W., Ye L., Ye L., Li B., Gao B., Zeng Y., Kong L., Fang X., Zheng H., Wu Z., She Y. (2007), "Up-regulation of IL-6 and TNF- α induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF- κ B pathway", *Virus Research*, 128(1), pp. 1-8.
265. Baker R.G., Hayden M.S., Ghosh S. (2011), "NF- κ B, inflammation, and metabolic disease", *Cell Metab*, 13(1), pp. 11-22.
266. Sever D., Hershko-Moshe A., Srivastava R., Eldor R., Hibsher D., Keren-Shaul H., Amit I., Bertuzzi F., Krogvold L., Dahl-Jørgensen K., Ben-Dov I.Z., Landsman L., Melloul D. (2021), "NF- κ B activity during pancreas development regulates adult β -cell mass by modulating neonatal β -cell proliferation and apoptosis", *Cell Death Discovery*, 7(1), pp. 2.
267. Bansod S., Godugu C. (2021), "Nimbolide ameliorates pancreatic inflammation and apoptosis by modulating NF- κ B/SIRT1 and apoptosis signaling in acute pancreatitis model", *International Immunopharmacology*, 90, pp. 107246.
268. Wen W., Lin Y., Ti Z. (2019), "Antidiabetic, Antihyperlipidemic, Antioxidant, Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Seed Extract of *Annona reticulata* L. in Streptozotocin Induced Diabetic Rats", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, pp. 716.
269. Kong M., Xie K., Lv M., Li J., Yao J., Yan K., Wu X., Xu Y., Ye D. (2021), "Anti-inflammatory phytochemicals for the treatment of diabetes and its complications: Lessons learned and future promise", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, pp. 110975.
270. Cumaoglu A., Ari N., Kartal M., Karasu Ç. (2011), "Polyphenolic extracts from *Olea europea* L. protect against cytokine-induced β -cell damage through maintenance of redox homeostasis", *Rejuvenation Res*, 14(3), pp. 325-34.
271. Papuc C., Goran G.V., Predescu C.N., Tudoreanu L., Ștefan G. (2022), "Plant polyphenols mechanisms of action on insulin resistance and against the loss of pancreatic beta cells", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 62(2), pp. 325-352.
272. Dall'Asta M., Bayle M., Neasta J., Scazzina F., Bruni R., Cros G., Del Rio D., Oiry C. (2015), "Protection of pancreatic β -cell function by dietary polyphenols", *Phytochemistry Reviews*, 14(6), pp. 933-959.
273. Morino K., Petersen K.F., Shulman G.I. (2006), "Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links With Mitochondrial Dysfunction", *Diabetes*, 55(2), pp. 9.
274. Johnson T.O., Ermolieff J., Jirousek M.R. (2002), "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes", *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), pp. 696-709.
275. Ullah A., Ali N., Ahmad S., Rahman S.U., Alghamdi S., Bannunah A.M., Ali R., Aman A., Khan J., Hussain H., Sahibzada M.U.K. (2021), "Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) a magic enzyme: it's role in diabetes mellitus and glucose homeostasis, interactions with fluroquionlones. A mini-review", *Braz J Biol*, 83, pp. e250179.
276. Eleftheriou P., Geronikaki A., Petrou A. (2019), "PTP1B Inhibition, A Promising Approach for the Treatment of Diabetes Type II", *Curr Top Med Chem*, 19(4), pp. 246-263.
277. Elchebly M., Payette P., Michaliszyn E., Cromlish W., Collins S., Loy A.L., Normandin D., Cheng A., Himms-Hagen J., Chan C.C., Ramachandran C., Gresser M.J., Tremblay M.L., Kennedy B.P. (1999), "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene", *Science*, 283(5407), pp. 1544-8.
278. Liu Z., Gao H., Zhao Z., Huang M., Wang S., Zhan J. (2023), "Status of research on natural protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as potential antidiabetic agents: Update", *Biomed Pharmacother*, 157, pp. 113990.

279. Zhao B.T., Nguyen D.H., Le D.D., Choi J.S., Min B.S., Woo M.H. (2018), "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources", *Arch Pharm Res*, 41(2), pp. 130-161.
280. Keedy D.A., Hill Z.B., Biel J.T., Kang E., Rettenmaier T.J., Brandão-Neto J., Pearce N.M., von Delft F., Wells J.A., Fraser J.S. (2018), "An expanded allosteric network in PTP1B by multitemperature crystallography, fragment screening, and covalent tethering", *eLife*, 7, pp. e36307.
281. Wiesmann C., Barr K.J., Kung J., Zhu J., Erlanson D.A., Shen W., Fahr B.J., Zhong M., Taylor L., Randal M., McDowell R.S., Hansen S.K. (2004), "Allosteric inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B", *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(8), pp. 730-737.
282. Entezari M., Hashemi D., Taheriazam A., Zabolian A., Mohammadi S., Fakhri F., Hashemi M., Hushmandi K., Ashrafizadeh M., Zarrabi A., Ertas Y.N., Mirzaei S., Samarghandian S. (2022), "AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation", *Biomed Pharmacother*, 146, pp. 112563.
283. Schultze S.M., Hemmings B.A., Niessen M., Tschopp O. (2012), "PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis", *Expert Rev Mol Med*, 14, pp. e1.
284. Dutta S., Shah R.B., Singhal S., Dutta S.B., Bansal S., Sinha S., Haque M. (2023), "Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes", *Drug Des Devel Ther*, 17, pp. 1907-1932.
285. Madsen K.S., Kahler P., Kahler L.K.A., Madsbad S., Gnesin F., Metzendorf M.I., Richter B., Hemmingsen B. (2019), "Metformin and second- or third-generation sulphonylurea combination therapy for adults with type 2 diabetes mellitus", *Cochrane Database Syst Rev*, 4(4), pp. CD012368.
286. Zhang Y., Chen J., Zeng Y., Huang D., Xu Q. (2019), "Involvement of AMPK activation in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by Ficus carica leaf extract in diabetic mice and HepG2 cells", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, pp. 188-194.
287. Zhou X., He L., Zuo S., Zhang Y., Wan D., Long C., Huang P., Wu X., Wu C., Liu G., Yin Y. (2018), "Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione synthesis-related genes", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(2), pp. 488-498.
288. Zhou X., Zhang Y., He L., Wan D., Liu G., Wu X., Yin Y. (2017), "Serine prevents LPS-induced intestinal inflammation and barrier damage via p53-dependent glutathione synthesis and AMPK activation", *Journal of Functional Foods*, 39, pp. 225-232.
289. Lin C.H., Hsiao L.W., Kuo Y.H., Shih C.C. (2019), "Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of Sulphurenic Acid, a Triterpenoid Compound from *Antrodia camphorata*, in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice", *Int J Mol Sci*, 20(19), pp. 4897.
290. Vinayagam R., Jayachandran M., Chung S.S.M., Xu B. (2018), "Guava leaf inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via AMPK/ACC signaling pathways in streptozotocin-induced diabetic rats", *Biomed Pharmacother*, 103, pp. 1012-1017.
291. Xu W., Luo Y., Yin J., Huang M., Luo F. (2023), "Targeting AMPK signaling by polyphenols: a novel strategy for tackling aging", *Food Funct*, 14(1), pp. 56-73.
292. Xie X., Wu C., Hao Y., Wang T., Yang Y., Cai P., Zhang Y., Huang J., Deng K., Yan D., Lin H. (2023), "Benefits and risks of drug combination therapy for diabetes mellitus and its complications: a comprehensive review", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, pp. 1301093.

PHỤ LỤC

MỤC LỤC CÁC PHỤ LỤC

- Phụ lục 1. Giám định tên khoa học mẫu nghiên cứu
- Phụ lục 2. Kết quả sàng lọc tác dụng ức chế α -glucosidase của một số cao chiết từ hạt chuối cô đơn
- Phụ lục 3. Kết quả sàng lọc tác dụng ức chế α -glucosidase của một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn
- Phụ lục 4. Quy trình chuẩn bị cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn
- Phụ lục 5. Quy trình phân lập các hợp chất từ hạt chuối cô đơn
- Phụ lục 6. Đánh giá tính an toàn của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn bằng thử nghiệm độc tính cấp đường uống
- Phụ lục 7. Giấy chứng nhận chấp thuận của hội đồng đạo đức trong nghiên cứu trên động vật
- Phụ lục 8. Tóm tắt quy trình định lượng glucose trong huyết tương bằng bộ kit GOD-PAP
- Phụ lục 9. Tóm tắt quy trình định lượng insulin trong huyết tương bằng bộ kit Mercodia mouse Elisa insulin kit (10-1247-01)
- Phụ lục 10. Tóm tắt quy trình định lượng AST, ALT, ALP, GGT, BUN, creatinin trong thanh tương bằng bộ kit Alinity Abbott
- Phụ lục 11. Quy trình nhuộm mô H&E
- Phụ lục 12. Quy trình định lượng protein bằng thử nghiệm Bradford
- Phụ lục 13. Đường chuẩn MDA và GSH
- Phụ lục 14. Tóm tắt quy trình định lượng TNF- α trong dịch đồng thể mô bằng bộ kit Legend max mouse TNF- α Elisa kit (430907, Biolegend, Mỹ)
- Phụ lục 15. Tóm tắt quy trình định lượng IL-6 trong dịch đồng thể mô bằng bộ kit Legend max mouse IL-6 Elisa kit (431307, Biolegend, Mỹ)
- Phụ lục 16. Tóm tắt quy trình định lượng insulin trong dịch ủ tiểu đảo tụy bằng bộ kit Human insulin Elisa (Ab100578, Abcam)
- Phụ lục 17. Kết quả tác động của STZ liều tiêm (i.p.) duy nhất 170 mg/kg
- Phụ lục 18. Kết quả nhuộm mô H&E gan và thận
- Phụ lục 19. Kết quả phân lập tiểu đảo tụy từ chuột nhắt trắng
- Phụ lục 20. Kết quả phân tích *in silico* tác dụng ức chế α -glucosidase, K_{ATP} và PTP1B của các hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn
- Phụ lục 21. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết ethanol lên nồng độ glucose huyết và cân nặng của chuột bình thường
- Phụ lục 22. Kết quả tác động của cao chiết ethanol lên trọng lượng cơ thể, trọng lượng của cơ quan và trọng lượng tương đối của các cơ quan
- Phụ lục 23. Kết quả tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ (lặp lại thử nghiệm lần thứ 2)

PHỤ LỤC 1. GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC MẪU NGHIÊN CỨU

Hạt chuối cô đơn được thu tại tỉnh Ninh Thuận; các hạt nguyên, màu đen được tách từ những quả chín. Một số bộ phận và hình ảnh của cây được thu thập để giám định thực vật. Mẫu nghiên cứu được xác định tên khoa học là *Ensete glaucum* (Roxb.) Cheesman.



VIỆN DƯỢC LIỆU
NATIONAL INSTITUTE OF MEDICINAL MATERIALS
TRUNG TÂM SÂM VÀ DƯỢC LIỆU THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
RESEARCH CENTER OF GINSENG AND MEDICINAL MATERIALS (CGMM)
Địa chỉ: 41 Đinh Tiên Hoàng, P. Bến Nghé, Quận 1, TP.HCM
Tel/Fax: 0283.8274377

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH MẪU

(Kết quả giám định chỉ có giá trị với mẫu đem phân tích)

Số: DD 04/2020

Mẫu giám định: **Chuối cô đơn**

Số lượng mẫu: 02 mẫu

Nơi lấy mẫu: xã Phước Bình, huyện Bác Ái, tỉnh Ninh Thuận

Ngày lấy mẫu: 25/11/2020

Người gửi mẫu: Lý Hải Triều

Đơn vị: Phòng Dược lý Sinh Hóa, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM

Địa chỉ: 41 Đinh Tiên Hoàng, P. Bến Nghé, Quận 1, TP.HCM

Người nhận mẫu: Nguyễn Thu Hằng

Nội dung yêu cầu: Định danh tên khoa học

Phương pháp giám định: So sánh hình thái, đối chiếu khóa phân loại và bản mô tả trong các tài liệu chuyên ngành

Cán bộ giám định: Lê Đức Thanh

Kết quả:

Yêu cầu	Kết quả
Tên khoa học:	<i>Ensete glaucum</i> (Roxb.) Cheesm
Synonym:	<i>Musa glauca</i> Roxb.
Tên Việt Nam khác:	Chuối hoa sen, Chuối chân voi, Chuối mỡ côi
Họ thực vật:	Họ Chuối (Musaceae)

(Chi tiết theo phụ lục 1, 2 đính kèm)

Phòng Tài nguyên và Phát triển Dược liệu
Cán bộ giám định Phó trưởng phòng

TP.HCM, ngày 30 tháng 12 năm 2020

GIÁM ĐỐC



Lê Văn Minh

Lê Đức Thanh

Ngô Thị Minh Huyền

Phụ lục 1: Kết quả giám định

Mẫu giám định: **Chuối cô đơn** (Tên gọi do người gửi mẫu cung cấp)

Số lượng mẫu: 02 mẫu (TB-01CCĐ, TB-02CCĐ)

Ngày nhận mẫu: 25/11/2020

Nơi lấy mẫu: xã Phước Bình, huyện Bác Ái, tỉnh Ninh Thuận

Người yêu cầu: Lý Hải Triều

Địa chỉ: Phòng Dược lý Sinh Hóa, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM

41 Đinh Tiên Hoàng, P. Bến Nghé, Quận 1, TP.HCM

Phương pháp giám định: So sánh hình thái, đối chiếu khóa phân loại và bản mô tả trong các tài liệu chuyên ngành.

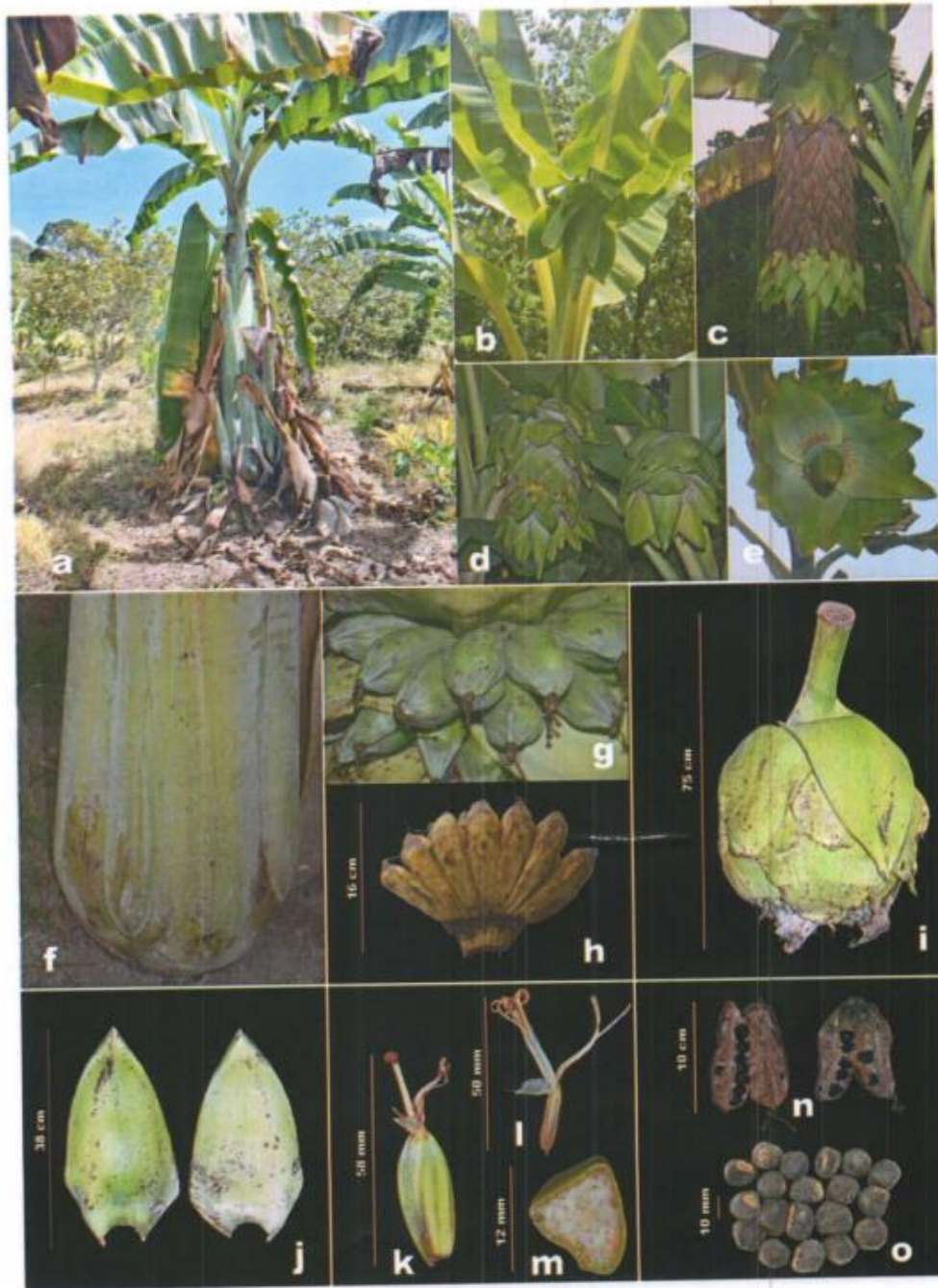
Cán bộ giám định: Lê Đức Thanh

Sau khi phân tích 02 mẫu có số hiệu TB-01CCĐ, TB-02CCĐ kể trên, tham khảo các tài liệu hiện có, chúng tôi đã xác định được tên khoa học của mẫu, cụ thể như sau:

Yêu cầu	Kết quả
Tên khoa học:	<i>Ensete glaucum</i> (Roxb.) Cheesm
Tên latin khác:	<i>Musa glauca</i> Roxb.
Tên Việt Nam	Chuối hoa sen, Chuối chân voi, Chuối mỡ côi
Họ thực vật:	Họ Chuối (Musaceae)
Tài liệu tham khảo:	
1. https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000407843 , ngày truy cập (29/12/2020)	
2. https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:584796-1 , ngày truy cập (29/12/2020)	
3. Phạm Hoàng Hộ (1999), <i>Cây cỏ Việt Nam</i> , NXB Trẻ, Quyển 3, trang 428	



Phụ lục 2: Ảnh mẫu giám định



a. Toàn cây; b-e: cụm hoa; f: gốc thân giả; g-i: buồng quả; j: lá bắc; k: hoa cái; l: hoa đực; m-n: quả; o: hạt



PHỤ LỤC 2. KẾT QUẢ SÀNG LỌC TÁC DỤNG ỨC CHẾ α -GLUCOSIDASE CỦA MỘT SỐ CAO CHIẾT TỪ HẠT CHUỐI CÔ ĐƠN

Trong dân gian, hạt chuối cô đơn được sử dụng phổ biến dưới hai hình thức là ngâm với rượu 35-45° hoặc sắc với nước. Trong điều kiện nghiên cứu, phương pháp và dung môi chiết xuất cũng được lựa chọn phù hợp với cách sử dụng trong dân gian bao gồm ngâm với ethanol 45% và sắc với nước. Hơn nữa, nghiên cứu cũng thực hiện thêm các phương pháp và dung môi chiết khác bao gồm chiết nóng với ethanol và ethanol 45%, ngâm với ethanol và chiết ngấm kiệt với ethanol để mở rộng thông tin khoa học cho việc sử dụng dược liệu này. Tuy nhiên, phương pháp chiết ngấm kiệt không phù hợp với nguyên liệu này vì do ảnh hưởng của tinh bột từ hạt nên gây ra hiện tượng tắc dòng dịch chiết ngấm kiệt, điều này ảnh hưởng rất nhiều đến quá trình chiết xuất nên phương pháp chiết này không được thực hiện trong nghiên cứu. Như vậy, một số cao chiết từ hạt chuối cô đơn bao gồm cao chiết ethanol (E1) và cao chiết ethanol 45% (E3) được chiết bằng phương pháp ngâm dầm, cao chiết ethanol (E2) và cao chiết ethanol 45% (E4) được chiết bằng phương pháp chiết nóng và cao chiết nước (E5) được chiết bằng phương pháp sắc, đã được đánh giá tác dụng ức chế α -glucosidase để chọn cao chiết tiềm năng.

Bảng 2.1. Tác dụng ức chế α -glucosidase của các cao chiết

Cao chiết	% ức chế				IC₅₀ (μg/ml)
<i>Nồng độ (μg/ml)</i>	0,59	1,17	2,34	4,69	
E1	10,31 $\pm$ 1,55	26,19 $\pm$ 4,54	54,27 $\pm$ 3,32	91,94 $\pm$ 0,43	2,093
E2	11,48 $\pm$ 3,40	37,39 $\pm$ 2,28	71,61 $\pm$ 3,53	94,22 $\pm$ 2,82	1,511
E4	19,76 $\pm$ 2,18	29,84 $\pm$ 4,65	47,57 $\pm$ 4,41	74,87 $\pm$ 1,45	2,350
<i>Nồng độ (μg/ml)</i>	1,17	2,34	4,69	18,75	
E3	18,70 $\pm$ 4,88	43,06 $\pm$ 6,05	65,37 $\pm$ 2,94	93,58 $\pm$ 1,24	2,943
<i>Nồng độ (μg/ml)</i>	4,69	9,38	18,75	37,50	
E5	29,60 $\pm$ 6,64	54,90 $\pm$ 3,23	63,94 $\pm$ 12,51	90,70 $\pm$ 0,25	9,289
<i>Nồng độ (μg/ml)</i>	187,5	375	750	1500	
Acarbose	36,30 $\pm$ 4,34	43,38 $\pm$ 3,09	65,19 $\pm$ 2,79	74,98 $\pm$ 0,65	411,80

Trung bình $\pm$ SD (n = 3). E1 và E3: Cao chiết ethanol và ethanol 45% bằng phương pháp ngâm dầm, E2 và E4: Cao chiết ethanol và ethanol 45% bằng phương pháp chiết nóng, E5: Cao chiết nước bằng phương pháp sắc

Kết quả ở **bảng 2.1** cho thấy:

Các cao chiết đều có tác dụng ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} theo thứ tự $E2 < E1 < E4 < E3 < E5 < acarbose$. Như vậy, các cao chiết đều thể hiện tác dụng ức chế α -glucosidase tốt hơn nhiều so với acarbose và cao chiết E2 (Cao chiết ethanol bằng phương pháp chiết nóng) có tác dụng ức chế α -glucosidase tốt nhất. Do đó, cao chiết ethanol được chọn là cao chiết tiềm năng cho nghiên cứu.

PHỤ LỤC 3. KẾT QUẢ SÀNG LỌC TÁC DỤNG ỨC CHẾ α -GLUCOSIDASE CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ HẠT CHUỐI CÔ ĐƠN

Trong đề tài này, một số hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn bao gồm afzelechin, coniferaldehyd, daucosterol, 4-hydroxy-benzaldehyd, sinapaldehyd và acid trans-cinnamic đã được đánh giá tác dụng ức chế α -glucosidase để chọn được hợp chất tiềm năng cho nghiên cứu.

Bảng 3.1. Phần trăm ức chế α -glucosidase của một số hợp chất phân lập từ hạt chuối cô đơn ở nồng độ 50 μ g/ml

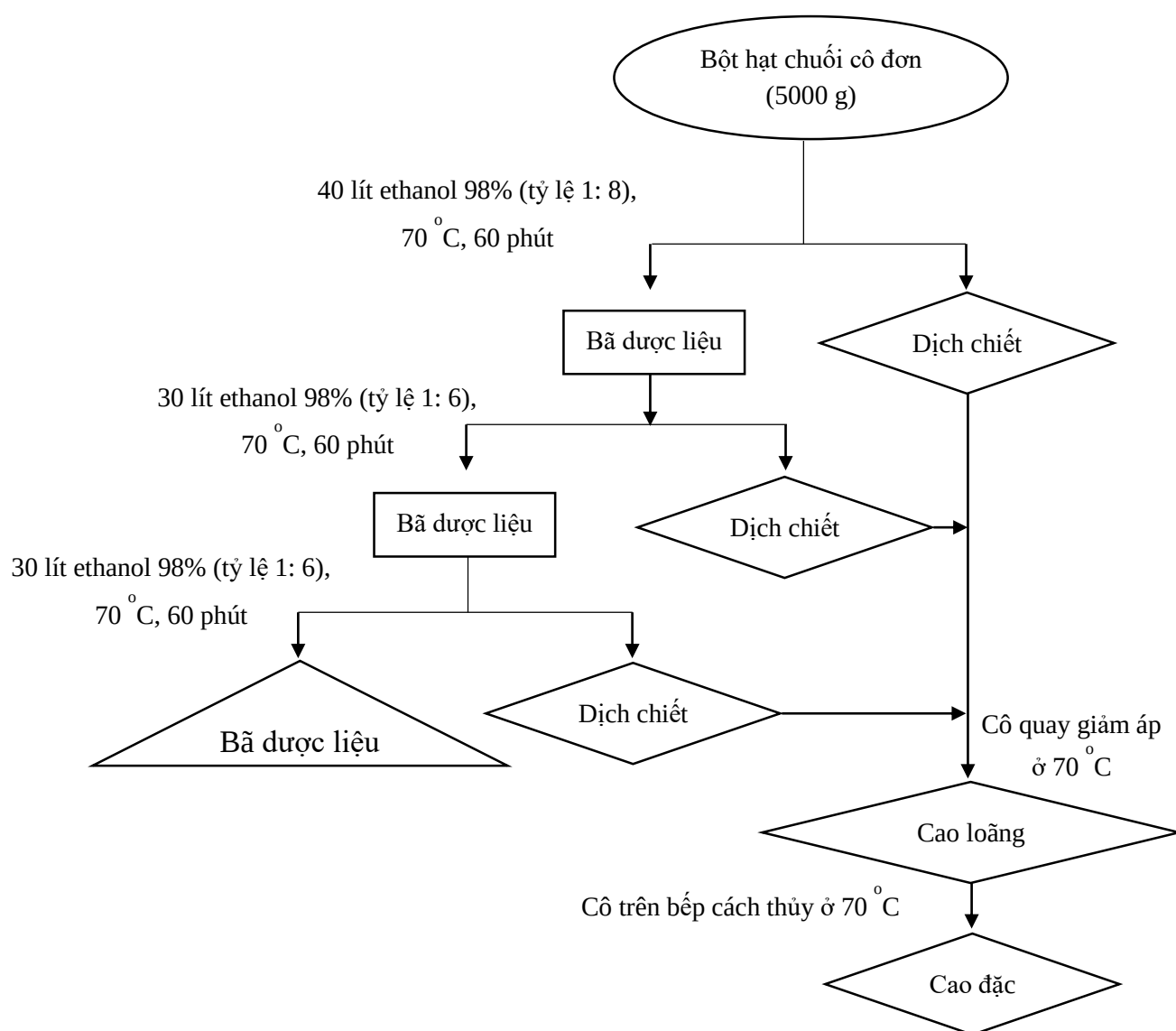
Hợp chất	Afzelechin	Conifer-aldehyd	Dauco-sterol	4-hydroxy-benzaldehyd	Sinap-aldehyd	Acid trans-cinnamic	Acarbose 750 μ g/ml
1	42,49	94,17	34,46	12,69	7,40	3,96	63,08
2	47,01	94,46	41,41	13,83	11,86	9,36	58,21
3	44,18	94,17	34,67	15,07	13,83	13,21	64,85
Trung bình $\pm$ SD	44,56 $\pm$ 2,28	94,27 $\pm$ 0,16	36,85 $\pm$ 3,95	13,86 $\pm$ 1,19	11,03 $\pm$ 3,29	8,84 $\pm$ 4,65	62,05 $\pm$ 3,44

Kết quả ở **bảng 3.1** cho thấy:

Các hợp chất đều thể hiện khả năng ức chế α -glucosidase ở nồng độ 50 μ g/ml với phần trăm ức chế theo thứ tự coniferaldehyd > afzelechin > daucosterol > 4-hydroxy-benzaldehyd > sinapaldehyd > acid trans-cinnamic. Do đó, afzelechin và coniferaldehyd được chọn là những hợp chất tiềm năng cho nghiên cứu.

PHỤ LỤC 4. QUY TRÌNH CHUẨN BỊ CAO CHIẾT ETHANOL TỪ HẠT CHUỐI CÔ ĐƠN

Hạt sau khi tách từ quả chín sẽ được rửa sạch, sấy khô ở 40-50 °C và được xay nhỏ có kích thước khoảng 2 mm để chiết xuất. Dược liệu được chiết với ethanol ba lần liên tiếp với tổng tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/20 (g/ml), thời gian cho mỗi lần chiết là 60 phút, nhiệt độ chiết là 70 °C. Dịch chiết được tập trung và cô quay giảm áp ở 70 °C thu cao loãng. Cao loãng được tiếp tục cô trên bếp cách thủy ở 70 °C thu cao đặc để nghiên cứu. Hiệu suất chiết cao đạt 2,12% (đã trừ ẩm).



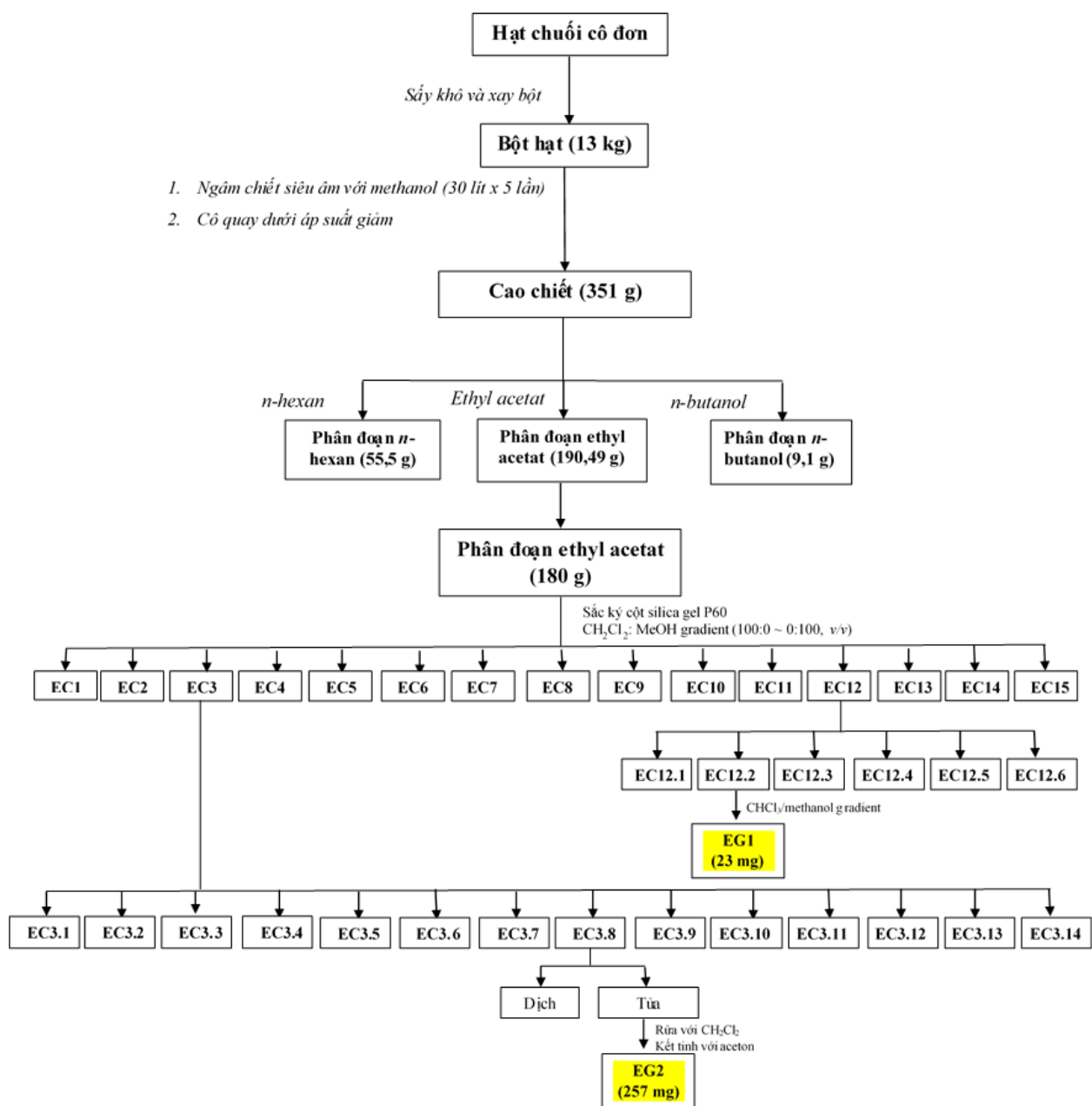
Hình 4.1. Sơ đồ chiết xuất cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

Bảng 4.1. Một số chỉ tiêu chất lượng của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn

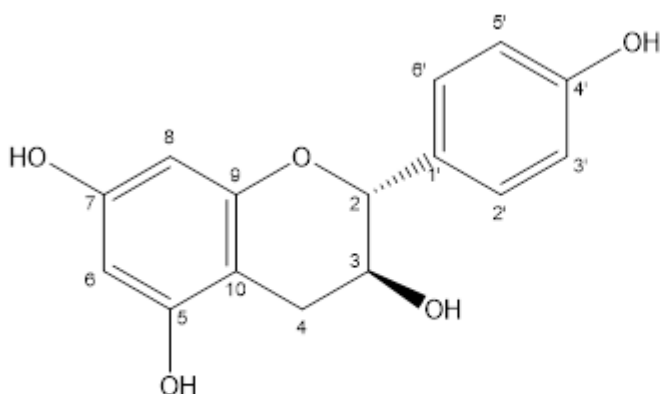
STT	Chỉ tiêu	Kết quả	Phương pháp thử
1	Cảm quan	Cao chiết là cao đặc, có màu đen, vị ngọt nhẹ, hơi chát và mùi thơm nhẹ đặc trưng.	Cảm quan và quan sát bằng mắt thường
2	Độ tinh khiết		
2.1	Độ ẩm	15,01%	ĐĐVN V - Phụ lục 9.6
2.2	Tro toàn phần	3,31%	ĐĐVN V - Phụ lục 9.8
3	Giới hạn nhiễm khuẩn	Đạt yêu cầu theo bảng 13.6.6, phụ lục 13.6, ĐĐVN V (Tổng số vi sinh vật hiếu khí $\leq 10^4$ CFU/g; Tổng số nấm $\leq 10^2$ CFU/g; Không quá 10^2 CFU vi khuẩn <i>Gram</i> âm dung nạp mật trong 1 g; Không có <i>Salmonella</i> trong 10 g; Không có <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> trong 1 g).	ĐĐVN V - Phụ lục 13.6
4	Định tính		
4.1.	Xác định sự hiện diện của polyphenol và flavonoid trong cao chiết.	Dịch chiết từ cao chiết phải dương tính với các thuốc thử đặc trưng của polyphenol và flavonoid (TT NaOH 10%, TT FeCl ₃ 5%, TT Pb(CH ₃ COO) ₂ 10% và TT Cyanidin).	Phản ứng hóa học
4.2.	Xác định sự hiện diện của hợp chất afzelechin và coniferaldehyd trong cao chiết.	Sắc kí đồ của dịch chiết từ cao chiết phải có vết có R _f và màu sắc tương đồng với chuẩn afzelechin và coniferaldehyd.	Sắc ký lớp mỏng
5	Hàm lượng polyphenol tổng	Hàm lượng polyphenol tổng theo chuẩn acid gallic (GAE) là 172,03 mg GAE/g cao khô kiệt.	Đo quang (UV-Vis)
6	Hàm lượng flavonoid toàn phần	Hàm lượng flavonoid toàn phần theo chuẩn quercetin (QE) là 21,06 mg GAE/g cao khô kiệt.	Đo quang (UV-Vis)

PHỤ LỤC 5. QUY TRÌNH PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT TỪ HẠT CHUỐI CÔ ĐƠN

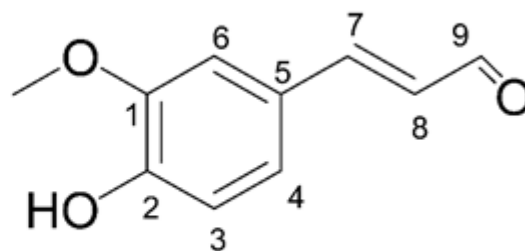
Dược liệu hạt chuối cô đơn được ngâm chiết siêu âm với methanol. Dịch lọc được tập trung và cô quay dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi thu được cao chiết methanol. Hòa cao chiết với nước cất và chiết phân bố lỏng-lỏng lần lượt với các dung môi có độ phân cực dần tăng bao gồm *n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol. Các dịch chiết thu được cô quay dưới áp suất giảm thu được các cao chiết phân đoạn tương ứng là *n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol. Cao chiết phân đoạn ethyl acetat được tiến hành chạy sắc ký cột silica gel pha thường (P60) với gradient hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100:0 ~ 0:100) thu được 15 phân đoạn, ký hiệu từ EC1 đến EC15. Tiến hành chạy sắc ký cột silica gel pha thường (P60) với phân đoạn EC3, gradient hệ dung môi *n*-hexan: ethyl acetat (100:0 ~ 0:100), rửa cột bằng methanol, gộp các phân đoạn giống nhau thu được 14 phân đoạn, ký hiệu từ EC3.1 đến EC3.14. Từ phân đoạn EC3.8 xuất hiện kết tủa, lọc và rửa tủa bằng CH_2Cl_2 tinh khiết và kết tinh lại bằng acetone tinh khiết thu được hợp chất ký hiệu là **EG2**. Từ phân đoạn EC12 tiếp tục thực hiện sắc ký cột pha thường với cột có chiều dài 70 cm, đường kính trong 3 cm, chiều cao silicagel trong cột 25 cm và vận tốc giải ly 2 cm/phút. Hệ dung môi có độ phân cực tăng dần CHCl_3 100%, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (10:1 ~ 5:1 ~ 3:1 ~ 1:1) và CH_3OH 100%. Kiểm tra bằng chấm sắc ký bản mỏng ly giải bằng hệ $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ thích hợp, dùng thuốc thử H_2SO_4 10% để hiện vết và gom các phân đoạn có các vết giống nhau lại với nhau thu được 6 phân đoạn được ký hiệu từ EC12.1 đến EC12.6. Phân đoạn EC12.3 tiếp tục sắc ký cột pha thường nhiều lần với cột có chiều dài 70 cm, đường kính trong 1,8 cm, chiều cao silicagel trong cột 30 cm và vận tốc giải ly 1 cm/phút. Hệ dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1 ~ 90:1 ~ 80:1 ~ 70:1 ~ ...) thu hợp chất **EG1**.



Hình 5.1. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ hạt chuối cô đơn



EG1 - Afzelechin



EG2 - Coniferaldehyd

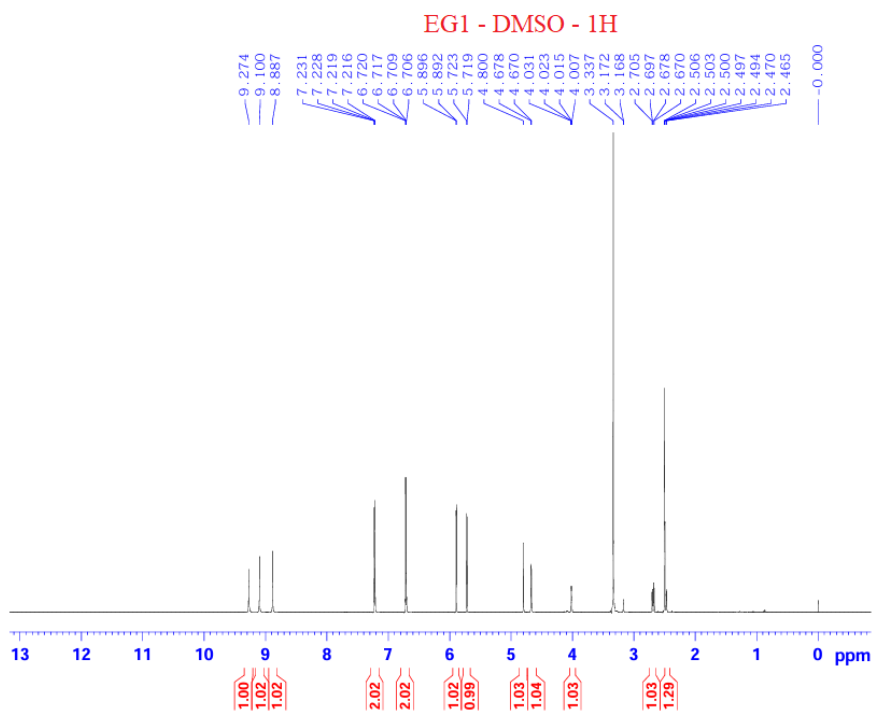
Hình 5.2. Cấu trúc của hai hợp chất được phân lập từ hạt chuối cô đơn

PHỤ LỤC 5.1. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT EG1

Bảng 5.1. Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất EG1

Vị trí C/H	DEPT	^1H -NMR (δ_{H} ppm) (No. H, mult., J Hz)	^{13}C -NMR (δ_{C} ppm)	HMBC correlations ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
2	CH	4,80 (1H, s)	78,0	C-7, C-1'
3	CH	4,02 (1H, <i>dd</i> , 4,8, 9,6)	64,8	C-10, C-1'
4	CH_2	H _a : 2,48 (1H, <i>dd</i> , 3,0, 16,2) H _b : 2,68 (1H, <i>dd</i> , 4,8, 16,2)	28,1	C-2, C-3, C-5, C-6, C-8, C-9, C-10
5	C		156,5	
6	CH	5,71 (1H, <i>d</i> , 2,4)	94,1	C-5, C-7, C-8, C-10
7	C		155,7	
8	CH	5,89 (1H, <i>d</i> , 2,4)	95,1	C-6, C-7, C-9, C-10
9	C		156,2	
10	C		98,4	
1'	C		129,9	
2', 6'	CH	6,71 (2H, <i>dd</i> , 1,8, 6,6)	114,4	C-2, C-1', C-3', C-5', C-4'
3', 5'	CH	7,21 (2H, <i>dd</i> , 1,8, 7,2)	128,2	C-2, C-2', C-6', C-4'
4'	C		156,5	

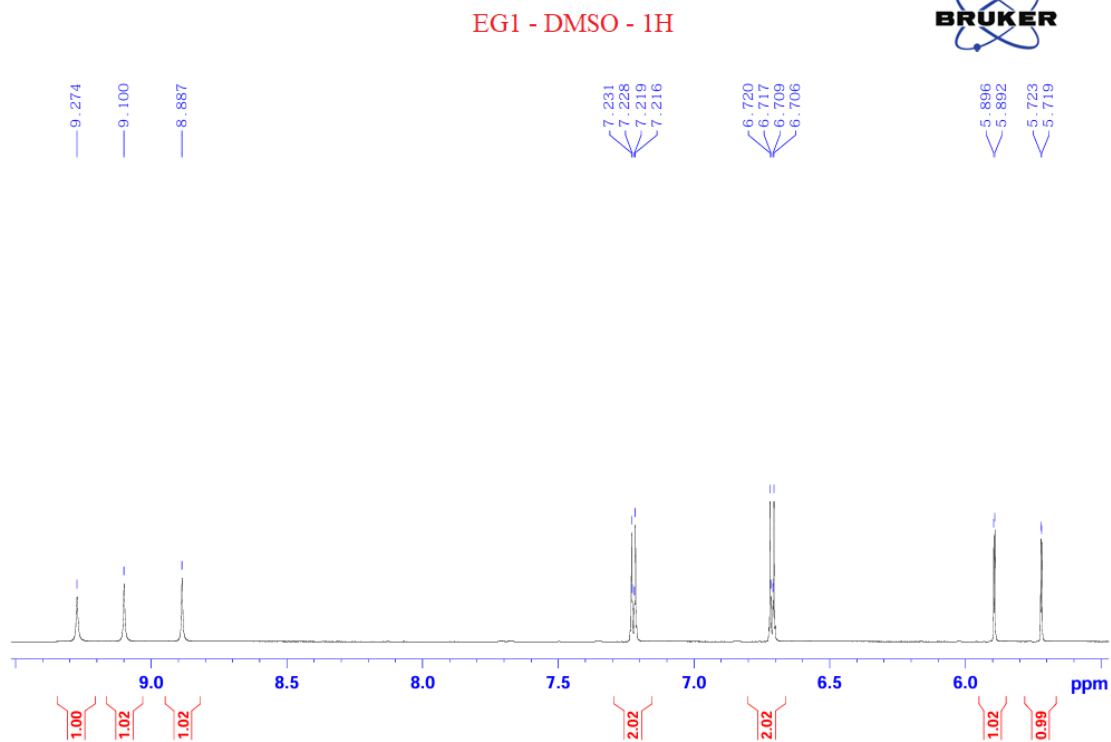
[TLTK] Wan, S.B., Chan, T.H. (2004), "Enantioselective synthesis of afzelechin and epiafzelechin", *Tetrahedron*, 60(37), pp. 8207-8211.

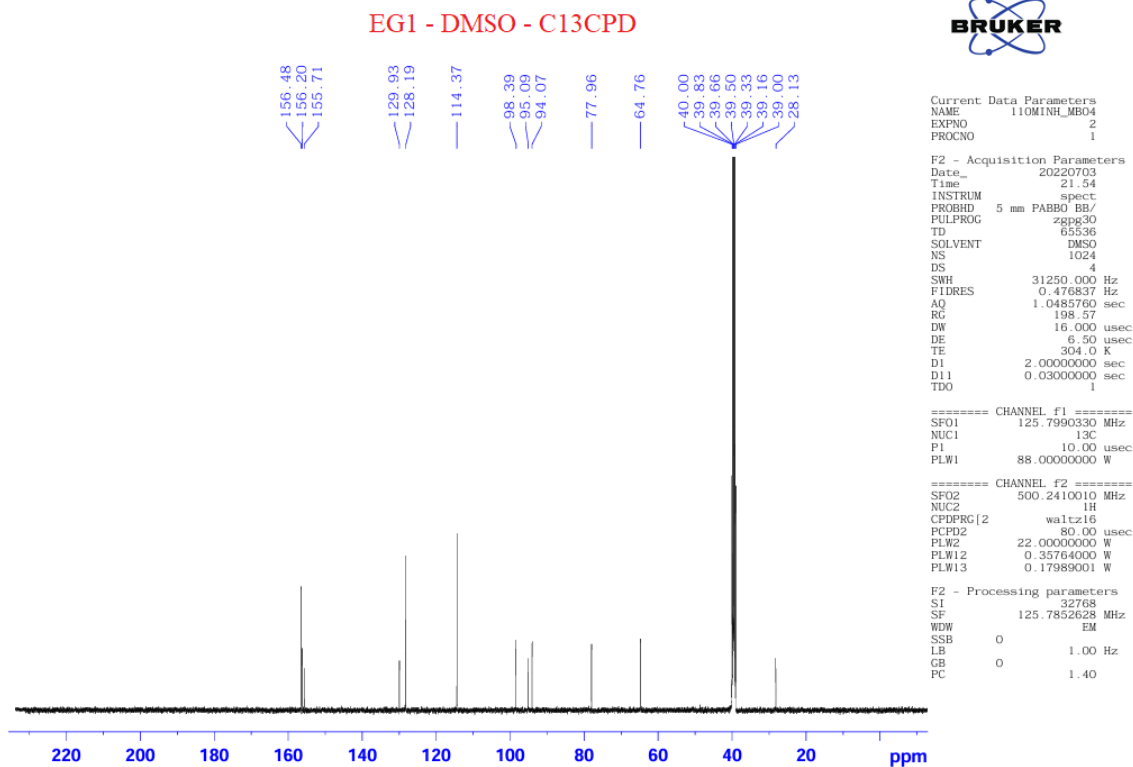
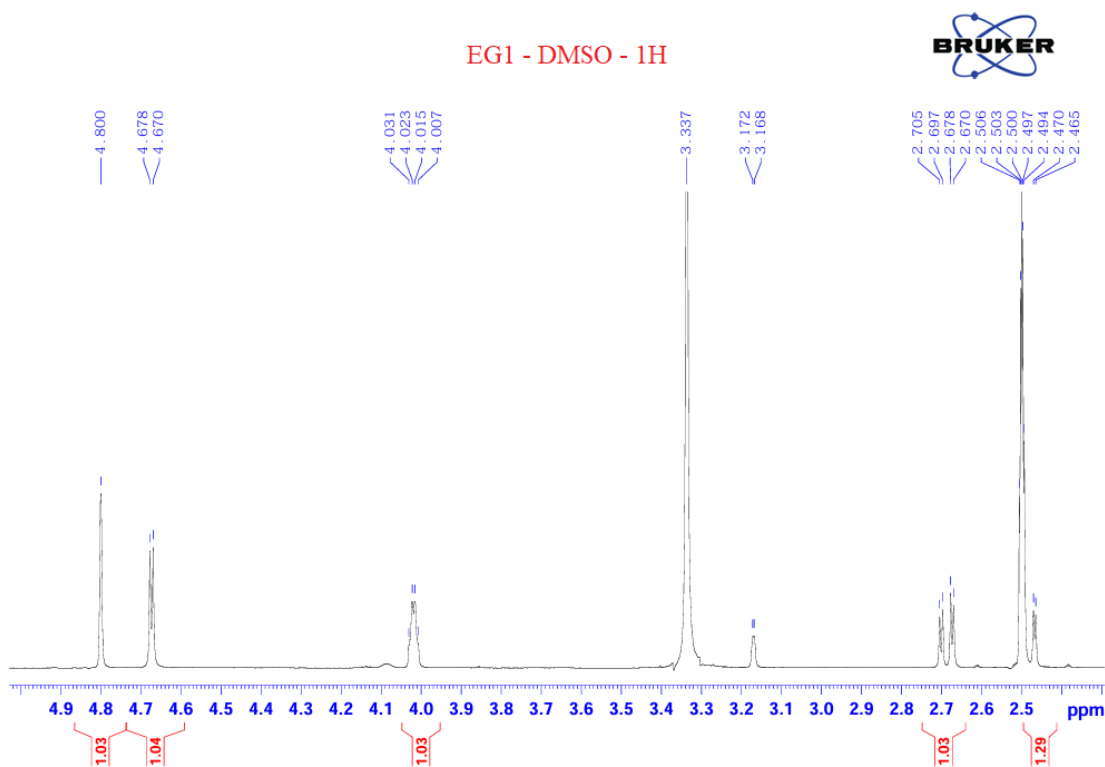


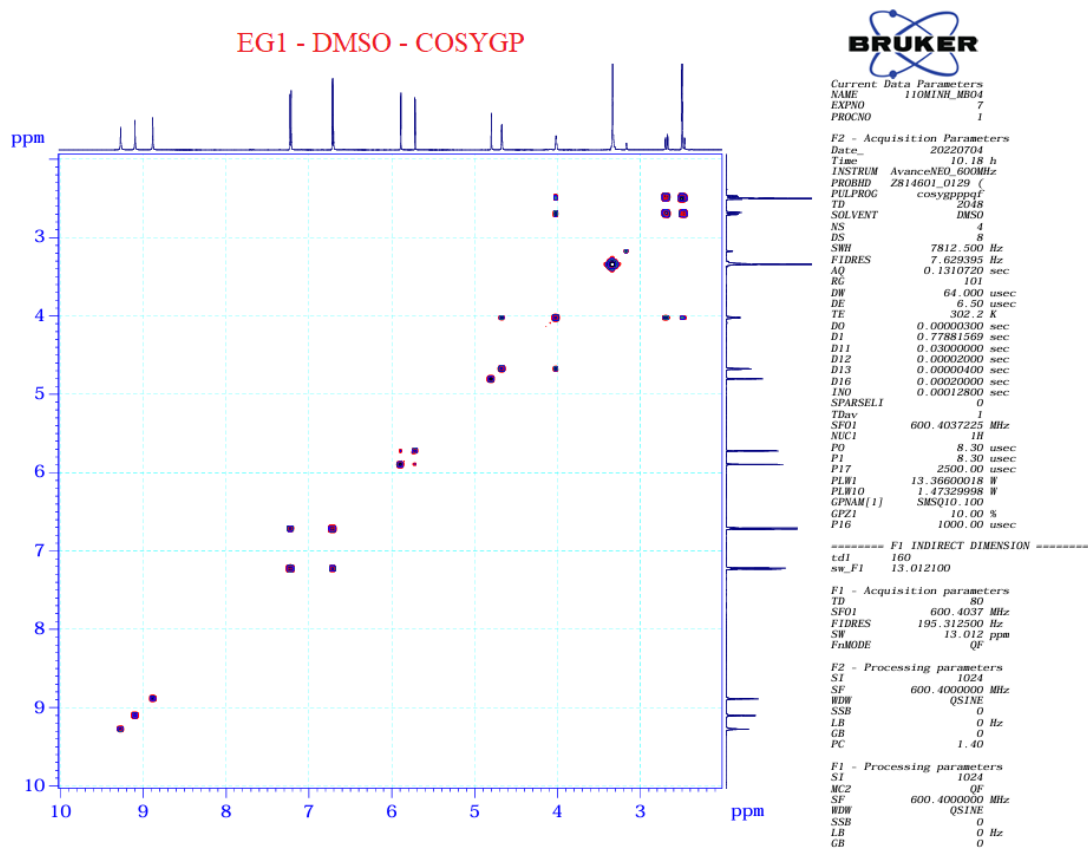
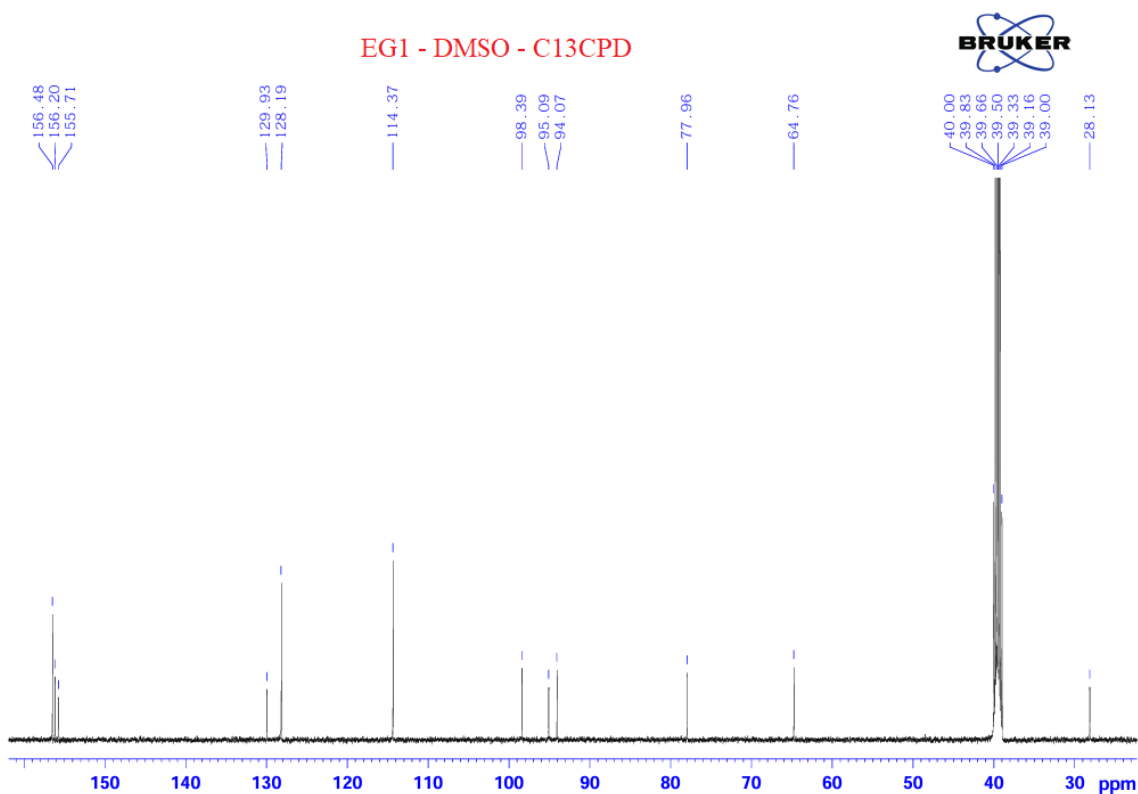
Current Data Parameters
 NAME 110M1NH_MB04
 EXPNO 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20220703
 Time 16.30 h
 INSTRUM AvanceNEO_600MHz
 PROBHD Z814601_0129 (C
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 2
 SWH 11904.762 Hz
 FIDRES 0.363304 Hz
 AQ 2.7525120 sec
 RG 101
 DW 42.000 usec
 DE 9.08 usec
 TE 301.4 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1
 SFO1 600.4037075 MHz
 NUC1 1H
 PO 2.77 usec
 P1 8.30 usec
 PLW1 13.36600018 W

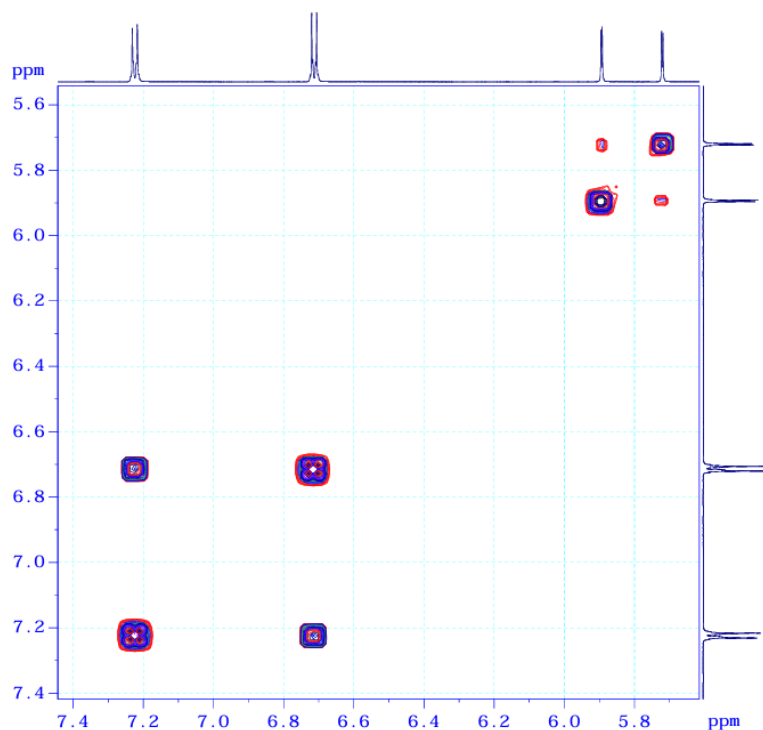
F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 600.4000045 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00







EG1 - DMSO - COSYGP



Current Data Parameters
NAME 110MINR_MB04
EXPNO 7
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220704
Time 10.18 h
INSTRUM AvanceNEO_600MHz
PROBHD Z814601_0129 (cosyppp4f)
PULPROG TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 4
DS 8
SWH 7812.500 Hz
FIDRES 7.629395 Hz
AQ 0.1310720 sec
RG 101
DW 64.000 usec
DE 6.50 usec
TE 302.2 K
D0 0.00000300 sec
D1 0.77881569 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00020000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
LNO 0.00012800 sec
SPARSELI 0
TDav 1
SF01 600.4037225 MHz
NUC1 1H
P0 8.30 usec
P1 8.30 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 13.36600018 W
PLW10 1.47325988 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GFZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

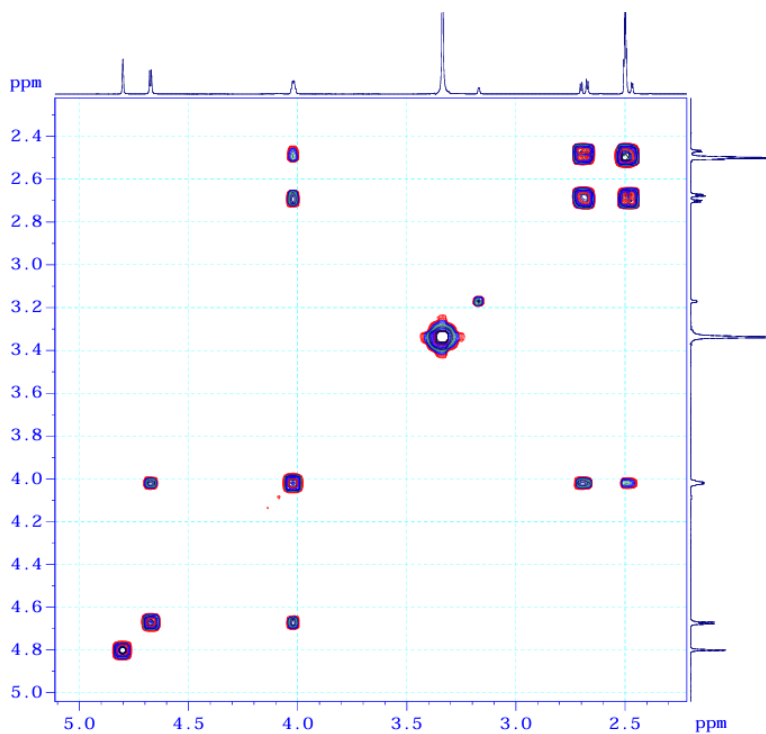
----- F1 INDIRECT DIMENSION -----
td1 160
sw_F1 13.012100

F1 - Acquisition parameters
TD 80
SF01 600.4037 MHz
FIDRES 195.312500 Hz
SW 13.012 ppm
F0MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 600.4000000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 600.4000000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

EG1 - DMSO - COSYGP



Current Data Parameters
NAME 110MINR_MB04
EXPNO 7
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20220704
Time 10.18 h
INSTRUM AvanceNEO_600MHz
PROBHD Z814601_0129 (cosyppp4f)
PULPROG TD 2048
SOLVENT DMSO
NS 4
DS 8
SWH 7812.500 Hz
FIDRES 7.629395 Hz
AQ 0.1310720 sec
RG 101
DW 64.000 usec
DE 6.50 usec
TE 302.2 K
D0 0.00000300 sec
D1 0.77881569 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00020000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
LNO 0.00012800 sec
SPARSELI 0
TDav 1
SF01 600.4037225 MHz
NUC1 1H
P0 8.30 usec
P1 8.30 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 13.36600018 W
PLW10 1.47325988 W
GPNAM[1] SMSQ10.100
GFZ1 10.00 %
P16 1000.00 usec

----- F1 INDIRECT DIMENSION -----
td1 160
sw_F1 13.012100

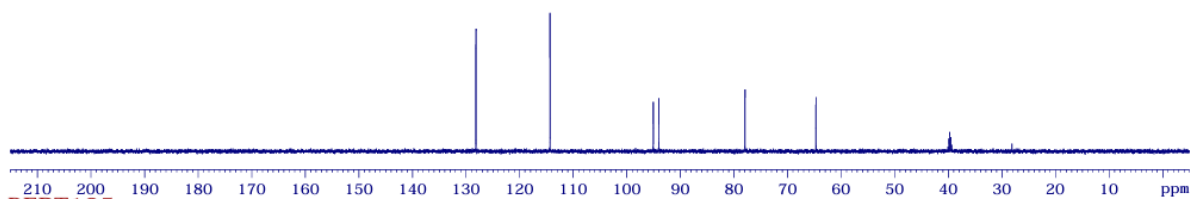
F1 - Acquisition parameters
TD 80
SF01 600.4037 MHz
FIDRES 195.312500 Hz
SW 13.012 ppm
F0MODE QF

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 600.4000000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.40

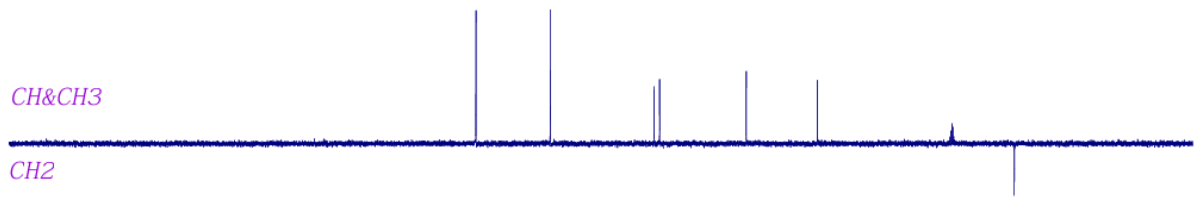
F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 QF
SF 600.4000000 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0

EG1 - DMSO - C13CPD&DEPT

DEPT90



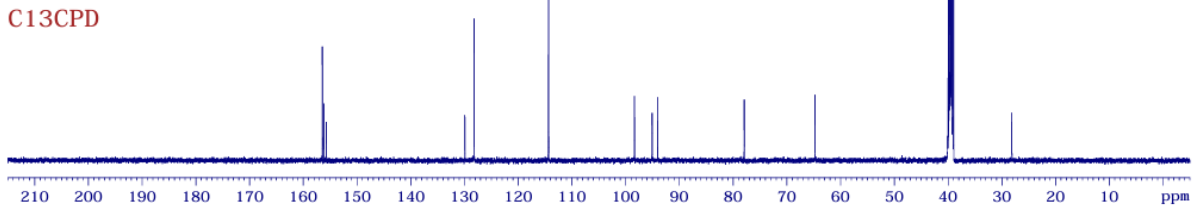
DEPT135



CH&CH3

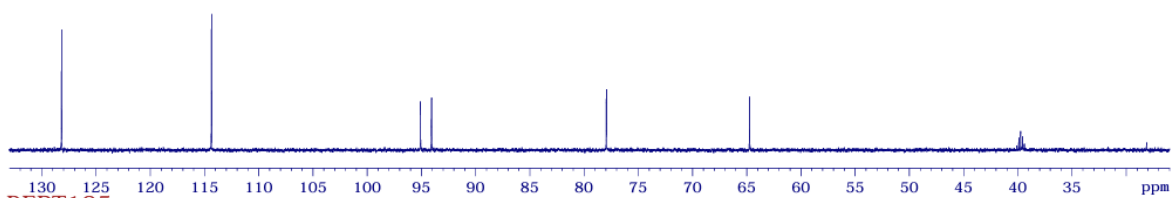
CH2

C13CPD

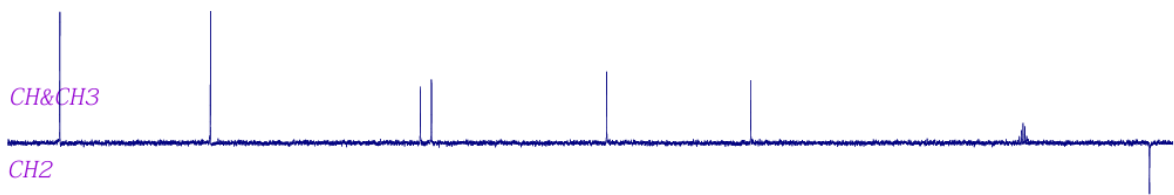


EG1 - DMSO - C13CPD&DEPT

DEPT90



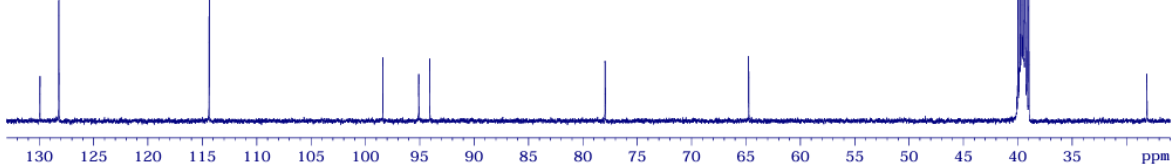
DEPT135



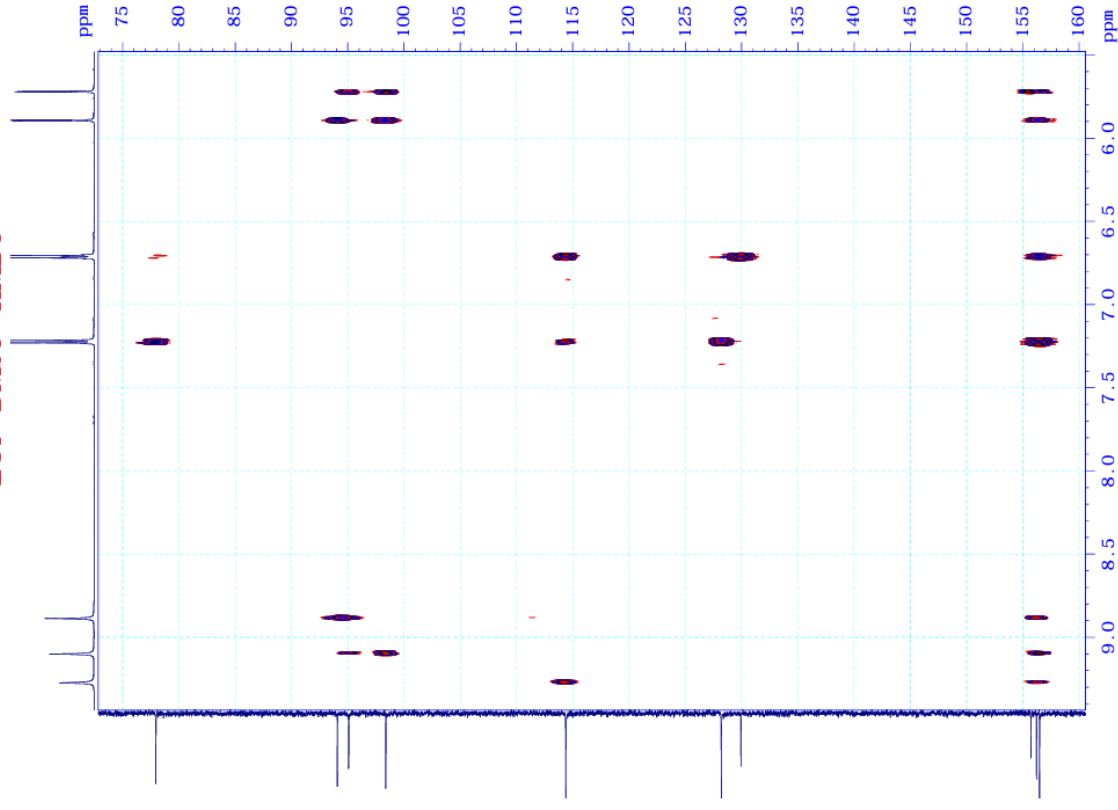
CH&CH3

CH2

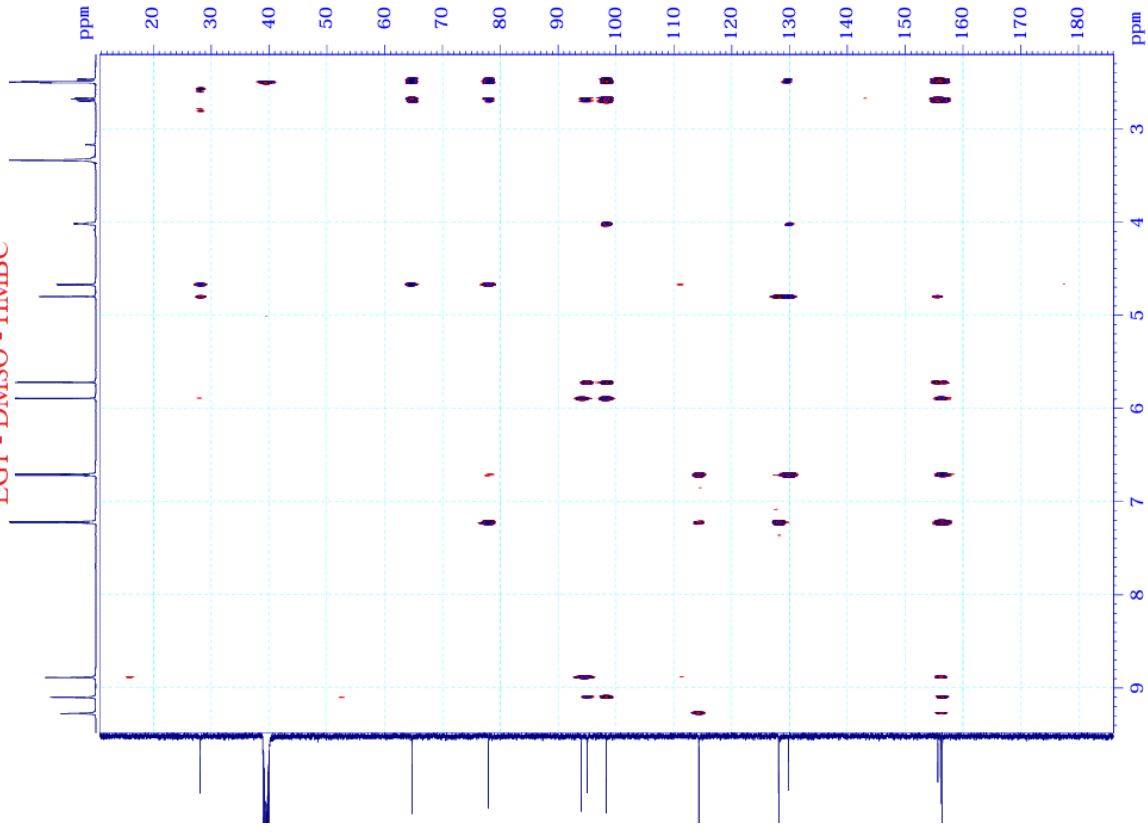
C13CPD

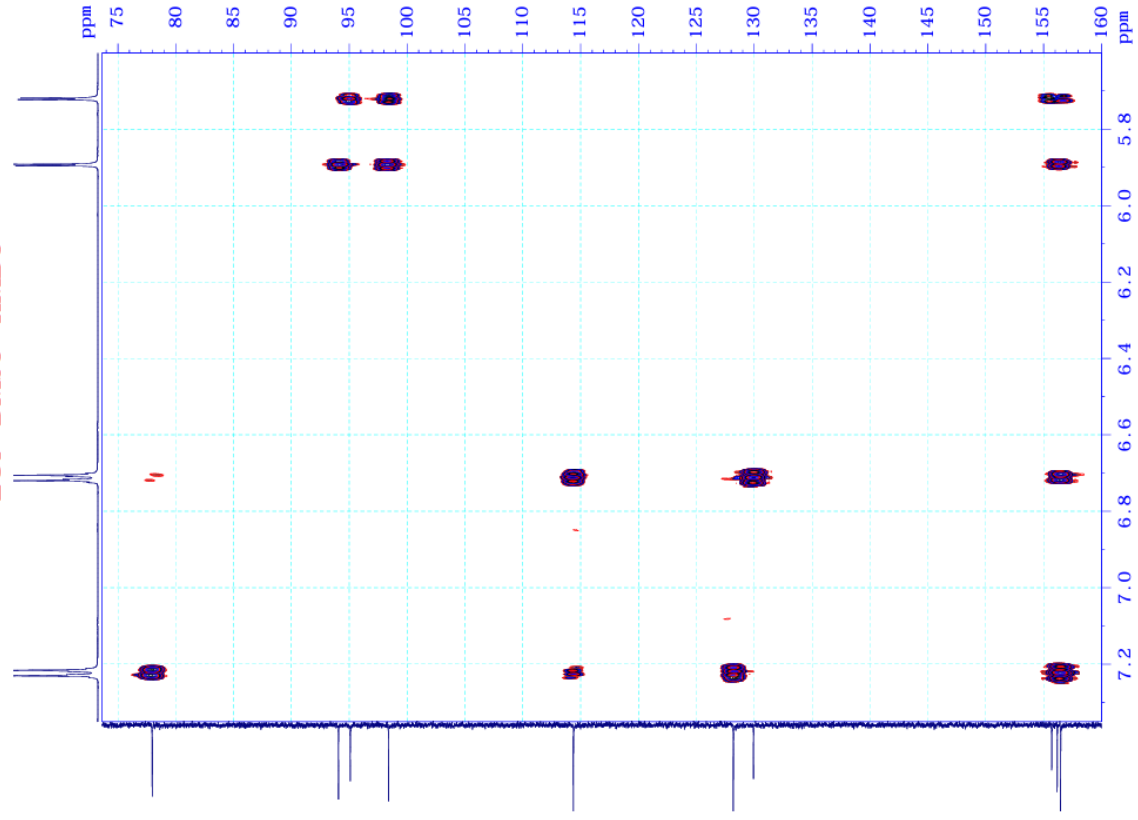
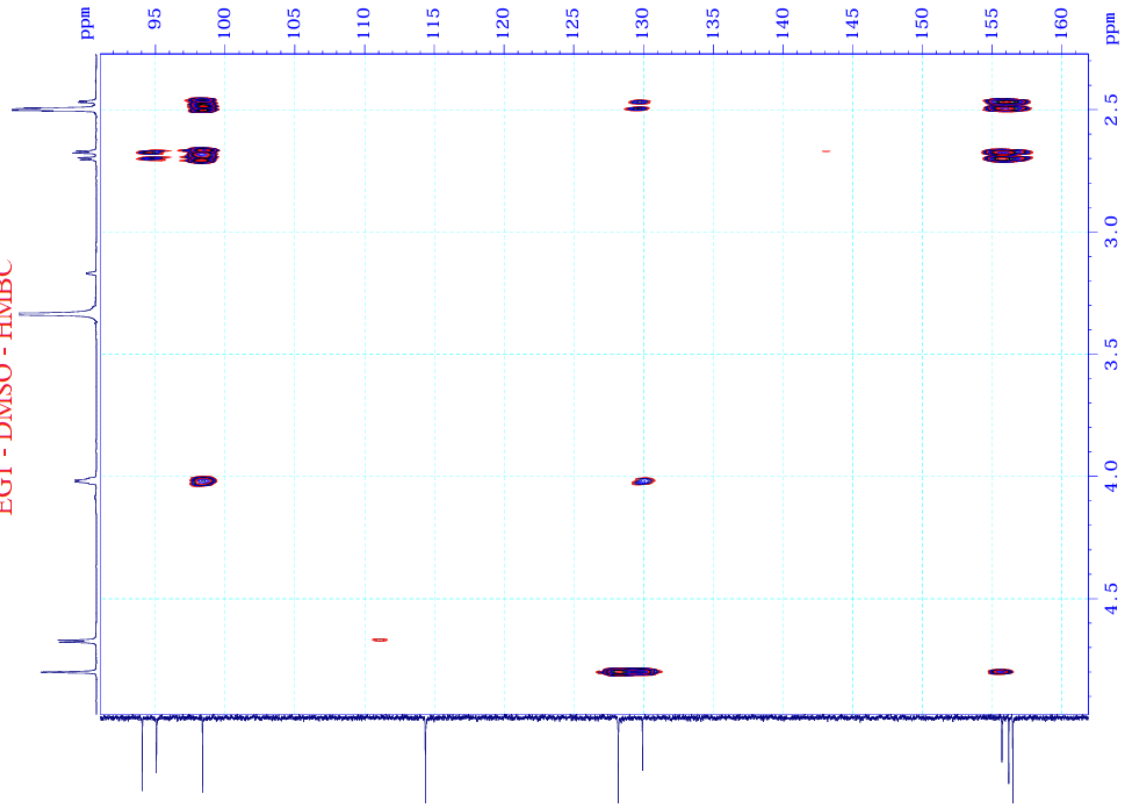


EG1 - DMSO - HMBC

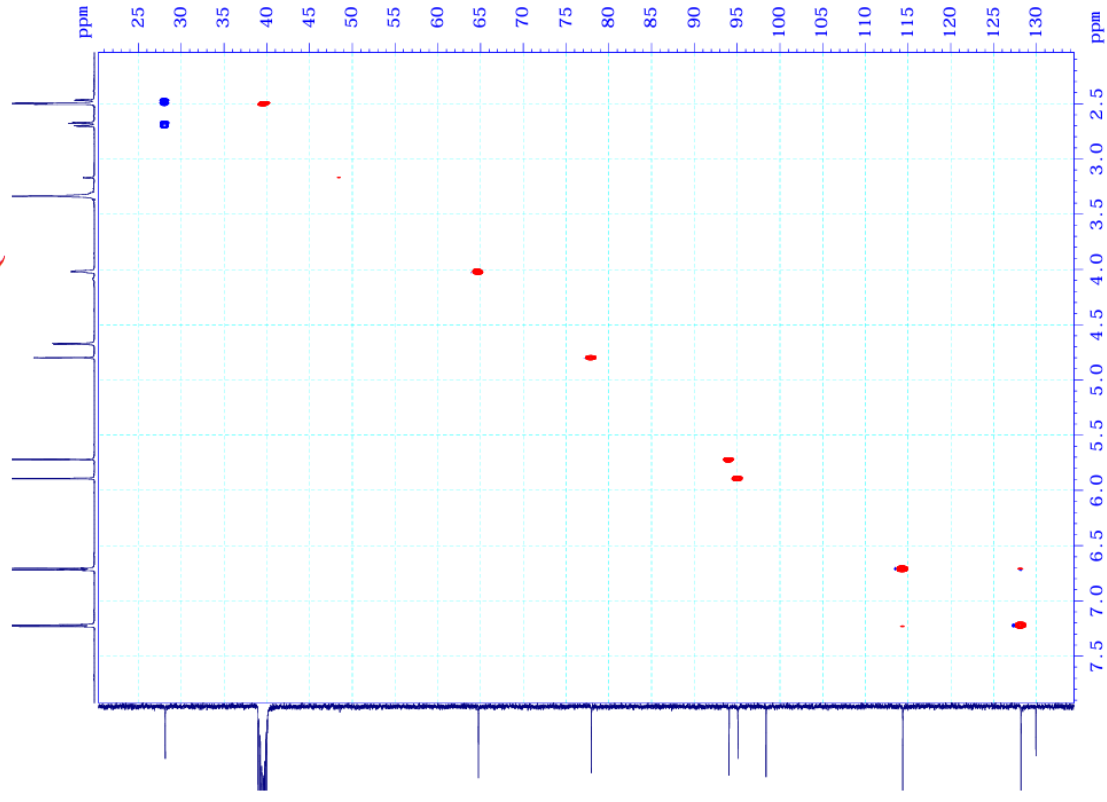


EG1 - DMSO - HMBC

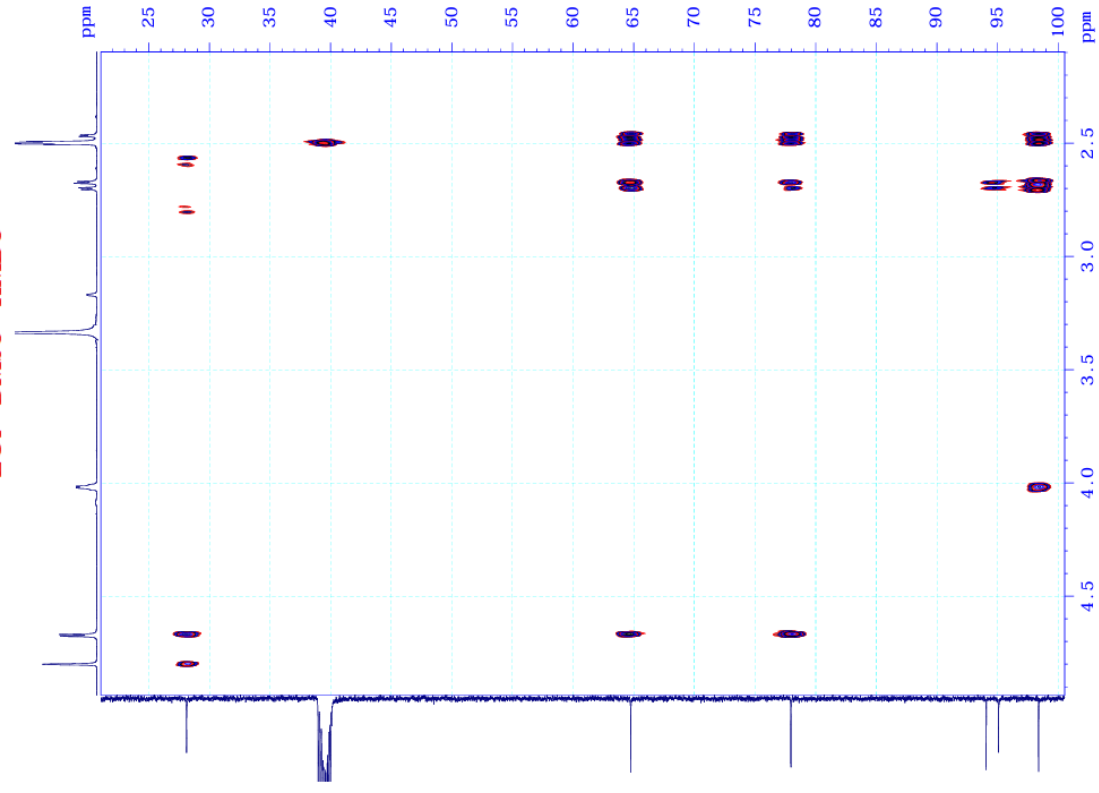




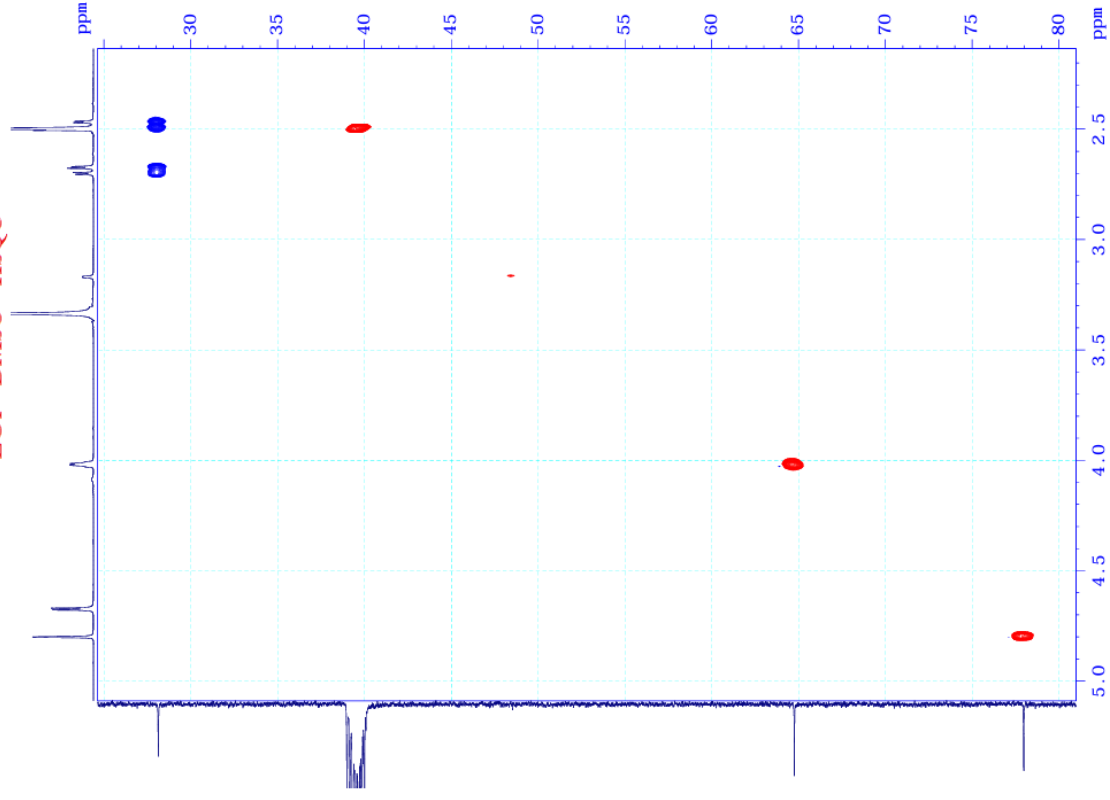
EG1 - DMSO - HSQC



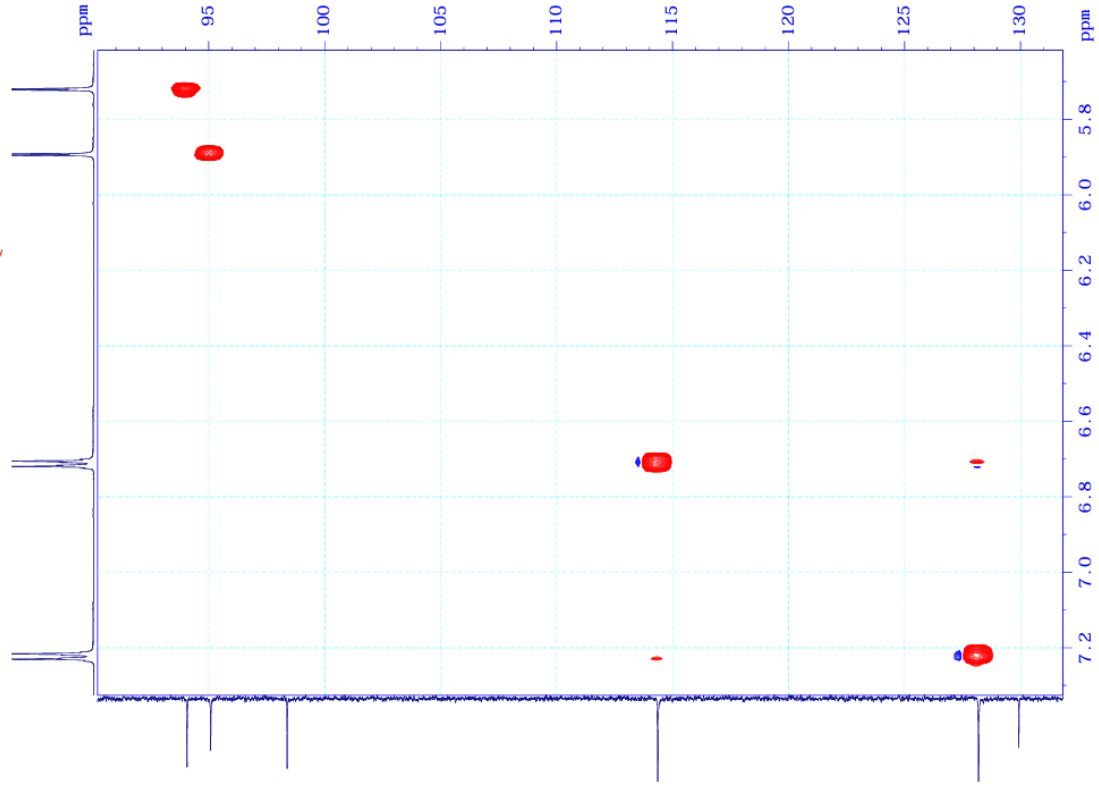
EG1 - DMSO - HMBC



EG1 - DMSO - HSQC



EG1 - DMSO - HSQC



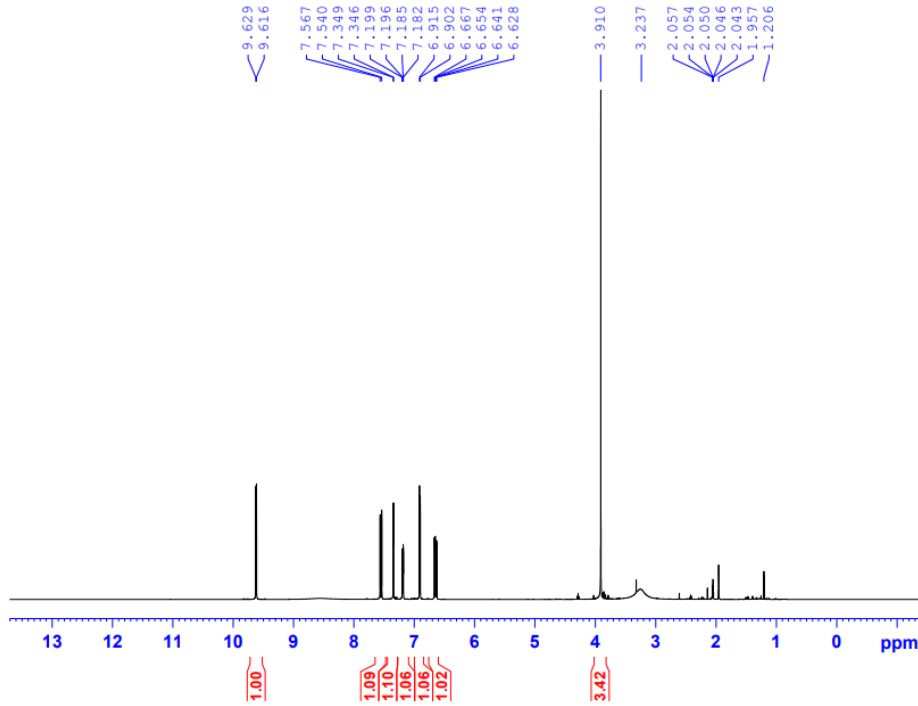
PHỤ LỤC 5.2. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT EG2

Bảng 5.2. Dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất EG2 so với coniferaldehyd

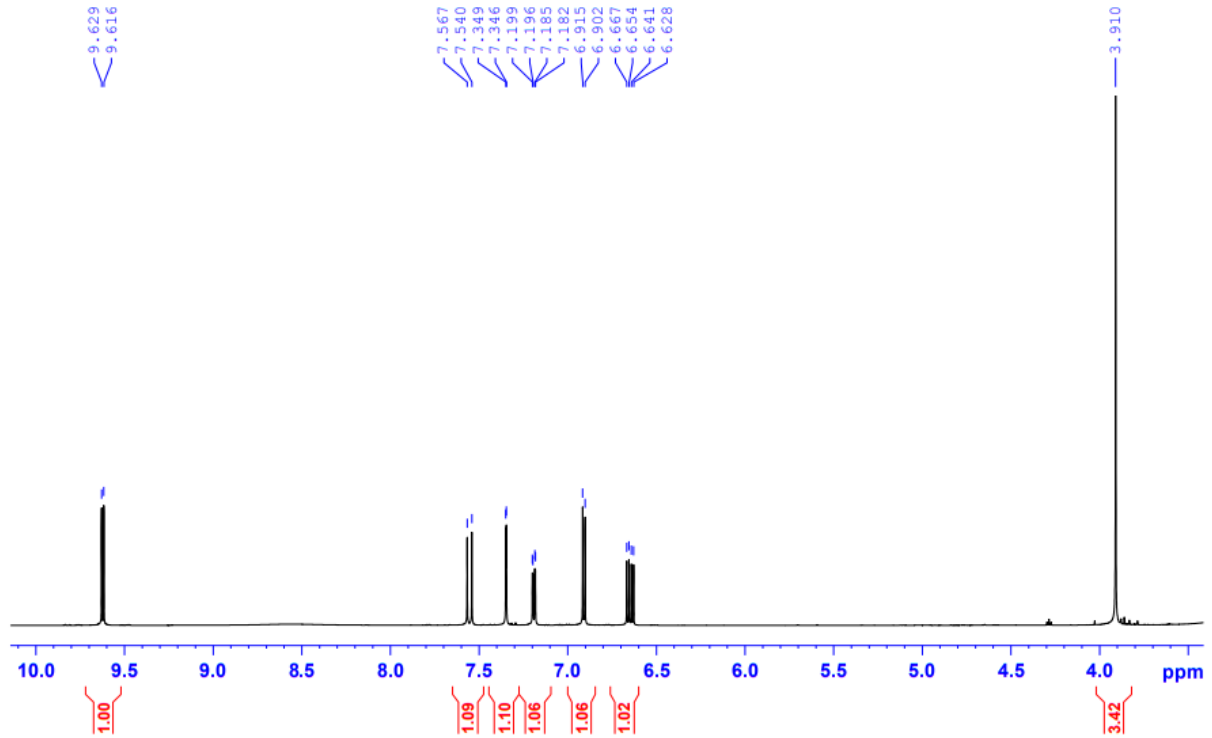
Vị trí C/H	EG2 (acetone-d ₆)		Coniferaldehyd [TLTK] (acetone-d ₆ s)	
	^1H -NMR (δ_{H} ppm) (No. H, mult., J Hz)	^{13}C - NMR (δ_{C} ppm)	^1H -NMR (δ_{H} ppm) (No. H, mult., J Hz)	^{13}C - NMR (δ_{C} ppm)
1		148,9		148,97
2		150,9		146,98
3	6,91 (1H, d, J=6,5 Hz)	116,2	6,96 (1H, d, J=8,24 Hz)	114,94
4	7,19 (1H, dd, J=1,5; 7,0 Hz)	124,7	7,12 (1H, dd, J=2,14; 8,24 Hz)	124,01
5		127,3		126,54
6	7,35 (1H, d, J=2,5 Hz)	111,6	7,07 (1H, d, J=2,14 Hz)	109,52
7	7,56 (1H, d, J=13,5 Hz)	154,2	7,71 (1H, d, J=15,87 Hz)	153,24
8	6,65 (1H, dd, J=1,5; 13,0 Hz)	126,8	6,60 (1H, dd, J=7,62; 15,87 Hz)	126,26
9	9,63 (1H, d, J=6,5 Hz)	194,1	9,64 (1H, d, J=7,62 Hz)	193,69
1-OH	5,37 (H, s)		5,98 (H, s)	
2-OCH ₃	3,91 (3H, s)	56,3	3,94 (3H, s)	55,93

[TLTK]: Sy, L.K., Brown, G.D. (1999), "Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*", *Phytochemistry*, 50(5), pp. 781-785.

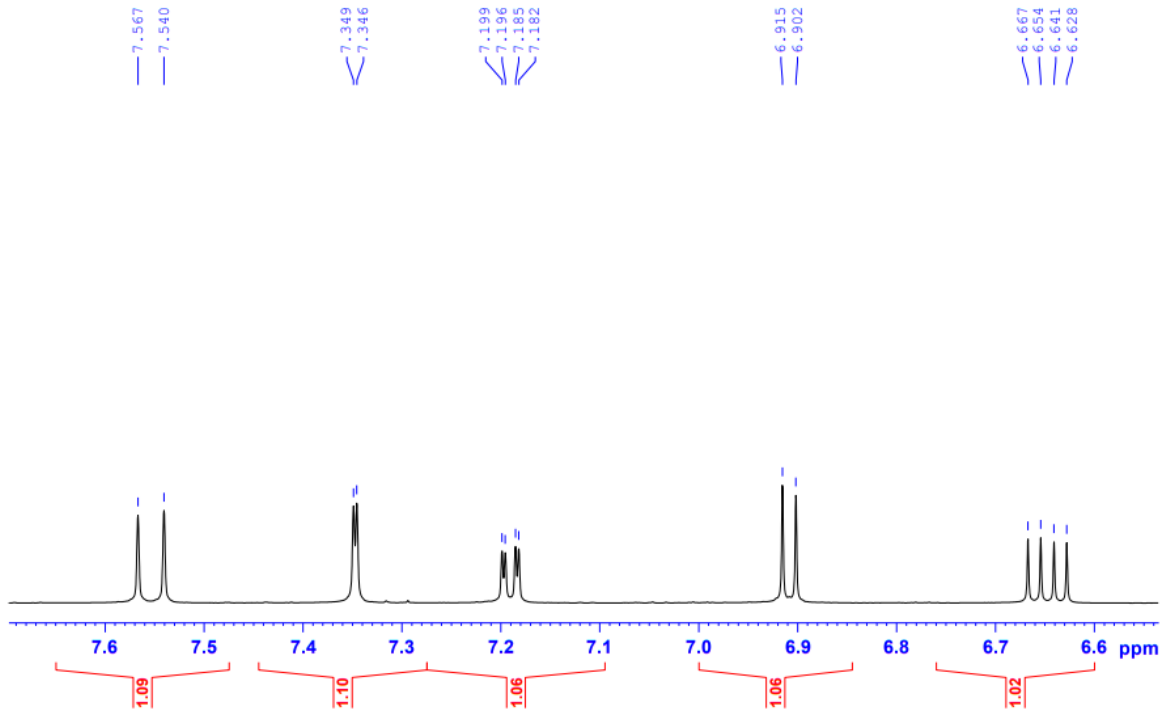
PHỤ LỤC 4-EG2-Acetone-1H



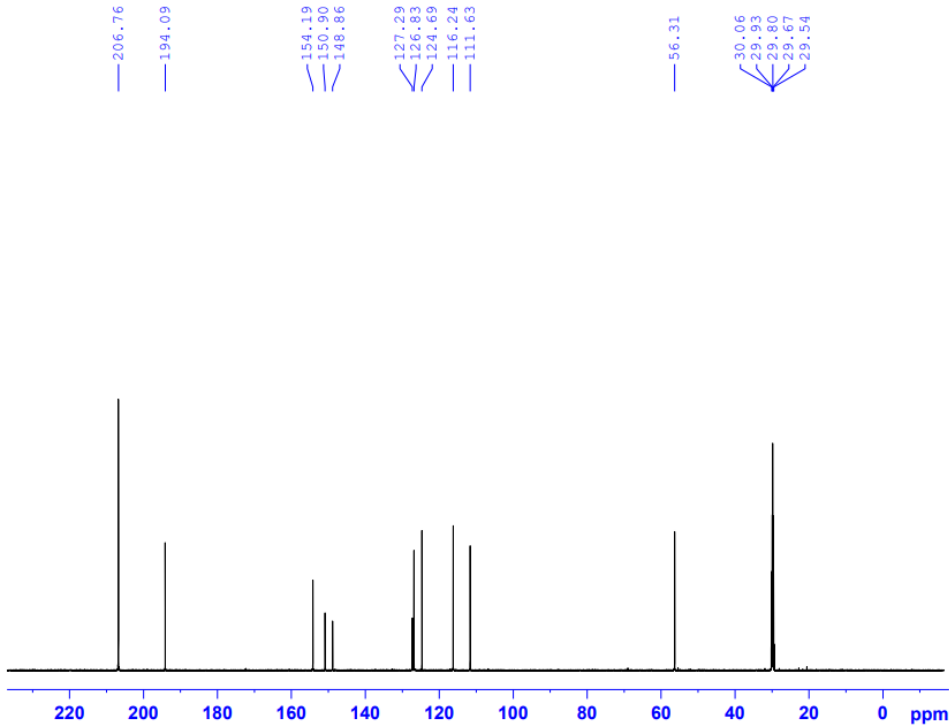
PHỤ LỤC 4-EG2-Acetone-1H



PHỤ LỤC 4-EG2-Acetone-1H



PHỤ LỤC 5-EG2-Acetone-C13CPD

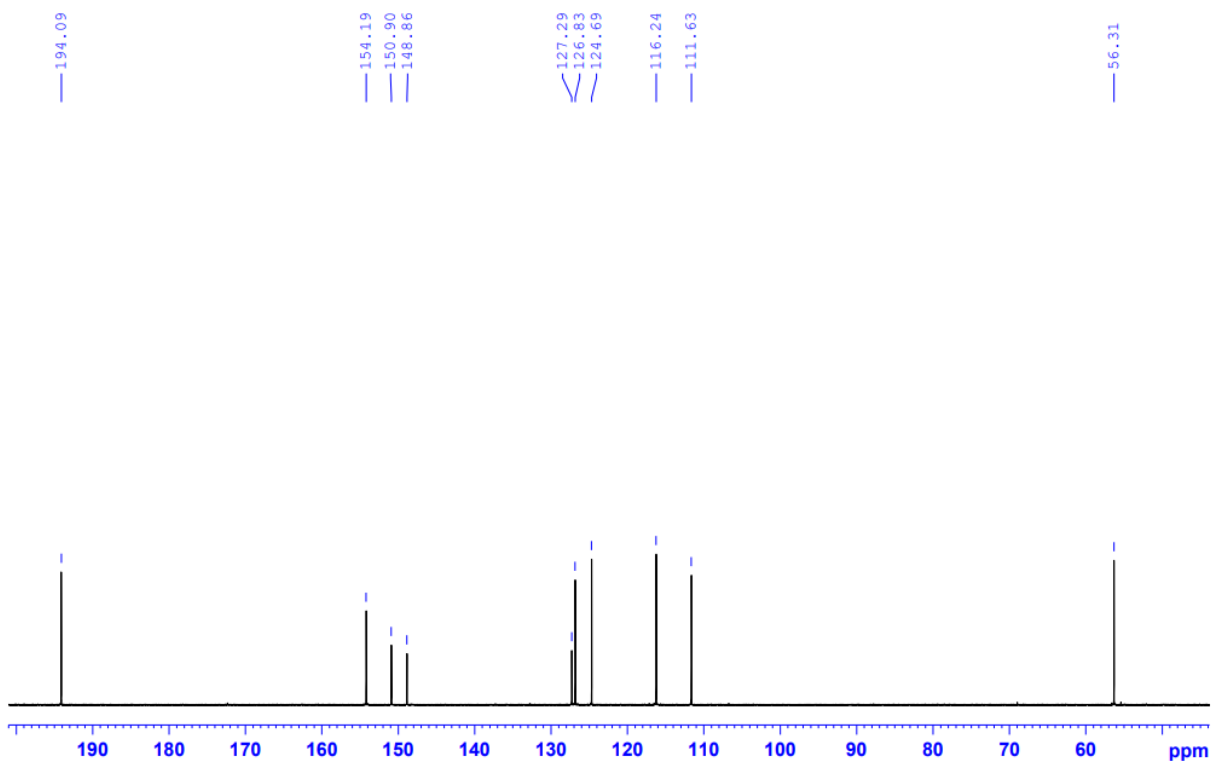


Current Data Parameters
NAME 13TH_AQ1118
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date 20210608
Time 14.35 h
INSTRUM AvanceNEO 600MHz
PROBHD Z114607_0862 (1
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 128
DS 4
SWH 38461.539 Hz
FIDRES 1.173753 Hz
AQ 0.8519680 sec
RG 101
DW 13.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
SFO1 150.9772477 MHz
NUC1 13C
PC 4.00 usec
P1 12.00 usec
PLW1 86.32800293 W
SFO2 600.3624014 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz65
PCPD2 70.00 usec
PLW2 27.03700066 W
PLW12 0.55177999 W
PLW13 0.27754000 W

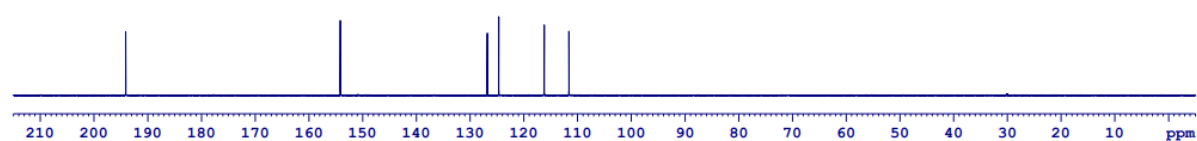
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 150.9605229 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

PHỤ LỤC 5-EG2-Acetone-C13CPD



PHỤ LỤC 6-EG2-Acetone-C13CPD&DEPT

DEPT90

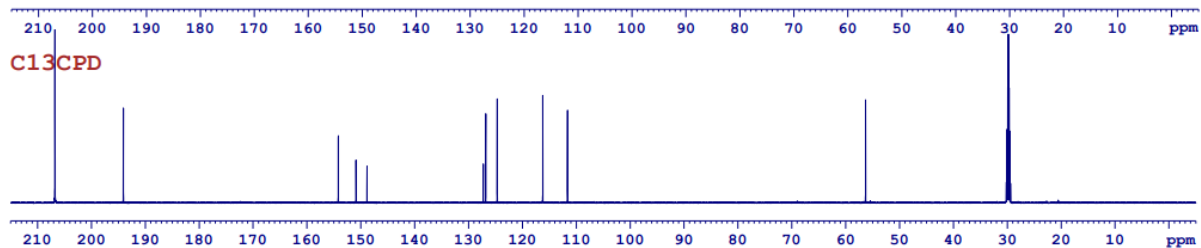


DEPT135



CH&CH3

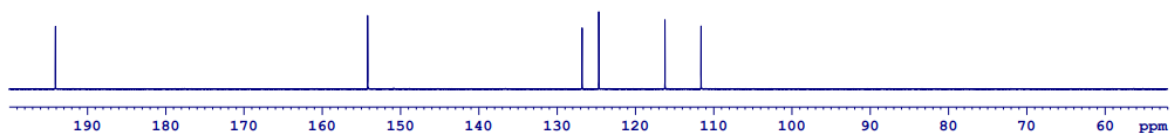
CH2



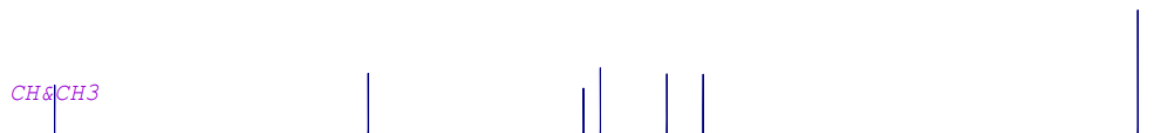
C13CPD

PHỤ LỤC 6-EG2-Acetone-C13CPD&DEPT

DEPT90

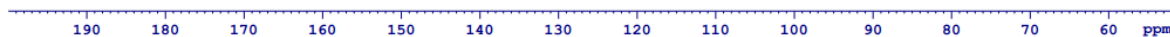


DEPT135

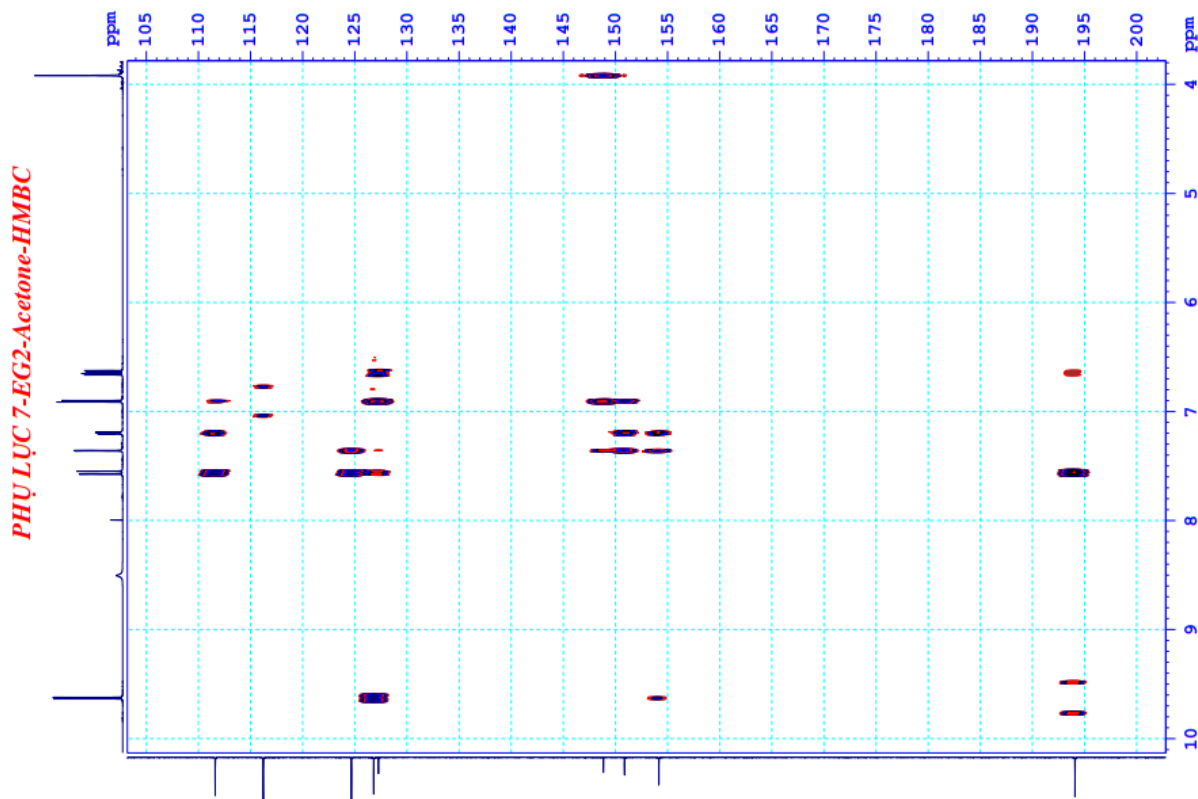


CH&CH3

CH2

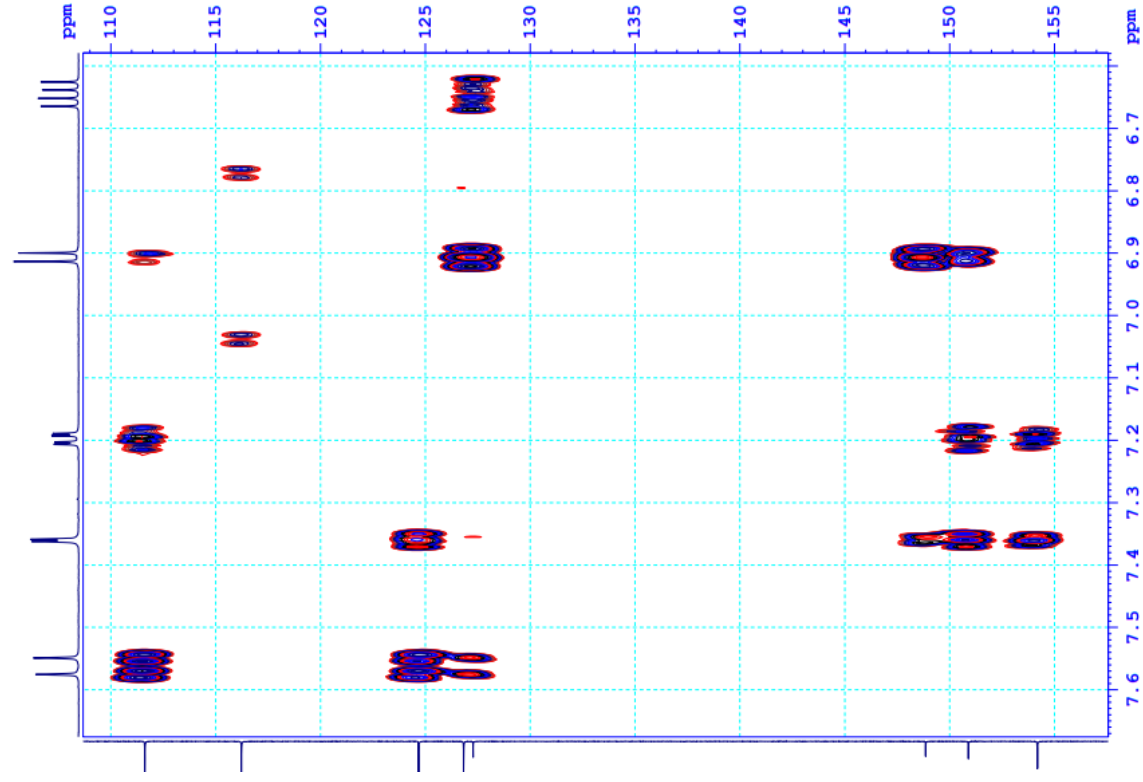


C13CPD

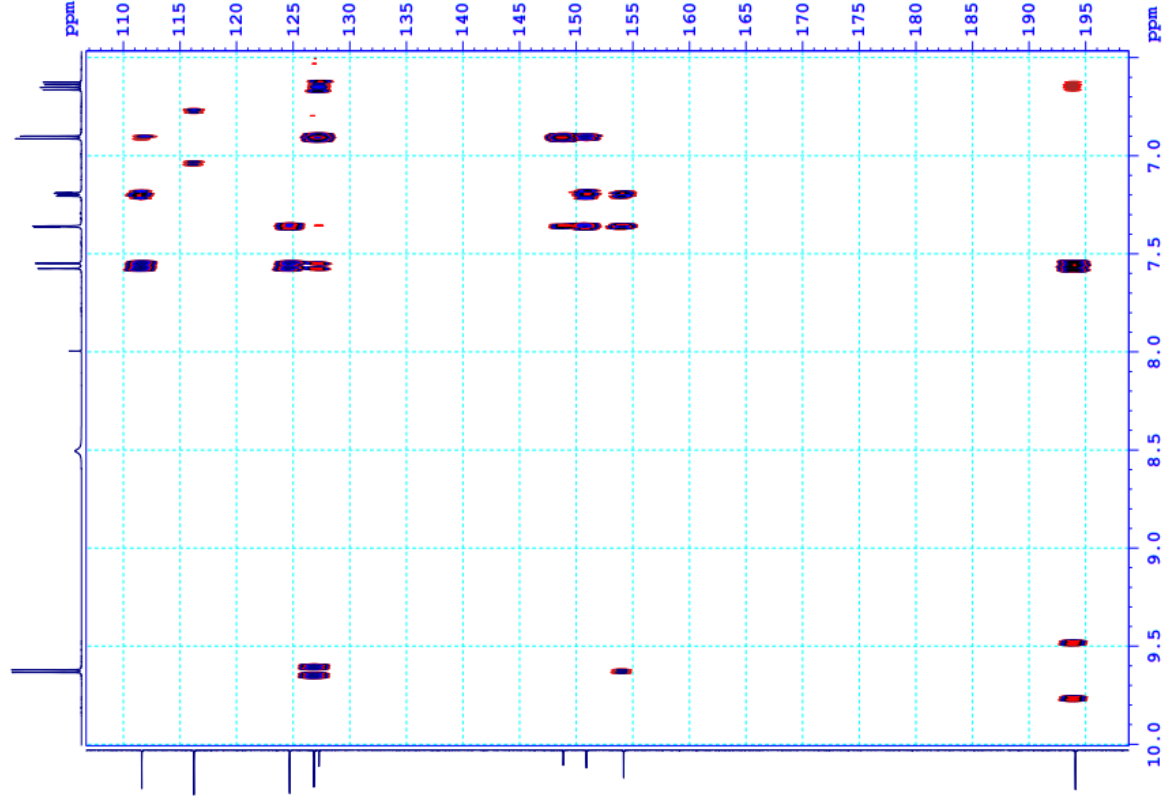


PHỤ LỤC 7-EG2-Acetone-HMBC

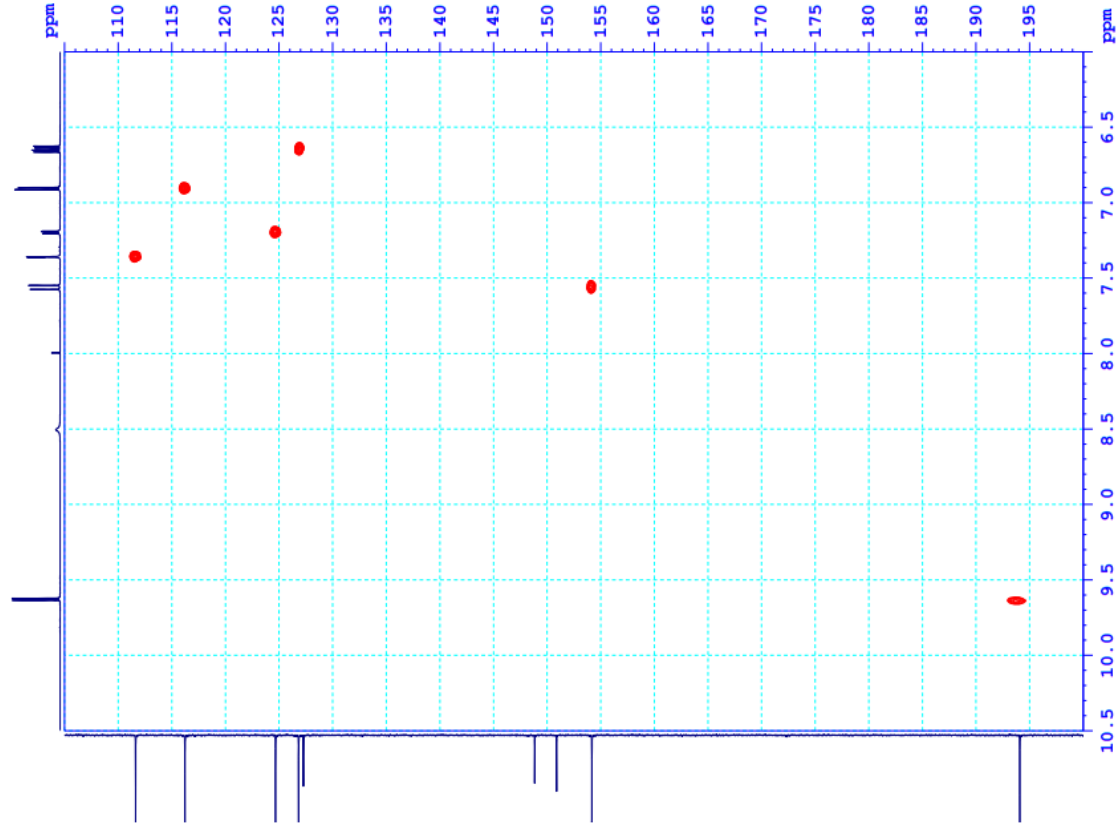
PHỤ LỤC 7-EG2-Acetone-HMBC



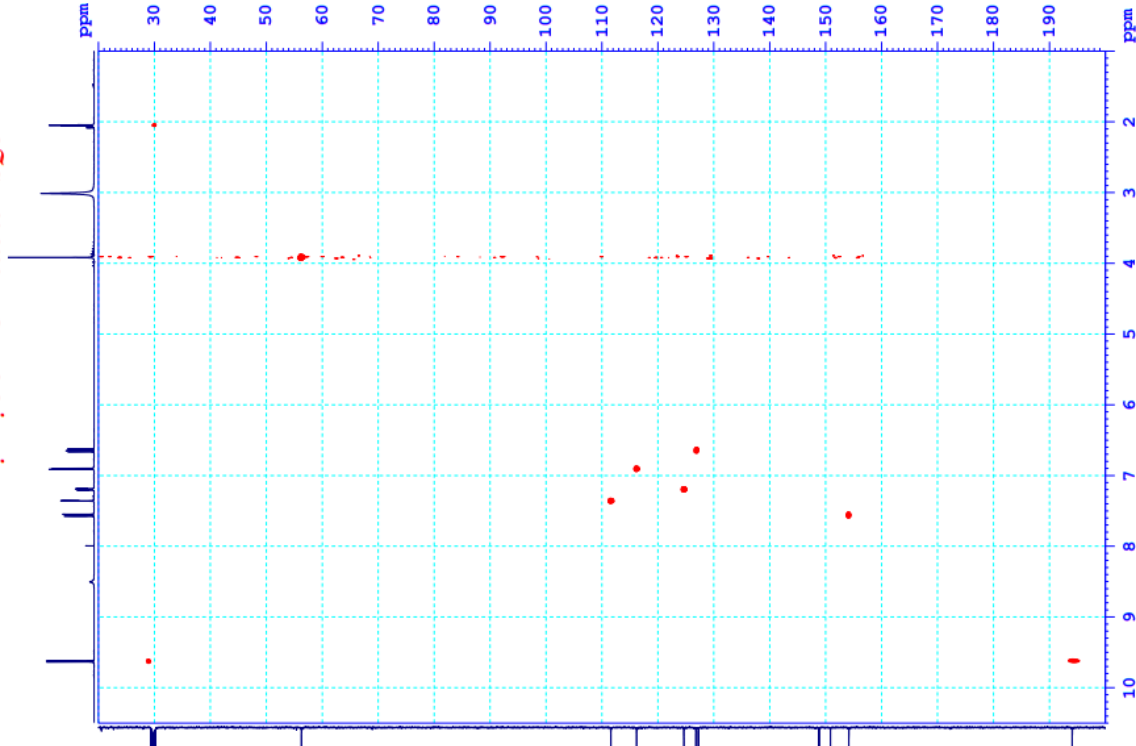
PHỤ LỤC 7-EG2-Acetone-HMBC



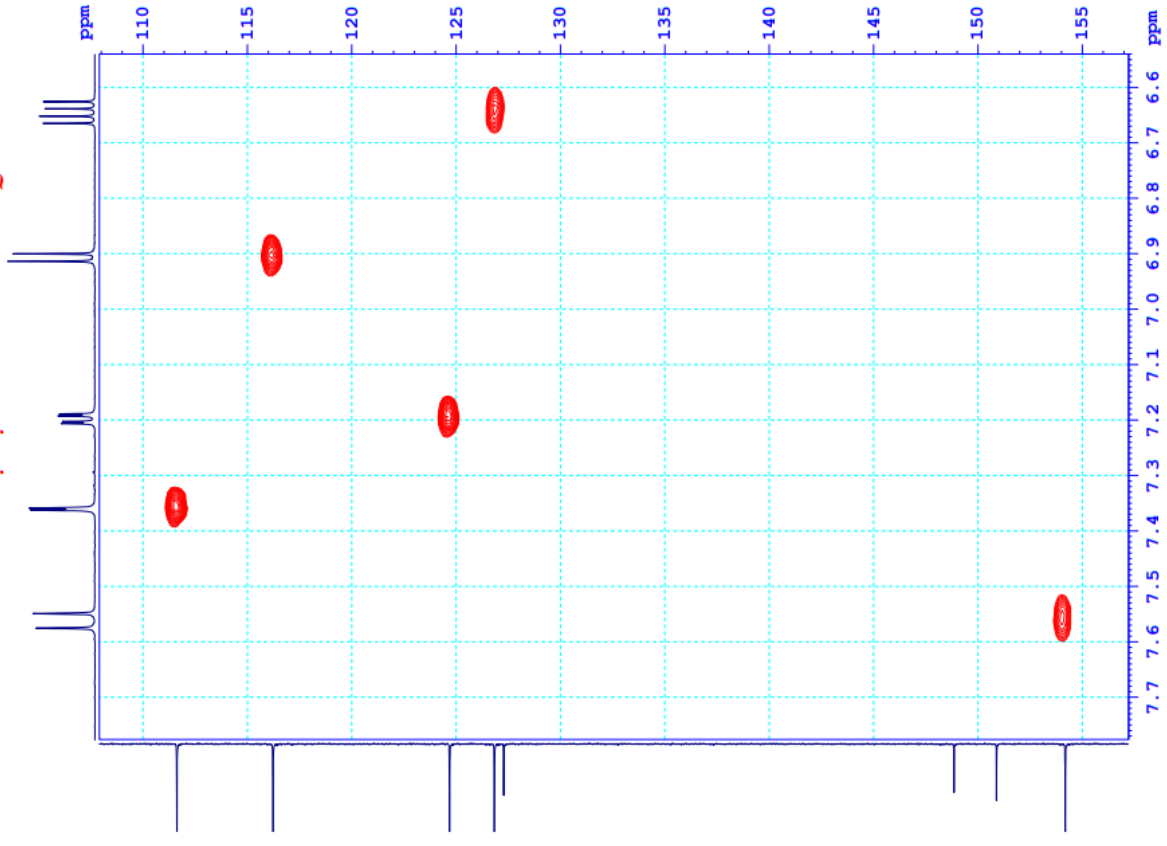
PHỤ LỤC 8-EG2-Acetone-HSQC



PHỤ LỤC 8 - EG2-Acetone-HSQC



PHỤ LỤC 8-EG2-Acetone-HSQC



PHỤ LỤC 6. ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ HẠT CHUỐI CỎ ĐƠN BẰNG THỬ NGHIỆM ĐỘC TÍNH CẤP ĐƯỜNG UỐNG

Phương pháp:

Nguyên tắc: Nghiên cứu độc tính cấp của mẫu thử trên động vật thí nghiệm chủ yếu là để xác định liều chết trung bình (LD_{50}), tức là liều làm chết 50% số con vật thử nghiệm trong điều kiện nhất định.

Tiến hành: Chuột được cho nhịn đói 12 giờ (nước uống đầy đủ) trước khi tiến hành thử nghiệm. Tiến hành thăm dò độc tính của cao chiết trên 3 chuột/giới, chuột được cho uống cao chiết ở nồng độ tối đa cao chiết có thể qua kim (liều 0,5 ml/10 g thể trọng). Theo dõi và ghi nhận tình trạng chuột bình thường hay các triệu chứng quan trọng ở chuột không chết hoặc trước khi chết (gãi mõm liên tục, chạy hoảng loạn, ngã xiêu vẹo, co giật, run rẩy, tím tái ở các bộ phận cơ thể, tư thế nằm, đứng...) và số chuột tử vong trong vòng 72 giờ. Từ kết quả thăm dò, thử nghiệm xác định được thực hiện tương tự với số chuột lớn hơn (10 chuột/giới). Có 3 trường hợp có thể xảy ra:

Trường hợp 1: Nếu số chuột thử nghiệm vẫn bảo toàn, xác định liều cao nhất có thể qua kim mà không làm chết chuột (D_{max}) và liều tương đối an toàn D_s dùng trong các thực nghiệm được lý có thể bằng $1/5D_{max}$ hoặc lớn hơn $1/5D_{max}$.

Trường hợp 2: Nếu tỷ lệ tử vong là 100% thì tiếp tục giảm liều để xác định liều tối thiểu gây chết 100% chuột thử nghiệm (LD_{100}) và liều tối đa không gây chết chuột (LD_0). Từ đó, liều LD_{50} được tính theo công thức Behrens - Karber.

Trường hợp 3: Nếu tỷ lệ tử vong thấp hơn 100% thì không xác định được liều gây chết tuyệt đối. Đối với trường hợp này, không thể suy ra liều LD_{50} , nhưng có thể xác định được liều tối đa không gây chết chuột (LD_0). Liều tương đối an toàn D_s dùng cho thực nghiệm được lý có giá trị bằng $1/5$ hoặc $1/10 LD_0$.

[TLTK] Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 15-28, 59-67, 184-189.

Kết quả:

Sau khi cho chuột uống cao chiết ethanol với liều tối đa có thể bơm qua kim là 19,84 g/kg, tất cả chuột đều khỏe mạnh, ăn thức ăn viên, uống nước, tiêu tiểu, vận động bình thường và không có chuột nào tử vong trong thời gian 72 giờ quan sát. Do đó, không xác định được liều LD₅₀ của cao chiết ethanol trong thử nghiệm này.

Như vậy, cao chiết ethanol không thể hiện độc tính cấp đường uống trên chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* ở cả hai giới với liều D_{max} là 19,84 g/kg.

**PHỤ LỤC 7. GIẤY CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC
TRONG NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT**

BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Số: 594 /GCN-HĐĐĐNCTĐV

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 12 tháng 6 năm 2023

**GIẤY CHỨNG NHẬN
Chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật**

Căn cứ Quyết định số 2106/QĐ-ĐHYD ngày 26/08/2022 của Hiệu trưởng Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh về việc thành lập Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh;

Theo kết luận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh tại cuộc họp vào ngày 05/06/2023;

Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh chấp thuận về đạo đức trong nghiên cứu trên động vật đối với đề tài nghiên cứu:

1. Tên nghiên cứu: Nghiên cứu tác dụng và cơ chế hạ glucose huyết của hạt chuối cô đơn (*Ensete glaucum* (Roxb) Cheesman)
2. Chủ nhiệm đề tài: Lý Hải Triều
3. Đơn vị chủ trì: Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM, Viện Dược liệu
4. Địa điểm triển khai: Trung tâm Sâm và Dược liệu TP.HCM, Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược Sài Gòn (Sapharcen)
5. Thời gian tiến hành nghiên cứu: từ tháng 6/2023 đến tháng 12/2023

Ngày chấp thuận: ngày 12 tháng 06 năm 2023

Những thay đổi trong triển khai nghiên cứu sẽ phải báo cáo và được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh xem xét, chấp thuận.

Chủ nhiệm đề tài phải báo cáo kết quả tuân thủ đạo đức trong nghiên cứu trên động vật cho Hội đồng Đạo đức sau khi kết thúc thí nghiệm theo quy định.

**TM. HỘI ĐỒNG
CHỦ TỊCH**



Trần Hùng

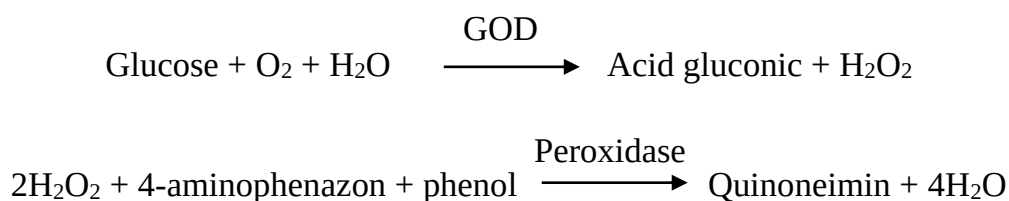
**KT. HIỆU TRƯỞNG
PHÓ HIỆU TRƯỞNG**



PHỤ LỤC 8. TÓM TẮT QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG GLUCOSE TRONG HUYẾT TƯƠNG BẰNG BỘ KIT GOD-PAP

Quy trình định lượng glucose: Nồng độ glucose huyết được xác định dựa trên hướng dẫn của bộ kit GOD – PAP (Glucose oxidase-phenol amino phenazon) có sửa đổi phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Nguyên tắc: Glucose trong mẫu bị oxy hóa theo cơ chế enzym dưới tác động của glucose oxidase (GOD) tạo ra H₂O₂. H₂O₂ dưới sự xúc tác của peroxidase sẽ phản ứng với phenol và 4-aminophenazon sinh ra quinoneimin có màu tím đỏ.



Tiến hành: Máu đuôi chuột (10 µl) được thu vào cho vào ống có chứa chất chống đông EDTA 2% (1: 1 v/v). Hỗn hợp này được ly tâm với tốc độ 5000 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ phòng thu huyết tương để định lượng glucose (Bảng 4).

Bảng 7.1. Hỗn hợp phản ứng định lượng glucose

Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết tương (µl)	-	-	5
Chuẩn glucose (µl)	-	5	-
Nước cất (µl)	5	-	-
Thuốc thử (µl)	250	250	250

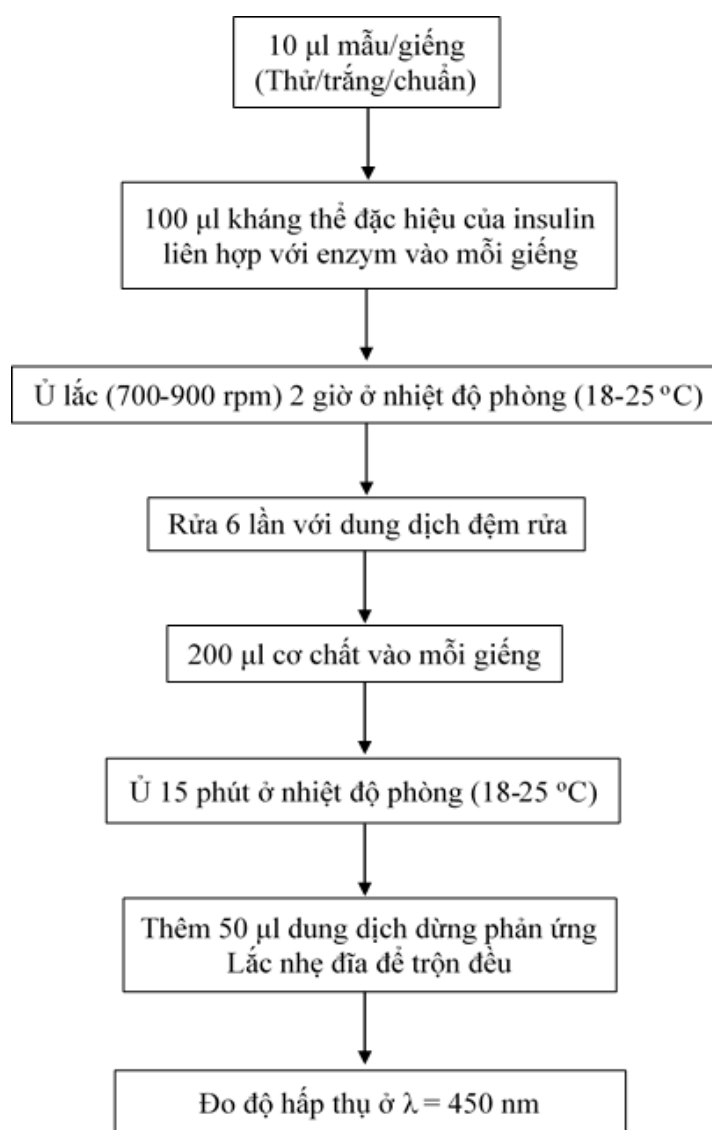
Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và ủ trong 10 phút ở 37 °C. Độ hấp thụ (Abs) được đo ở bước sóng 500 nm bằng máy đọc đĩa Biotek. Nồng độ glucose được tính toán theo công thức:

$$\text{Glucose (mg/dl)} = [(\text{Abs}_{\text{thử}} - \text{Abs}_{\text{trắng}}) / (\text{Abs}_{\text{chuẩn}} - \text{Abs}_{\text{trắng}})] \times 100 \times \text{độ pha loãng.}$$

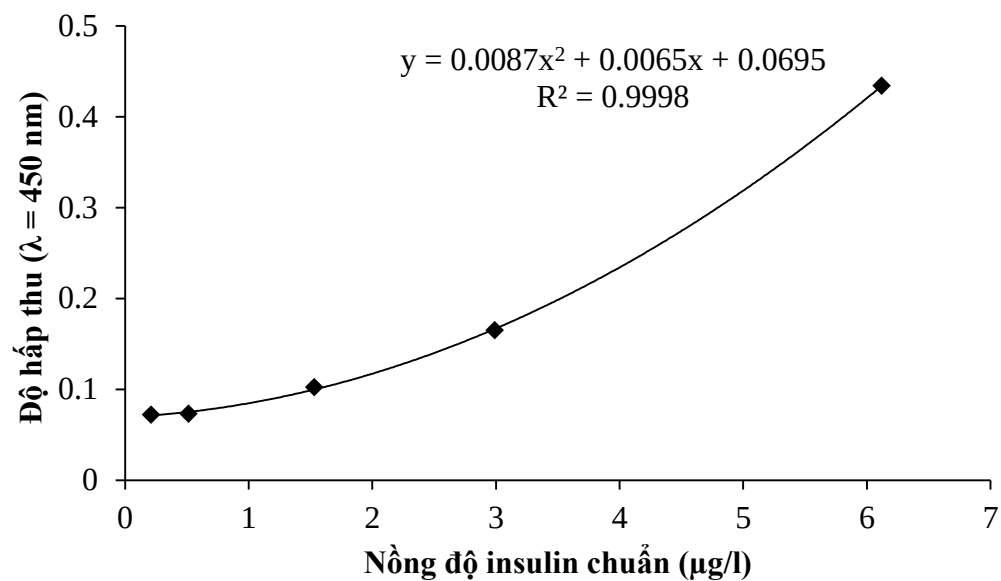
PHỤ LỤC 9. TÓM TẮT QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG INSULIN TRONG HUYẾT TƯƠNG BẰNG BỘ KIT MERCODIA MOUSE ELISA INSULIN KIT (10-1247-01)

Nguyên tắc: Insulin trong mẫu phản ứng với kháng thể kháng insulin liên hợp peroxidase và kháng thể kháng insulin cố định trên giếng phản ứng. Sau khi rửa sẽ loại bỏ các kháng thể không gắn, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng phản ứng với 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Phản ứng được dừng bằng dung dịch acid sulfuric 0,5 M và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 450 nm.

Tiến hành:



Hình 8.1. Quy trình định lượng insulin



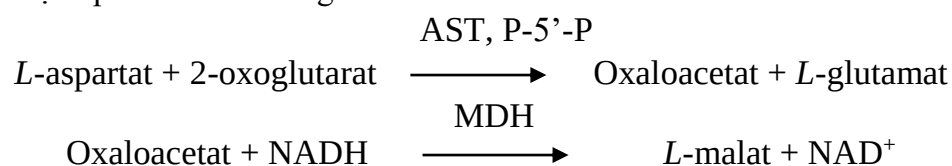
Hình 8.2. Đường chuẩn insulin

Tính toán: Nồng độ insulin huyết (µg/l) được tính thông qua đường chuẩn insulin ($y = 0,0087x^2 + 0,0065x + 0,0695$; $R^2 = 0,9998$); trong đó, x là nồng độ insulin (µg/l) và y là độ hấp thu ở bước sóng 450 nm.

PHỤ LỤC 10. TÓM TẮT QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG AST, ALT, ALP, GGT, BUN, CREATININ TRONG THANH TƯƠNG BẰNG BỘ KIT ALINITY ABBOTT

❖ Quy trình định lượng AST

Nguyên tắc: AST có trong mẫu xúc tác cho quá trình chuyển nhóm amin từ *L*-aspartat thành 2-oxoglutarat, với sự có mặt của pyridoxal-5'-phosphat, tạo thành oxaloacetat và *L*-glutamat. Oxaloacetat với sự có mặt của NADH và malat dehydrogenase (MDH) bị khử thành *L*-malat. Trong phản ứng này, NADH bị oxy hóa thành NAD^+ , phản ứng được theo dõi bằng cách đo tốc độ giảm độ hấp thu ở bước sóng 340 nm.



Tiến hành: Tạo các hỗn hợp phản ứng như bảng 9.1.

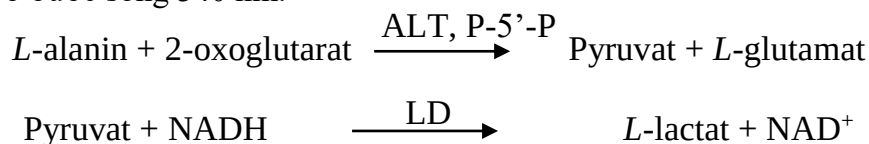
Bảng 9.1. Hỗn hợp phản ứng định lượng AST

Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết thanh (μl)	-	-	5
Chuẩn (μl)	-	5	-
Nước cất (μl)	5	-	-
Thuốc thử 1 (μl)	160	160	160
Thuốc thử 2 (μl)	40	40	40

Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và ủ trong 15 phút ở 37 °C. Độ hấp thu (Abs) được đo ở bước sóng 340 nm mỗi phút trong 10 phút. Tính toán nồng độ AST theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

❖ Quy trình định lượng ALT

Nguyên tắc: ALT có trong mẫu xúc tác cho quá trình chuyển nhóm amin từ *L*-alanin thành 2-oxoglutarat, với sự có mặt của pyridoxal-5'-phosphat, tạo thành pyruvat và *L*-glutamat. Pyruvat với sự có mặt của NADH và lactat dehydrogenase (LD) bị khử thành *L*-lactat. Trong phản ứng này, NADH bị oxy hóa thành NAD^+ , phản ứng được theo dõi bằng cách đo tốc độ giảm độ hấp thu ở bước sóng 340 nm.



Tiến hành: Tạo các hỗn hợp phản ứng như bảng 9.2.

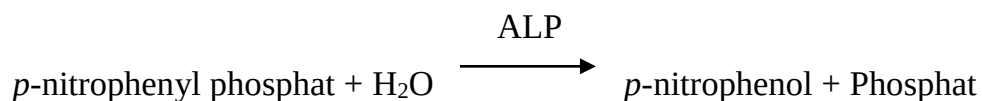
Bảng 9.2. Hỗn hợp phản ứng định lượng ALT

Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết thanh (μl)	-	-	6
Chuẩn (μl)	-	6	-
Nước cất (μl)	6	-	-
Thuốc thử 1 (μl)	120	120	120
Thuốc thử 2 (μl)	120	120	120

Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và ủ trong 1 phút ở 37 °C. Độ hấp thu (Abs) được đo ở bước sóng 340 nm mỗi phút trong 3 phút. Tính toán nồng độ ALT theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

❖ Quy trình định lượng ALP

Nguyên tắc: ALT có trong mẫu thủy phân *p*-nitrophenyl phosphat tạo thành sản phẩm có màu vàng, có độ hấp thu cực đại ở bước sóng 405 nm.



Tiến hành: Tạo các hỗn hợp phản ứng như bảng 9.3.

Bảng 9.3. Hỗn hợp phản ứng định lượng ALP

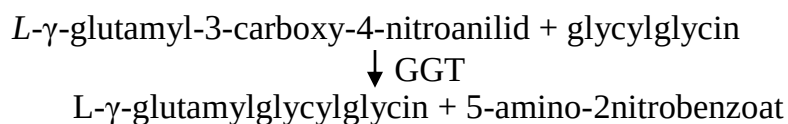
Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết thanh (μl)	-	-	4
Chuẩn (μl)	-	4	-
Nước cất (μl)	4	-	-
Thuốc thử 1 (μl)	200	200	200
Thuốc thử 2 (μl)	50	50	50

Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và ủ trong 1 phút ở 37 °C. Độ hấp thu (Abs) được đo ở bước sóng 405 nm mỗi phút trong 3 phút. Tính toán nồng độ ALP theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

❖ Quy trình định lượng GGT

Nguyên tắc: GGT có trong mẫu xúc tác quá trình chuyển nhóm γ-glutamyl từ chất nền cho (*L*-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid) sang chất nhận glycylglycin để tạo ra glutamyl

glycylglycin và 5-amino-2-nitrobenzoat. Tốc độ hình thành 5-amino-2-nitrobenzoat tỷ lệ thuận với hoạt tính GGT có trong mẫu và có thể được đo động học ở 400-420 nm.



Tiến hành: Tạo các hỗn hợp phản ứng như bảng 9.4.

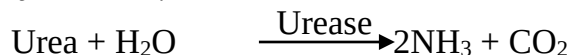
Bảng 9.4. Hỗn hợp phản ứng định lượng GGT

Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết thanh (μl)	-	-	3
Chuẩn (μl)	-	3	-
Nước cất (μl)	3	-	-
Thuốc thử 1 (μl)	125	125	125
Thuốc thử 2 (μl)	32	32	32

Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và ủ trong 1 phút ở 37 °C. Độ hấp thu (Abs) được đo ở bước sóng 405 nm mỗi phút trong 3 phút. Tính toán nồng độ GGT theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

❖ Quy trình định lượng BUN

Nguyên tắc: Urea có trong mẫu bị thủy phân bởi urease tạo ra amoniac và carbon dioxid. Với sự hiện diện của glutamat dehydrogenase (GLDH) và NADH dạng khử, amoniac kết hợp với α-ketoglutarat (α-KG) để tạo ra L-glutamat. Trong phản ứng này, NADH bị oxy hóa thành NAD⁺. Phản ứng được theo dõi bằng cách đo tốc độ giảm độ hấp thu ở bước sóng 340 nm do quá trình oxy hóa NADH thành NAD⁺.



Tiến hành: Tạo các hỗn hợp phản ứng như bảng 9.5.

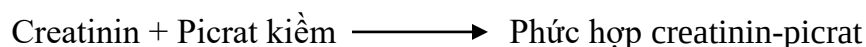
Bảng 9.5. Hỗn hợp phản ứng định lượng BUN

Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết thanh (µl)	-	-	5
Chuẩn (µl)	-	5	-
Nước cất (µl)	5	-	-
Thuốc thử 1 (µl)	160	160	160
Thuốc thử 2 (µl)	40	40	40

Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và ủ trong 1 phút ở 37 °C. Độ hấp thu (Abs) được đo ở bước sóng 340 nm mỗi phút trong 3 phút. Tính toán nồng độ BUN theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

❖ **Quy trình định lượng creatinin**

Nguyên tắc: Ở độ pH kiềm, creatinin trong mẫu phản ứng với picrat để tạo thành phức hợp creatinin-picrat. Tốc độ tăng độ hấp thu ở bước sóng 500 nm do sự hình thành phức hợp này tỷ lệ thuận với nồng độ creatinin trong mẫu.



Tiến hành: Tạo các hỗn hợp phản ứng như bảng 9.6.

Bảng 9.6. Hỗn hợp phản ứng định lượng creatinin

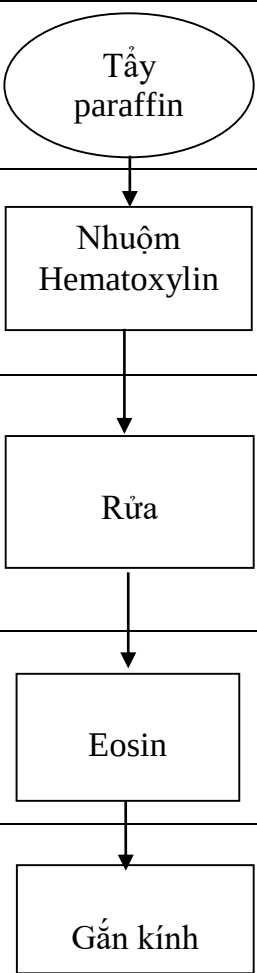
Mẫu	Trắng	Chuẩn	Thử
Huyết thanh (µl)	-	-	10
Chuẩn (µl)	-	10	-
Nước cất (µl)	10	-	-
Thuốc thử 1 (µl)	200	200	200
Thuốc thử 2 (µl)	48	48	48

Hỗn hợp phản ứng được lắc đều và độ hấp thu được đo ở bước sóng 510 nm sau 30 và 90 giây ủ ở 37 °C. Tính toán nồng độ GGT theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

PHỤ LỤC 11. QUY TRÌNH NHUỘM MÔ H&E

Nguyên tắc: Nhuộm H&E là phương pháp nhuộm hai màu liên tiếp. *Hematoxylin nhuộm nhân:* H sau khi bị oxy hóa mất 2 nguyên tử H tạo thành anion Hematein mang điện tích âm (-) có ái lực mạnh đối với các thành phần cation mang điện tích dương (+) ở nhiễm sắc chất trong nhân (dải màu có thể từ xanh đến tím). *Eosin nhuộm tế bào chất:* E bắt màu bằng lực hút tĩnh điện giữa Eosin và các thành phần của bào tương (dải màu từ hồng đến đỏ).

Tiến hành:

Bước chính	Kỹ thuật
 Tẩy paraffin	- Tẩy paraffin trong 3 bể xylen mỗi bể 5' - Qua 3 bể cồn 99-96-80°, mỗi bể 15s - Rửa nước cất 15s
Nhuộm Hematoxylin	- Nhuộm hematoxylin Harris: 7'. - Rửa nước chảy 2'.
Rửa	- Cồn acid 0,5%, nhúng 1-3 lần - Rửa nước cất 15s - Nước amoniac 2-3%, nhúng 1-3 lần - Rửa nước cất 15s - Qua bể cồn 90°, 15s
Eosin	- Nhuộm Eosin 1%: 1,5'. - Rửa nước chảy 2'. - Biệt hóa trong 3 bể cồn 96-90-90°, mỗi bể nhúng 3-5 lần.
Gắn kính	- Lau lame, gắn lame bằng keo và kí hiệu

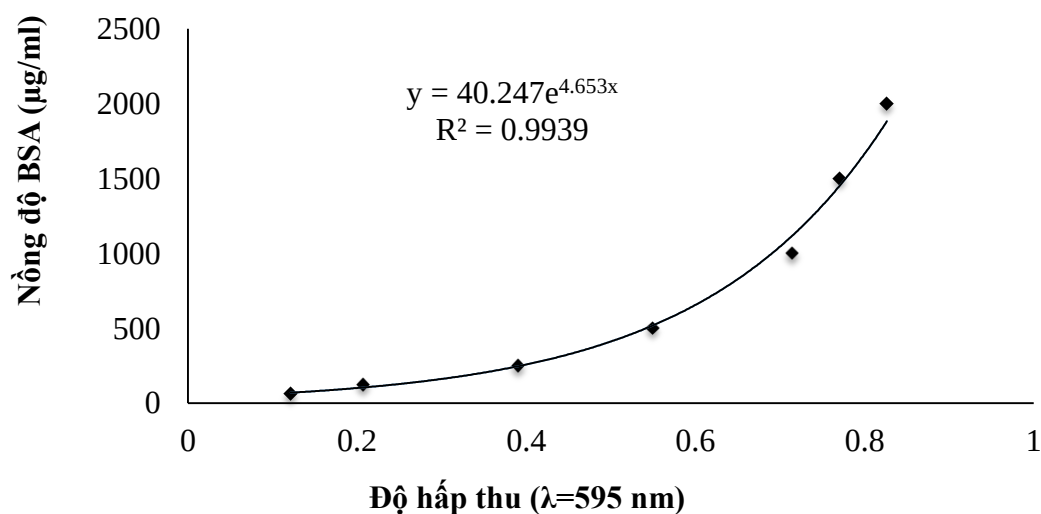
PHỤ LỤC 12. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN BẰNG THỬ NGHIỆM BRADFORD

Nguyên tắc: Thử nghiệm Bradford dựa trên nguyên tắc liên kết của phân tử thuốc nhuộm, Coomassie Brilliant Blue, với protein dẫn đến sự thay đổi phổ hấp thụ của thuốc nhuộm. Khi thuốc nhuộm liên kết với protein, độ hấp thụ tối đa của nó sẽ chuyển từ 465 nm sang 595 nm, dẫn đến sự thay đổi màu từ nâu sang xanh.

Tiến hành: Theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific Pierce BSA Protein Assay Standards)

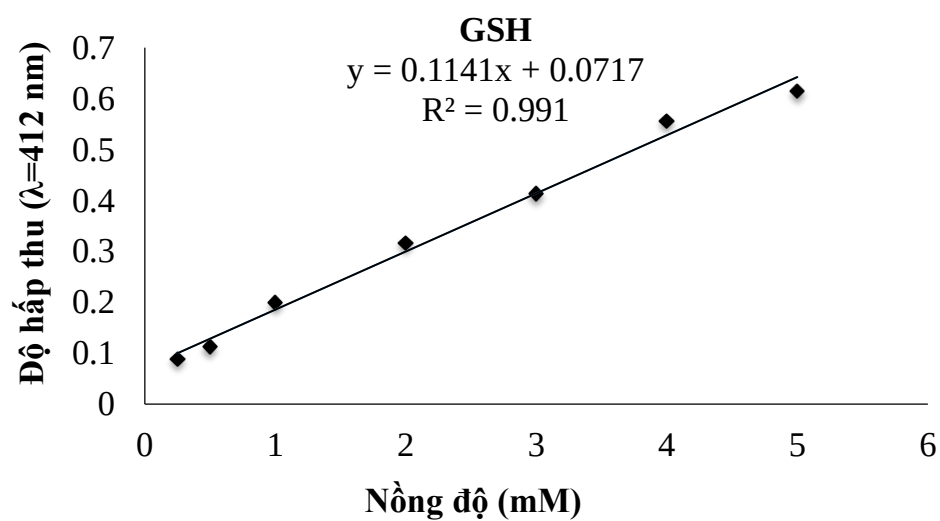
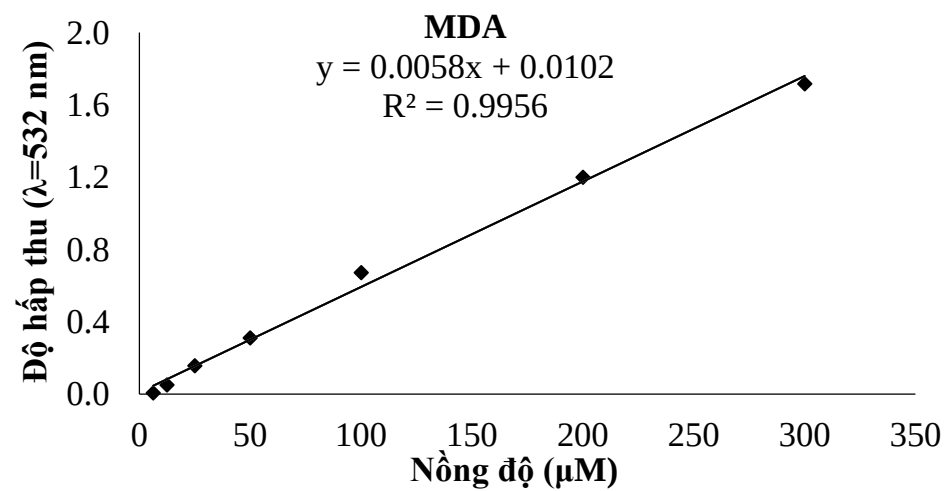
Chuẩn bị thuốc thử: Coomassie Brilliant Blue G (2 mg) + Ethanol 95% (Merck) (1 ml) => Hòa tan hoàn toàn => Thêm từ từ acid phosphoric 88% (5 ml) => Vortex đều => Bổ sung nước đủ 20 ml => Bảo quản ở 4 °C.

Albumin huyết thanh bò (BSA) là chất chuẩn được mua sẵn ở nồng độ 2 mg/ml để tiến hành dựng đường chuẩn với các nồng độ khác nhau: 2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml. Phản ứng định lượng protein gồm: 1 ml Coomassie Brilliant Blue G + 96 µl H₂O + 4 µl dịch định lượng protein. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm. Hàm lượng protein được xác định thông qua đường chuẩn BSA $y = 40,247e^{4,653x}$, trong đó x là độ hấp thụ; y là nồng độ BSA (µg/ml).



Hình 11.1. Đường chuẩn BSA tại bước sóng 595 nm

PHỤ LỤC 13. ĐƯỜNG CHUẨN MDA VÀ GSH

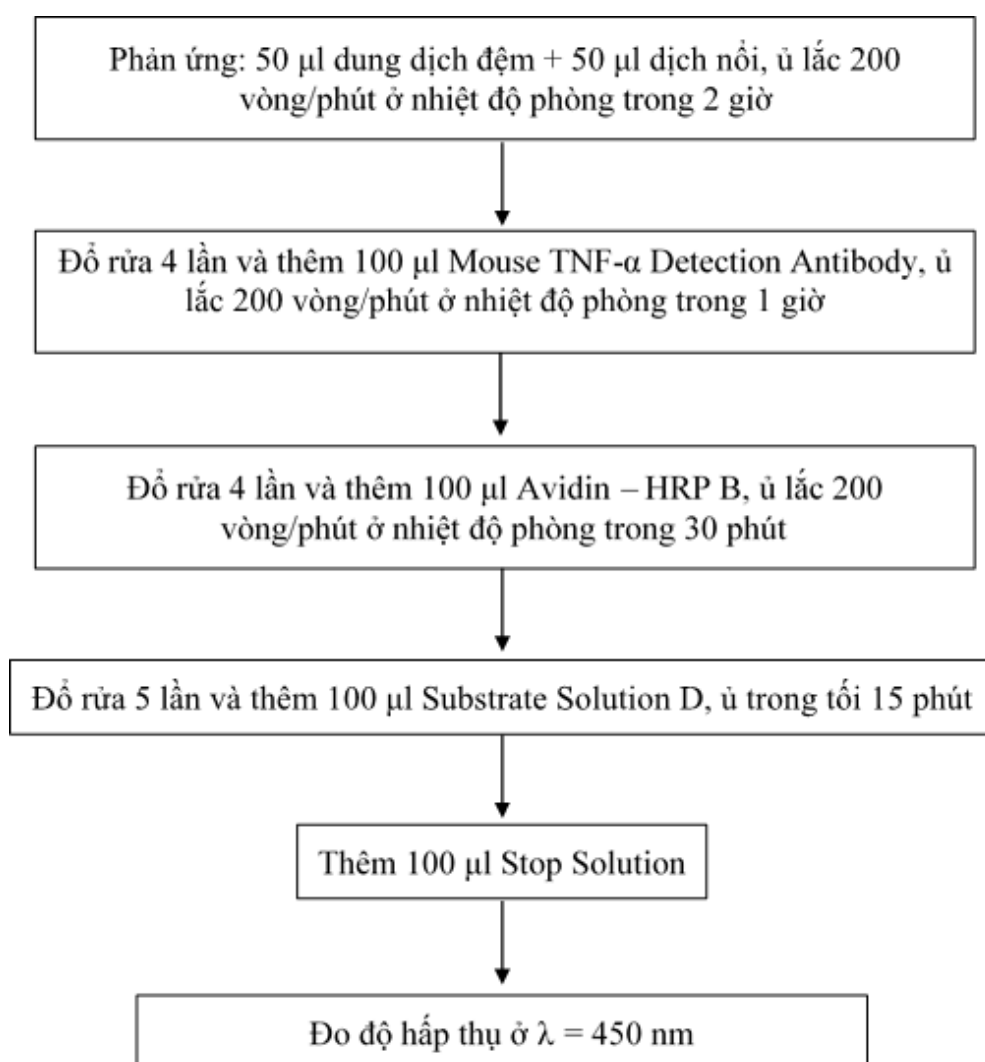


Hình 12.1. Đường chuẩn MDA và GSH

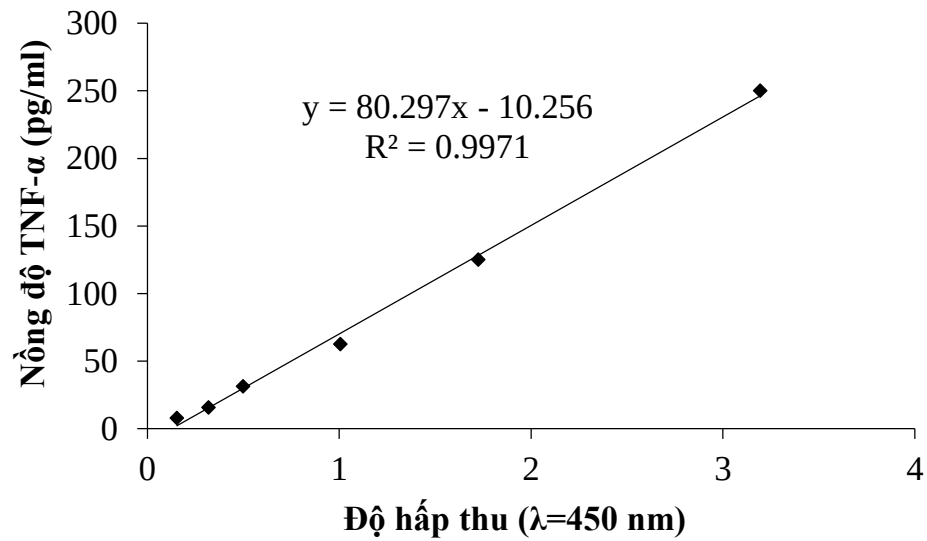
PHỤ LỤC 14. TÓM TẮT QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG TNF- α TRONG DỊCH ĐỒNG THỂ MÔ BẰNG BỘ KIT LEGEND MAX MOUSE TNF- α ELISA KIT (430907, BIOLEGEND, MỸ)

Nguyên tắc: Dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể, kháng thể đã được phủ sẵn dưới đáy giếng sẽ liên kết với kháng nguyên có trong mẫu, sau đó ủ với kháng thể thứ cấp liên kết với enzym, dưới tác dụng của cơ chất sẽ giải phóng tín hiệu màu. Cường độ màu của phức hợp tỉ lệ với hàm lượng TNF- α có trong mẫu, được đo ở bước sóng 450 nm.

Tiến hành:



Hình 13.1. Quy trình định lượng TNF- α



Hình 13.2. Đường chuẩn TNF-α tại bước sóng 450 nm

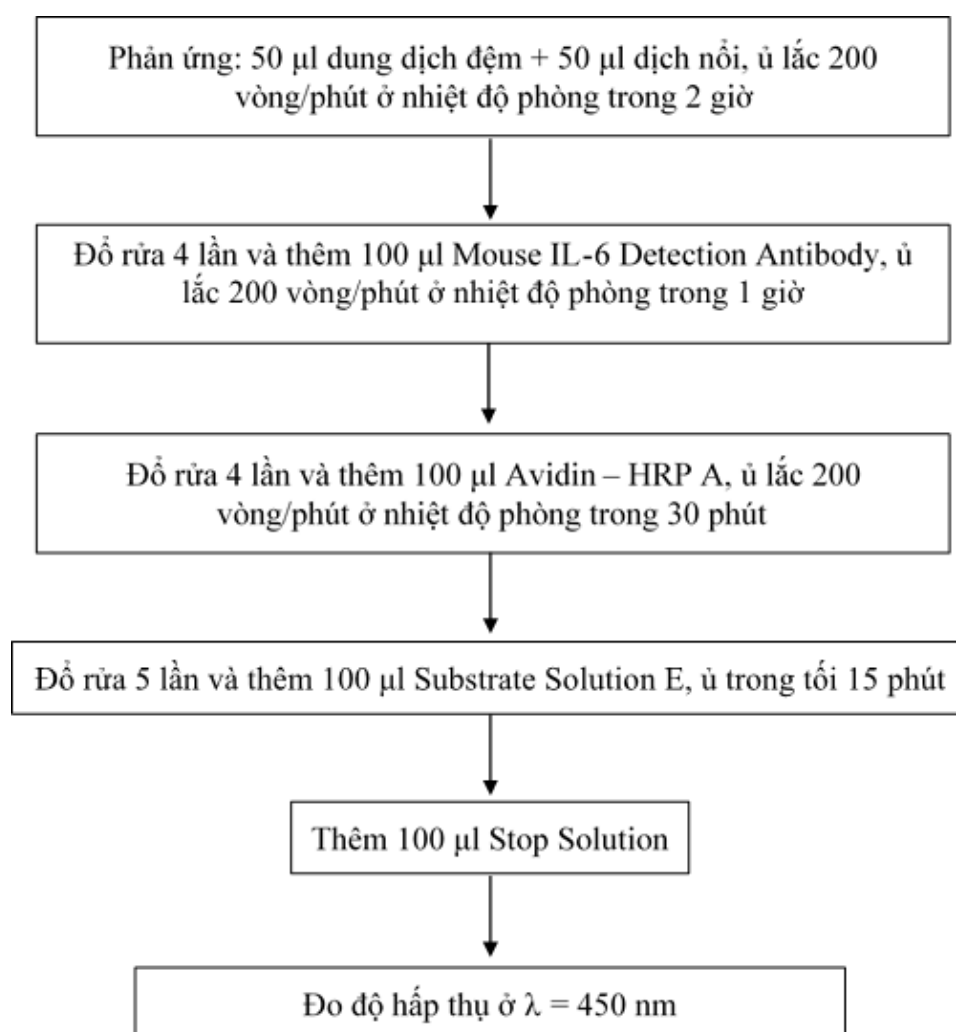
Định lượng protein: Hàm lượng protein (mg/ml) trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Bradford thông qua đường chuẩn BSA (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 12*).

Tính toán: Hàm lượng TNF-α (pg/mg protein) được tính thông qua đường chuẩn TNF-α ($y = 80,297x - 10,256$; $R^2 = 0,9971$); trong đó, x là độ hấp thu ở bước sóng 450 nm và y là nồng độ TNF-α (pg/ml).

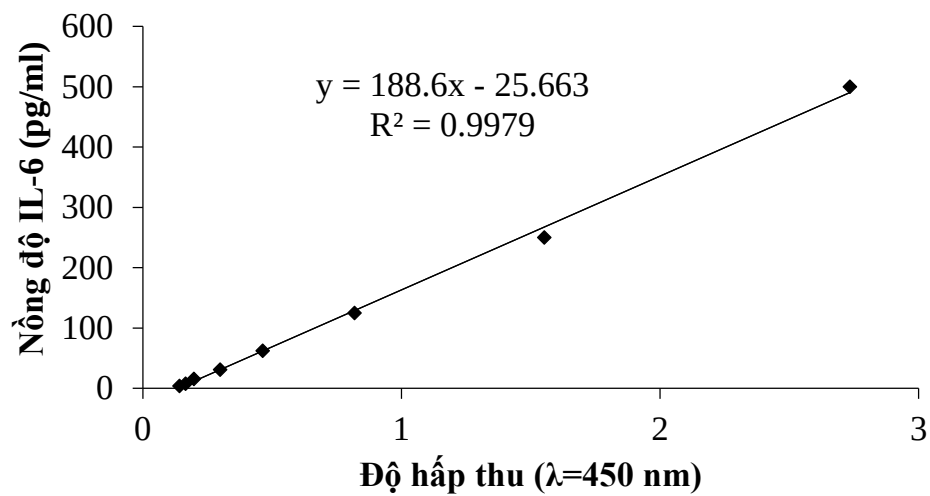
**PHỤ LỤC 15. TÓM TẮT QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG IL-6 TRONG DỊCH ĐỒNG
THỂ MÔ BẰNG BỘ KIT LEGEND MAX MOUSE IL-6 ELISA KIT (431307,
BIOLEGEND, MỸ)**

Nguyên tắc: Dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể, kháng thể đã được phủ sẵn dưới đáy giếng sẽ liên kết với kháng nguyên có trong mẫu, sau đó ủ với kháng thể thứ cấp liên kết với enzym, dưới tác dụng của cơ chất sẽ giải phóng tín hiệu màu. Cường độ màu của phức hợp tỉ lệ với hàm lượng IL-6 có trong mẫu, được đo ở bước sóng 450 nm.

Tiến hành:



Hình 14.1. Quy trình định lượng IL-6



Hình 14.2. Đường chuẩn IL-6 tại bước sóng 450 nm

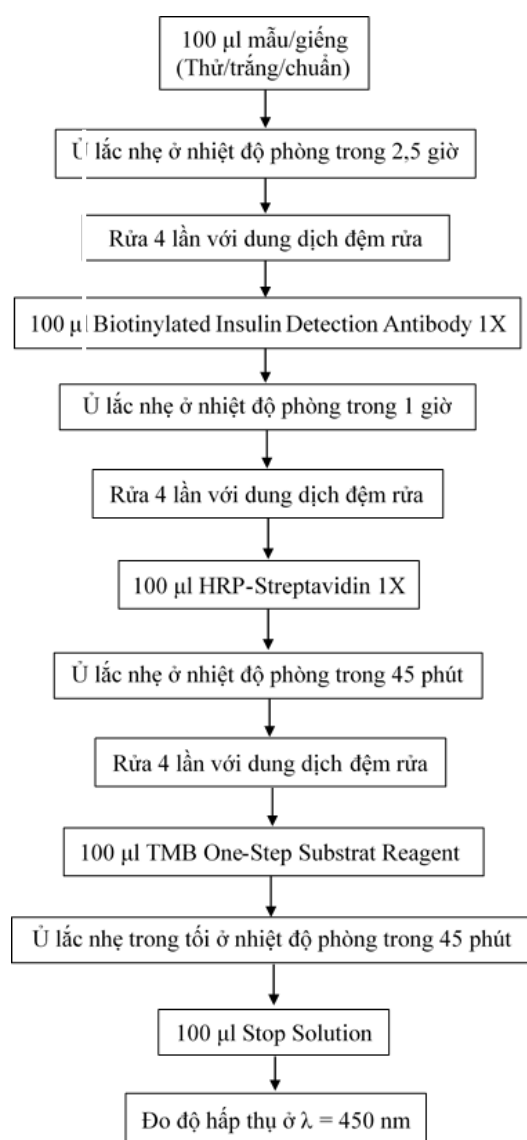
Định lượng protein: Hàm lượng protein (mg/ml) trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Bradford thông qua đường chuẩn BSA (*Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 12*).

Tính toán: Hàm lượng IL-6 (pg/mg protein) được tính thông qua đường chuẩn IL-6 ($y = 188,6x - 25,663$; $R^2 = 0,9979$); trong đó, x là độ hấp thu ở bước sóng 450 nm và y là nồng độ IL-6 (pg/ml).

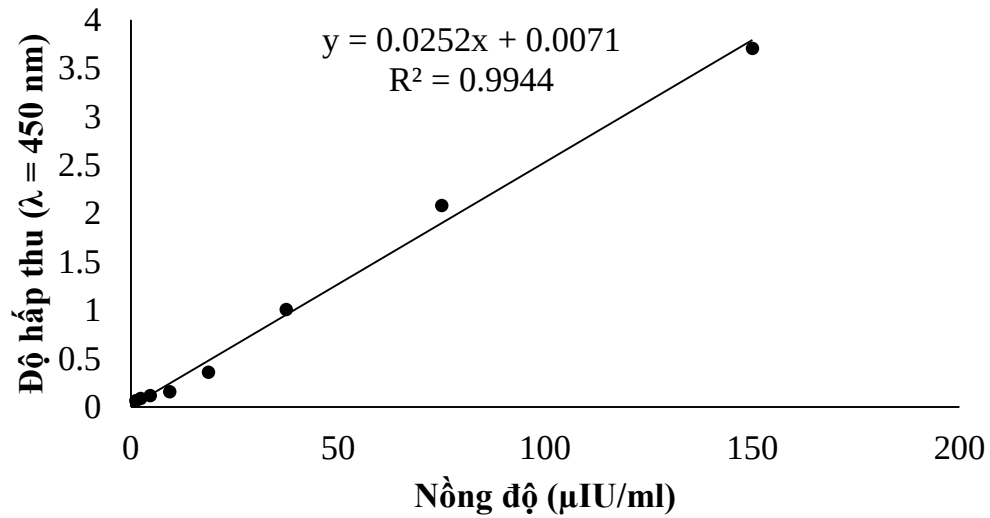
PHỤ LỤC 16. TÓM TẮT QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG INSULIN TRONG DỊCH Ủ TIỂU ĐẢO TỤY BẰNG BỘ KIT HUMAN INSULIN ELISA (AB100578, ABCAM)

Nguyên tắc: Insulin trong mẫu phản ứng với kháng thể kháng insulin liên hợp peroxidase và kháng thể kháng insulin cố định trên giếng phản ứng. Sau khi rửa sẽ loại bỏ các kháng thể không gắn, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng phản ứng với 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. Phản ứng được dừng bằng dung dịch acid sulfuric 0,5 M và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 450 nm.

Tiến hành:



Hình 15.1. Quy trình định lượng insulin



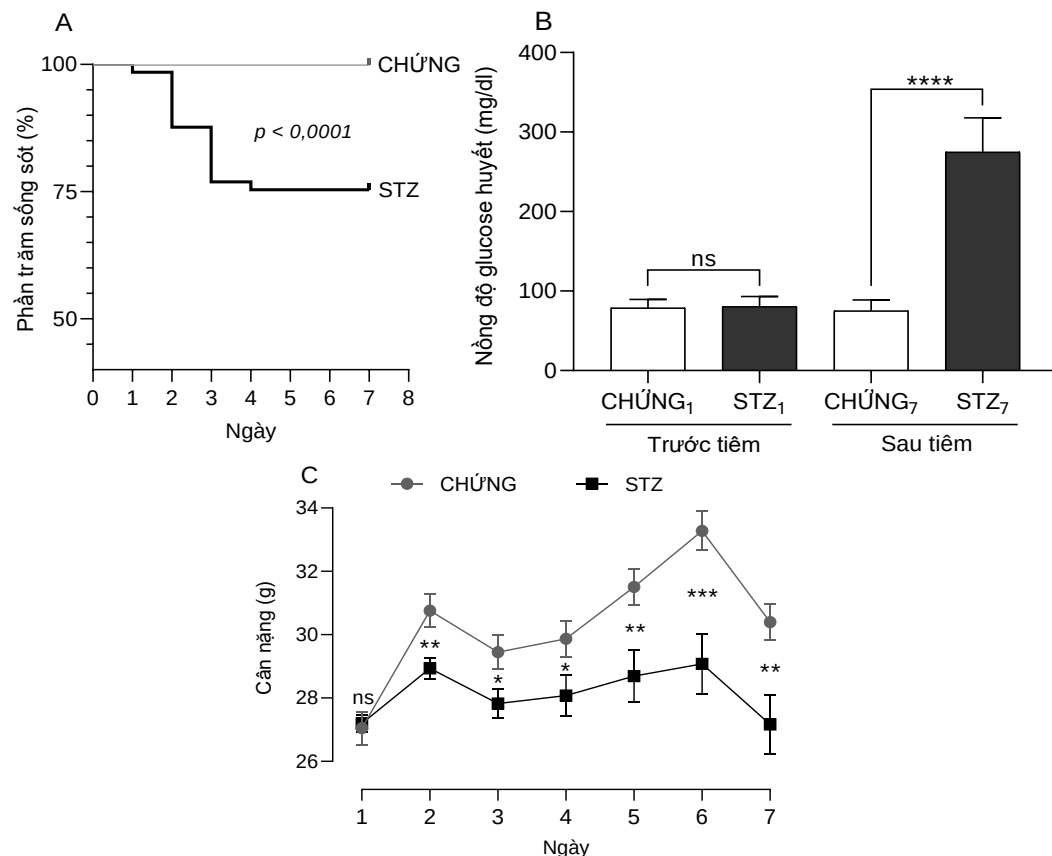
Hình 15.2. Đường chuẩn insulin

Thu nhận protein: Các tiểu đảo tụy được ly giải trong dung dịch đệm RIPA lạnh có chứa Tris-HCl 50 mM (pH=8,0), Triton X100 0,1%, NaCl 150 mM, natri deoxycholat 0,5%, SDS 0,1%, natri orthovanadat 1 M, NaF 1 mM, PMSF 1 mM và phosphatase inhibitor II, III, ủ trên đá lạnh trong 2 giờ để ly giải tế bào. Hỗn hợp được ly tâm ở 16000×g trong 20 phút ở 4° C, phần dịch nổi được thu để xác định hàm lượng protein.

Định lượng protein: Hàm lượng protein (mg/ml) trong dịch nổi được xác định bằng thử nghiệm Bradford thông qua đường chuẩn BSA (**Quy trình được tóm tắt ở phụ lục 12**).

Tính toán: Hàm lượng insulin (μIU/mg protein) được tính thông qua đường chuẩn insulin ($y = 0,0252x + 0,0071$; $R^2 = 0,9944$); trong đó, x là nồng độ insulin (μIU/ml) và y là độ hấp thu ở bước sóng 450 nm.

PHỤ LỤC 17. KẾT QUẢ TÁC ĐỘNG CỦA STZ LIỀU TIÊM (I.P.) DUY NHẤT 170 MG/KG



Hình 17.1. Tác động của streptozotocin (STZ) trên chuột nhắt trắng chủng Swiss albino

(A) Phần trăm sống sót ($n_{\text{chứng}} = 9$, $n_{\text{STZ}} = 65$), (B) Nồng độ glucose huyết trước và sau 7 ngày tiêm (i. p.) STZ liều duy nhất 170 mg/kg, Trung bình $\pm$ SD ($n_{\text{chứng}} = 9$, $n_{\text{STZ1}} = 65$, $n_{\text{STZ7}} = 49$), (C) Cân nặng chuột, Trung bình $\pm$ SEM ($n_{\text{chứng}} = 9$, $n_{\text{STZ}} = 49-65$). Phép kiểm *t*-test được sử dụng để so sánh giữa hai nhóm trong cùng một thời điểm. $^{ns}p > 0,05$ không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở cùng thời điểm, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ và $^{****}p < 0,0001$ khác biệt có ý nghĩa thống kê ở cùng thời điểm

Kết quả ở **hình 17.1** cho thấy:

Về tỷ lệ tử vong, sau khi tiêm STZ liều duy nhất 170 mg/kg, tỷ lệ tử vong khoảng 25%. Chỉ có 1 chuột tử vong trong 24 giờ đầu sau tiêm, 14 chuột tử vong vào ngày thứ 2 và 3 (hơn 20%)

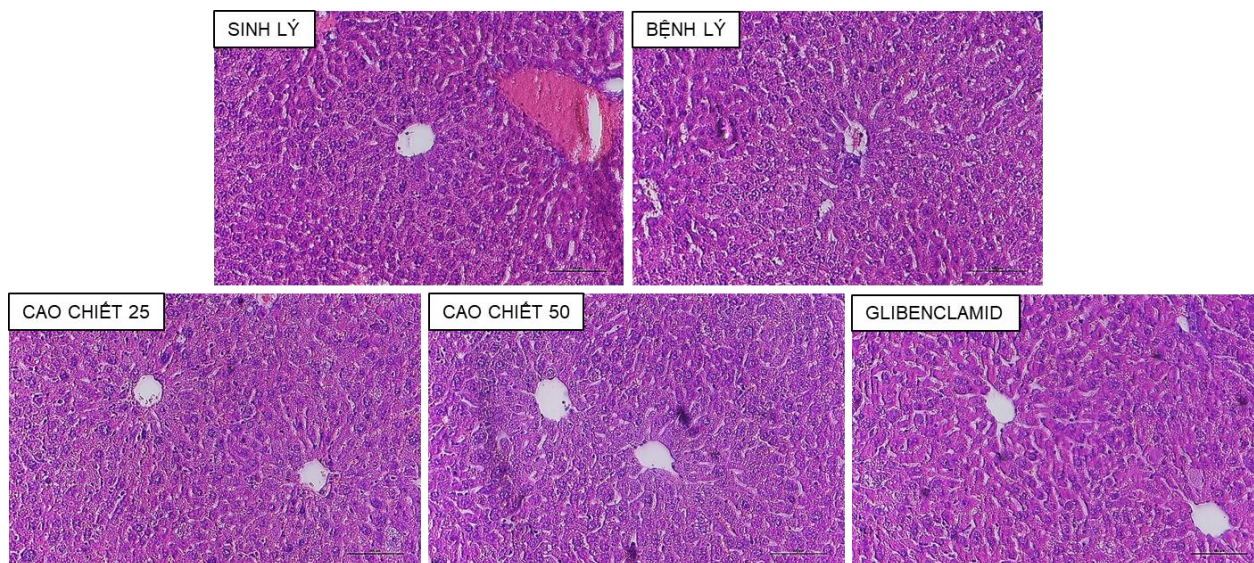
và chỉ có 1 chuột tử vong vào ngày thứ 4. Cho đến ngày cuối cùng của thí nghiệm, không có thêm chuột tử vong.

Về nồng độ glucose huyết, nồng độ glucose huyết trung bình của hai nhóm chuột khoảng 80 mg/dl. Vào ngày thứ 7, nồng độ glucose huyết tăng lên đáng kể so với nhóm chứng (khoảng 280 mg/dl), cao hơn mức được cho là tăng glucose huyết (200 mg/dl). Có 4 chuột có nồng độ glucose huyết dưới 200 mg/dl đã bị loại khỏi thí nghiệm. Như vậy, tiêm (i.p.) STZ liều 170 mg/kg duy nhất đã tạo ra mô hình chuột bị tăng glucose huyết hiệu quả.

Về cân nặng chuột, cân nặng chuột tương đương nhau ở ngày 1 (khoảng 27 g). Cân nặng chuột ở cả hai nhóm đều tăng vào ngày hôm sau vì chuột được nhin ăn vào ngày thứ nhất để xác định nồng độ glucose huyết lúc đói. Tuy nhiên, so với nhóm chứng, cân nặng chuột trung bình ở nhóm được tiêm STZ chỉ tăng được khoảng 2 g. Từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 6, cả hai nhóm đều có sự tăng cân nhưng mức độ tăng cân của chuột ở nhóm chứng cao hơn nhóm được tiêm STZ. Ngày thứ 7, cân nặng của chuột giảm là do chuột được nhin ăn để xác định nồng độ glucose huyết lúc đói.

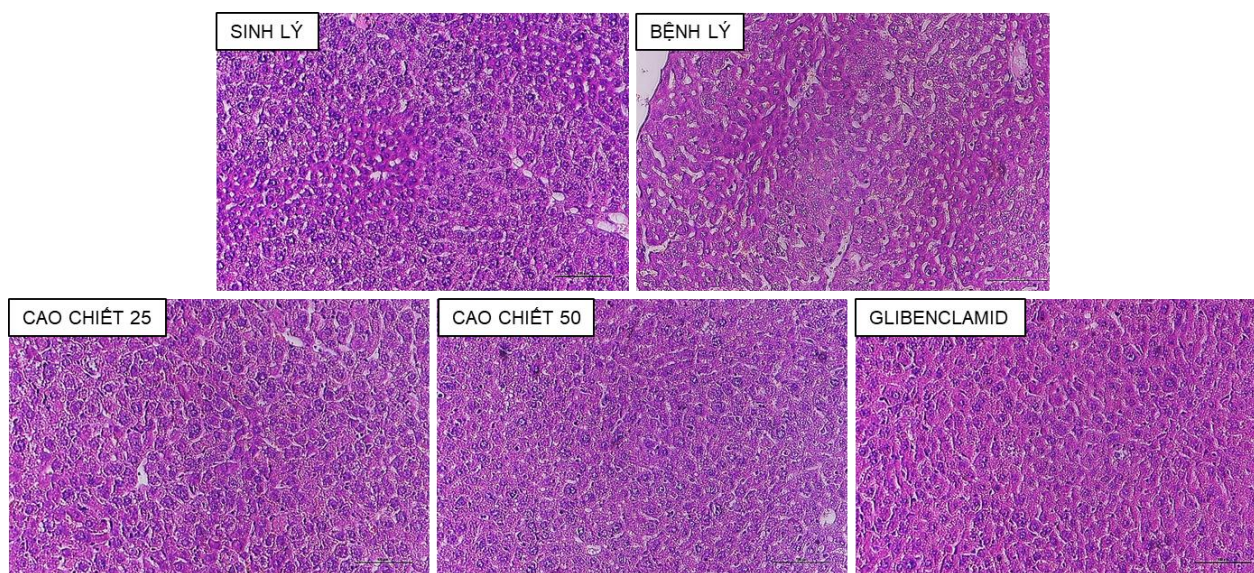
PHỤ LỤC 18. KẾT QUẢ NHUỘM MÔ H&E GAN VÀ THẬN

PHỤ LỤC 18.1. HÌNH ẢNH VI THỂ MÔ GAN



Hình 18.1. Hình ảnh vi thể đại diện mô học gan chuột vùng tĩnh mạch trung tâm sau 7 ngày điều trị với cao chiết hạt chuối cô đơn (H&E, 200×)

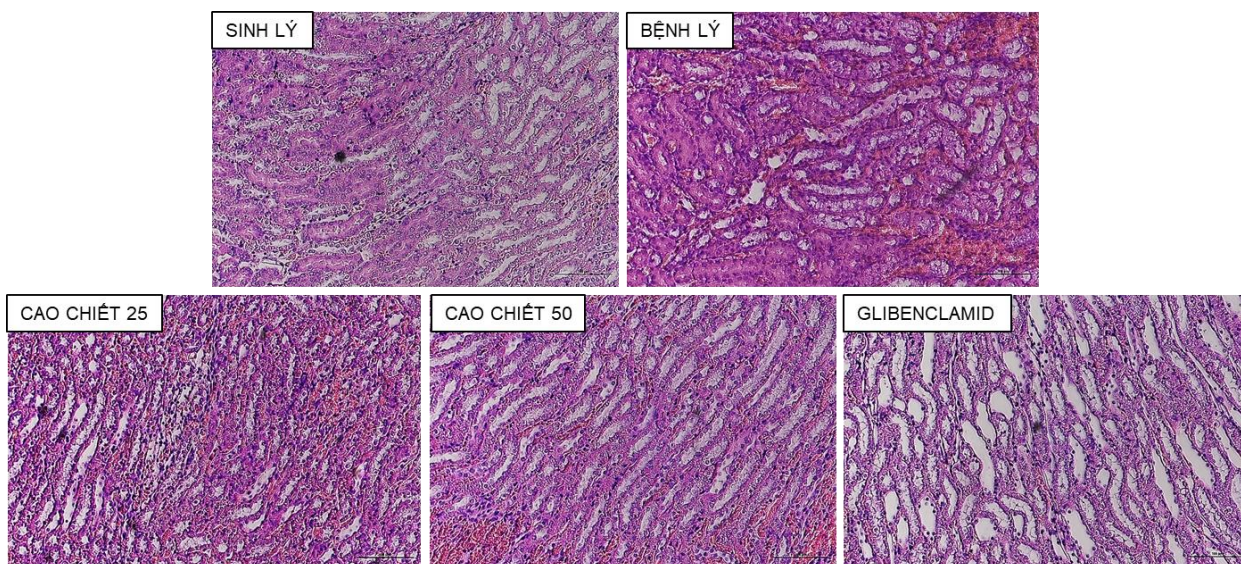
Không phát hiện bất thường ở các lô thử nghiệm.



Hình 18.2. Hình ảnh vi thể đại diện mô học gan chuột vùng khác sau 7 ngày điều trị với cao chiết hạt chuối cô đơn (H&E, 200×)

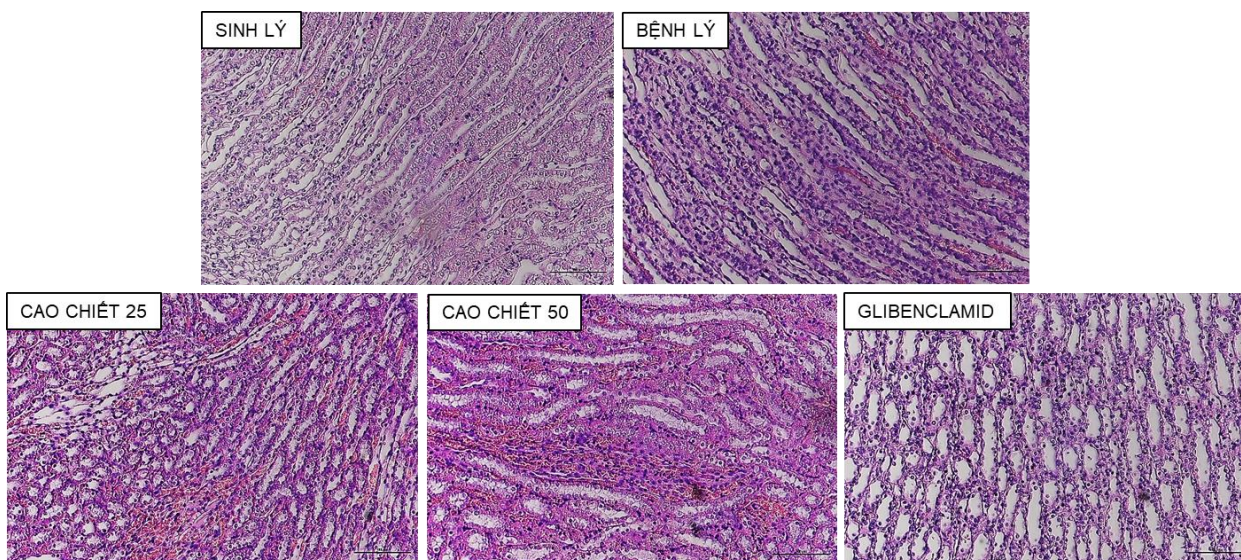
Không phát hiện bất thường ở các lô thử nghiệm.

PHỤ LỤC 18.2. HÌNH ẢNH VI THỂ MÔ THẬN



Hình 18.3. Hình ảnh vi thể đại diện mô học thận chuột vùng tuỷ sau 7 ngày điều trị với cao chiết hạt chuỗi cô đơn (H&E, 200×)

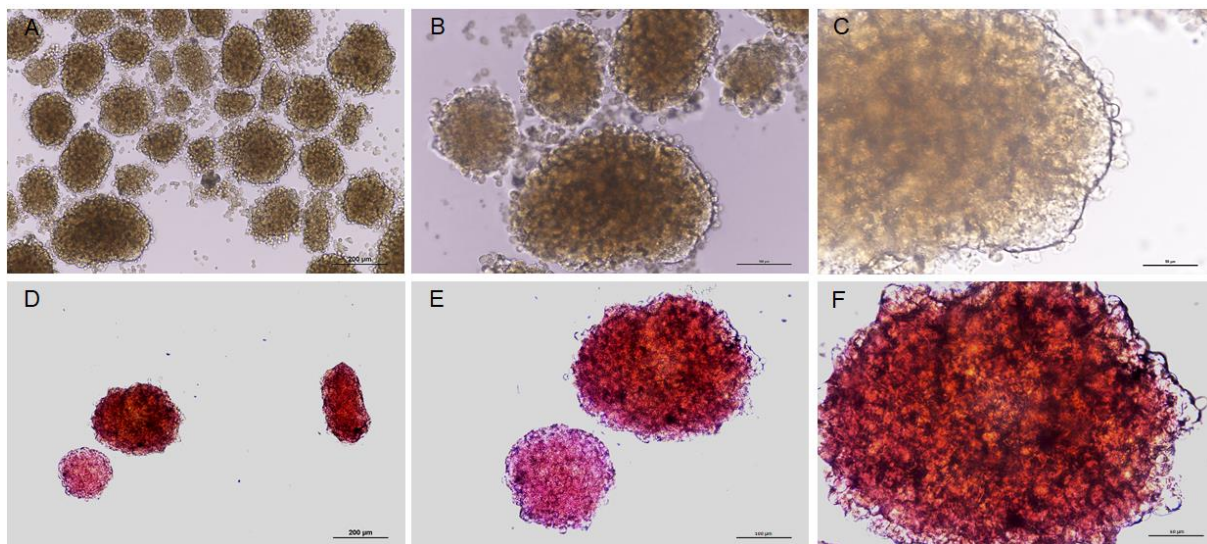
Không phát hiện bất thường ở các lô thử nghiệm



Hình 18.4. Hình ảnh vi thể đại diện mô học thận chuột vùng nhú sau 7 ngày điều trị với cao chiết hạt chuỗi cô đơn (H&E, 200×)

Không phát hiện bất thường ở các lô thử nghiệm

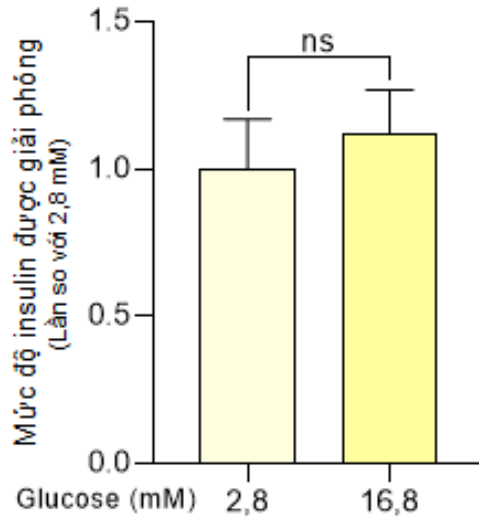
PHỤ LỤC 19. KẾT QUẢ PHÂN LẬP TIỂU ĐẢO TỤY TỪ CHUỘT NHẮT TRẮNG



Hình 19.1. Hình ảnh đại diện của các tiểu đảo tụy được phân lập từ chuột nhắt trắng và kết quả về tính đặc hiệu

(A-C) Hình ảnh tiểu đảo ở các vật kính khác nhau (scale bar A = 200 μm , B = 100 μm , C = 50 μm), (D-F) Tính đặc hiệu của tiểu đảo được thể hiện thông qua nhuộm dithizon (scale bar D = 200 μm , E = 100 μm , F = 50 μm).

Kết quả ở **hình 19.1** cho thấy các tiểu đảo tụy có đường viền nhẵn, ranh giới đồng đều và không tối ở tâm (Hình 19.1A-C). Dithizon là hợp chất dễ tạo phức với các kim loại chuyển tiếp, có thể dùng để xác định các tế bào giàu kẽm như tiểu đảo tụy (ion kẽm rất cần thiết trong việc duy trì cấu trúc và tính toàn vẹn của phân tử insulin trong tế bào β và được tiết ra cùng với insulin) và phân biệt tiểu đảo với các tế bào ngoại tiết và ống dẫn. Do đó, nhuộm dithizon là phương pháp tiêu chuẩn để xác định tính đặc hiệu của tiểu đảo tụy. Các tiểu đảo được nhuộm màu đều có màu từ hồng đến đỏ thẫm (Hình 19.1D-F).



Hình 19.2. Kết quả đánh giá chức năng tiết insulin của tế bào β tiểu đảo tụy bằng thử nghiệm GSIS

Kết quả ở **hình 19.2** cho thấy các tế bào β tiểu đảo tụy đã tăng nhẹ khả năng tiết insulin khi được kích thích bởi nồng độ glucose cao.

PHỤ LỤC 20. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH *IN SILICO* TÁC DỤNG ỨC CHẾ α -GLUCOSIDASE, K_{ATP} VÀ PTP1B CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ HẠT CHUỐI CÔ ĐƠN

Phương pháp:

Lắp ghép phân tử (Molecular docking)

Lắp ghép phân tử được sử dụng để đánh giá sự tương tác giữa protein (α -glucosidase, K_{ATP} và PTP1B) và các phối tử (afzelechin và coniferaldehyd) sử dụng PyMOL 2.5, PyRx 1.9.2 và BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Cấu trúc 3D của các hợp chất được lấy từ PubChem.

Không có cấu trúc tinh thể của α -glucosidase (Maltase) từ *Saccharomyces cerevisiae*, nghiên cứu sử dụng cấu trúc maltase được tạo ra bởi AlphaFold (AlphaFoldDB số P53341). Cấu trúc dự đoán này được xác thực bằng cách so sánh với cấu trúc tinh thể của protein isomaltase có độ tương tự cao (RCSB số 3AXI) và mô hình isomaltase do Alphafold tạo ra (AlphaFoldDB số P53051) bằng PyMol 2.5, các sơ đồ Ramachandran được tạo bằng MolProbity (**Hình 20.1**).

Cấu trúc tinh thể của kênh K_{ATP} của tuyến tụy tái tổ hợp được lấy từ Ngân hàng Dữ liệu Protein RCSB, số 6JB1. Kênh này là cấu trúc hợp nhất của 4 kênh kali chỉnh lưu hướng vào trong 6 (Kir6.2) từ *Mus musculus*, được bao quanh bởi 4 thụ thể sulphonylurea 1 (SUR1) từ *Mesocricetus auratus* (**Hình 20.3A**). Cấu trúc được xử lý trong PyMOL 2.5 ([//pymol.org](http://pymol.org)) để loại bỏ các dị phân tử và giảm kích thước cấu trúc. Do tính chất đối xứng, cấu trúc KATP đã được cắt giảm xuống còn một tiểu đơn vị SUR1 và hai tiểu đơn vị KIR6 liền kề (**Hình 20.3B**) để giảm tính toán khi lắp ghép.

Cấu trúc tinh thể của dạng giới hạn phối tử phosphotyrosin phosphatase 1B (PTP1B) tái tổ hợp người được lấy từ Ngân hàng Dữ liệu Protein RCSB, số 2FJN. Cấu trúc PTP1B được xử lý trong PyMOL 2.5 ([//pymol.org](http://pymol.org)) để loại bỏ các phân tử nước và phối tử liên kết.

Máy chủ PrankWeb được sử dụng để dự đoán các vị trí liên kết phối tử có thể có của các protein. Các protein được hiển thị bằng PyMOL 2.5. Các protein và các hợp chất được xử lý dưới dạng đại phân tử và phối tử bằng PyRx 1.9.2 theo các cài đặt được đề xuất. Việc lắp ghép được thực hiện bằng quy trình gnina, là một nhánh của AutoDock Vina 1.2.0 với chức năng tính điểm Vinardo, lưới bao phủ toàn bộ protein, mức độ đầy đủ là 1000 và 15 tư thế đầu ra. Các tư thế lắp ghép được đánh giá bằng hai điểm tích hợp, CNNscore và ái lực tối thiểu. Cấu

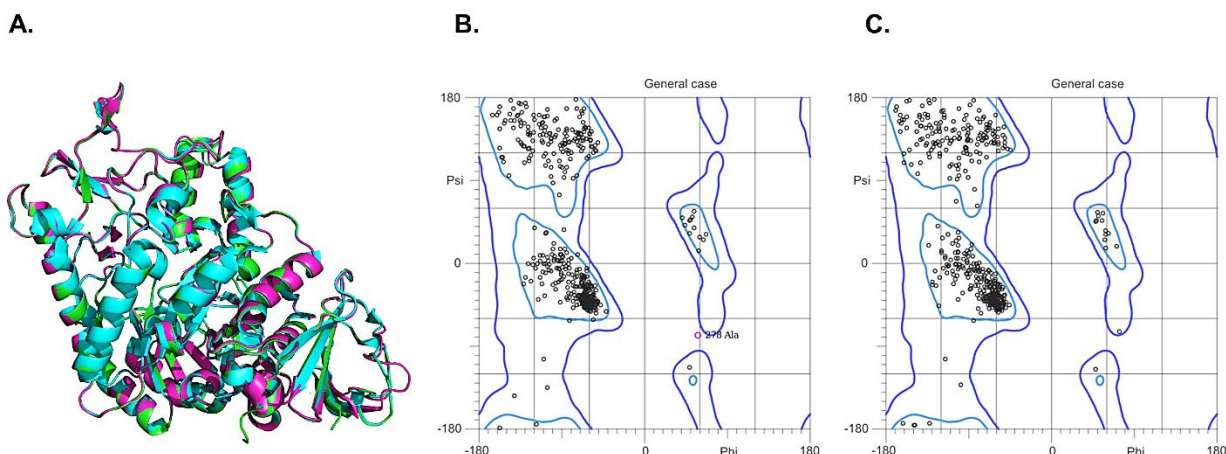
hình cố định và tương tác phối tử-protein được hiển thị và phân tích bằng BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Dự đoán và phân tích ADMET

Sự hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ (ADME), đặc tính hóa lý và khả năng tạo thuốc của các hợp chất được dự đoán bằng máy chủ ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>). Độc tính của hợp chất được dự đoán bằng máy chủ ProTox-II (https://tox-new.charite.de/protox_II/).

Kết quả:

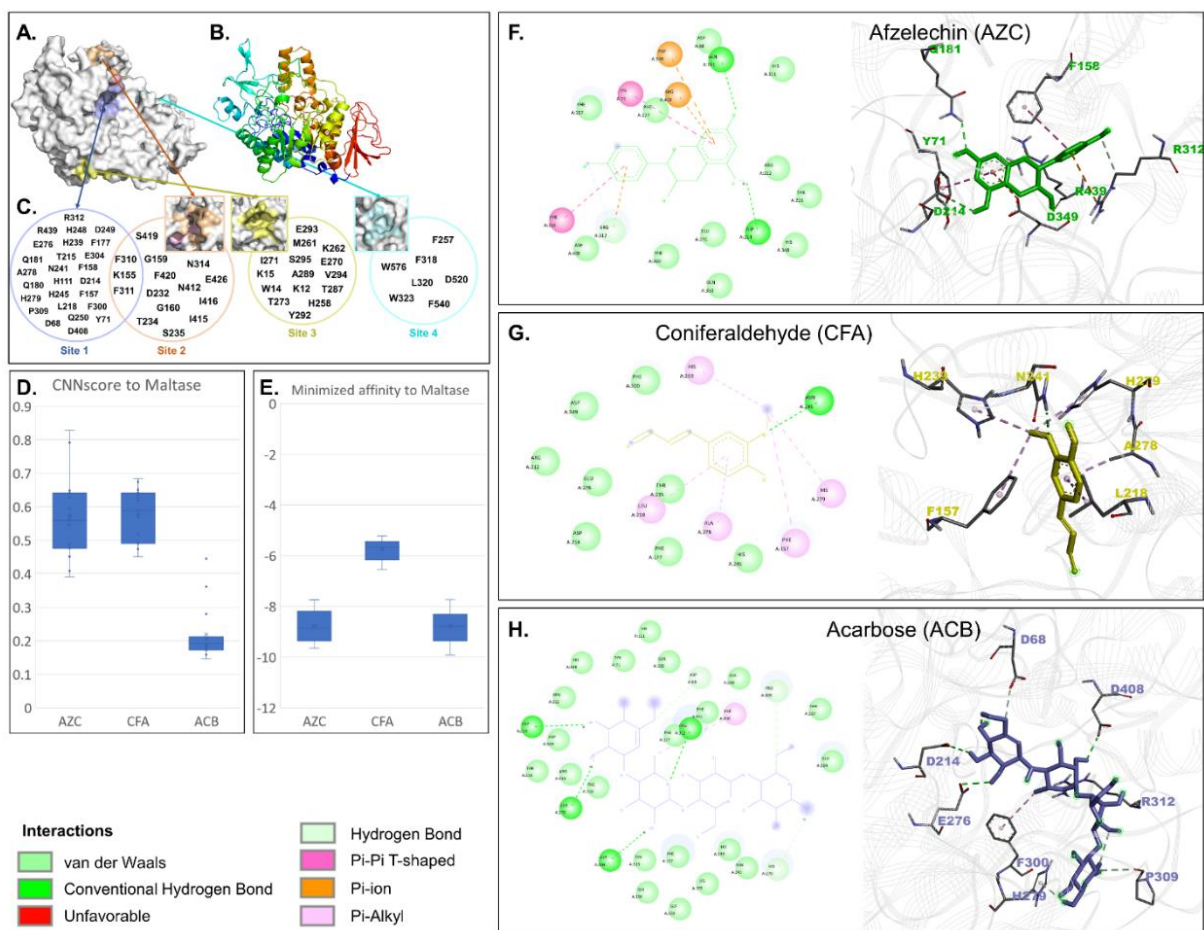
PHỤ LỤC 20.1. TRÊN MỤC TIÊU α -GLUCOSIDASE



Hình 20.1. Mô hình maltase do AlphaFold tạo ra

(A) Sự sắp xếp của mô hình maltase do AlphaFold tạo ra (màu hồng), mô hình isomaltase do AlphaFold tạo ra (màu xanh lá cây) và cấu trúc tinh thể của isomaltase (màu lục lam). Biểu đồ Ramachandran của cấu trúc tinh thể của isomaltase (B) và mô hình maltase do AlphaFold tạo ra (C), hiển thị sự phân bố dư lượng ở các vùng được ưa chuộng nhất (màu xanh) và các vùng thường được phép (màu tím), dư lượng vi phạm được đánh dấu trong màu hồng

Sự liên kết của mô hình maltase do AlphaFold tạo ra với cấu trúc tinh thể của isomaltase xem xét những điểm tương đồng đáng kể về cấu trúc với RMSD là 0,266. Mặt khác, mô hình isomaltase do AlphaFold tạo ra cũng gần như giống hệt với cấu trúc tinh thể với RMSD là 0,133. Biểu đồ Ramachandran của mô hình maltase cũng cho thấy 99,4% dư lượng nằm ở các vùng cho phép, giống hệt với cấu trúc tinh thể isomaltase.



Hình 20.2. Cấu trúc của maltase (α -glucosidase) và kết quả lắp ghép của maltase với 3 phối tử

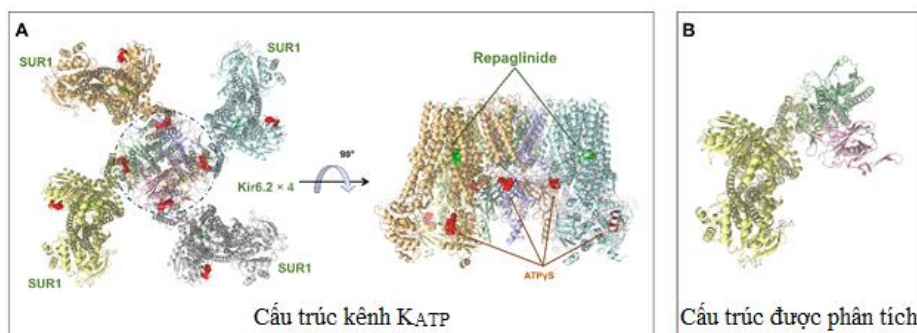
(A) Biểu diễn bề mặt của cấu trúc maltase với các vị trí liên kết được dự đoán. (B) Biểu diễn dải băng của cấu trúc maltase với dải màu từ xanh đậm của đầu N đến màu đỏ của đầu C. (C) Biểu diễn bề mặt của các vị trí liên kết được dự đoán và dư lượng cấu thành của chúng. (D, E) Biểu đồ mô tả sự phân bố CNNscore (càng cao càng tốt) và ái lực tối thiểu (càng thấp càng tốt) của vị trí lắp ghép của 3 phối tử với maltase. (F, G, H) Cấu trúc 2D và 3D về tư thế lắp ghép CNNscore tốt nhất của 3 phối tử và sự tương tác của chúng với maltase. (AZC) Afzelechin, (CFA) Coniferaldehyd, (ACB) Acarbose

Kết quả ở **hình 20.2** cho thấy:

Maltase được dự đoán sẽ có bốn vị trí liên kết. Vị trí liên kết 1 có thể là vị trí hoạt động của maltase vì cấu trúc tương đồng của nó trong maltase là vị trí liên kết cơ chất; vị trí liên kết 2 gần và được kết nối với vị trí liên kết 1; vị trí liên kết 3 và 4 là vị trí liên kết dị lập thể. Cả afzelechin, coniferaldehyd và acarbose đều gắn vào cấu trúc maltase.

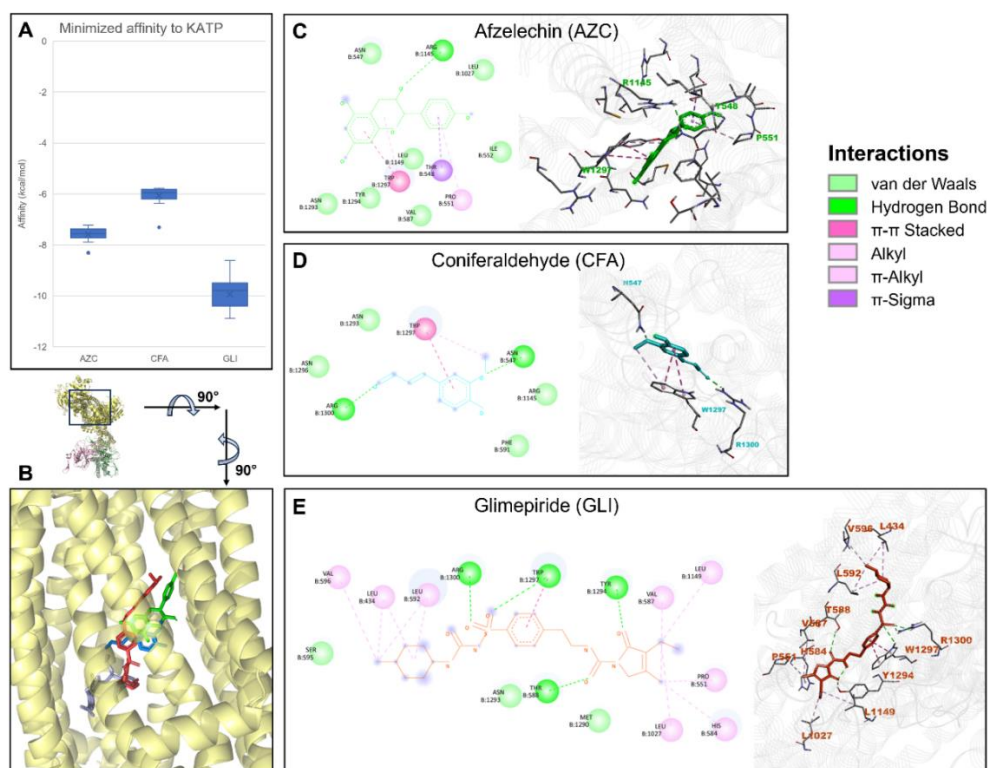
Afzelechin và acarbose có ái lực tương tự với maltase, dao động trong khoảng -8,5 đến -9,5 kcal/mol, cả hai đều cao hơn so với coniferaldehyd khoảng 5,5 đến 6,5 kcal/mol. Có những biến thể nhỏ giữa ái lực của các tư thế khác nhau của phối tử. Tuy nhiên, theo CNNscore dự đoán khả năng tạo dáng, sự khác biệt giữa các tư thế là sâu sắc hơn. Afzelechin và coniferaldehyd có phạm vi liên tứ phân vị CNNscores tương tự, trong khoảng 0,50 đến 0,65, mặc dù afzelechin có CNNscore tốt nhất thì cao hơn (ở mức 0,83); trong khi đó, acarbose có phạm vi liên tứ phân vị CNNscore thấp nhất vào khoảng 0,18 đến 0,22, với CNNscore tốt nhất ở mức 0,45. Theo mặc định của gnina, tư thế tốt nhất của mỗi phối tử được chọn dựa trên CNNscore. Tư thế tốt nhất của cả 3 hợp chất đều nằm trong vị trí kích hoạt được dự đoán bằng maltase (vị trí 1). Afzelechin liên quan đến nhiều tương tác khác nhau bao gồm liên kết hydro (Q181, D214, R312), π - π hình chữ T (Y71, F158) và π -cation (D349, R439, R312); coniferaldehyd chủ yếu tham gia vào các tương tác π -alkyl (F157, L218, H239, A278, H279) với một liên kết hydro (N241); acarbose liên kết với vị trí 2 và chủ yếu liên quan đến liên kết hydro (D68, D214, E276, H279, P309, R312, D408) với một tương tác π -alkyl (F300). CNNscores có thể dự đoán rằng hoạt tính ức chế *in vitro* của acarbose là thấp nhất, điều mà điểm ái lực không thể dự đoán được; tuy nhiên, cả hai điểm đều không dự đoán được hoạt tính *in vitro* cao nhất của coniferaldehyd.

PHỤ LỤC 20.2. TRÊN MỤC TIÊU K_{ATP}



Hình 20.3. Cấu trúc tổng thể của kênh K_{ATP} phức tạp với ATPγS và Repaglinid

(A) Tám tiểu đơn vị của kênh K_{ATP} được biểu thị bằng các dải màu khác nhau, ATPγS (một chất tương tự ATP) và Repaglinide (một chất ức chế) lần lượt được biểu thị bằng các phân tử bóng có màu đỏ và xanh lục. (B) Phân cấu trúc của kênh K_{ATP} được sử dụng để lắp ghép phân tử bao gồm một tiểu đơn vị SUR1 và hai tiểu đơn vị KIR6 liên kế



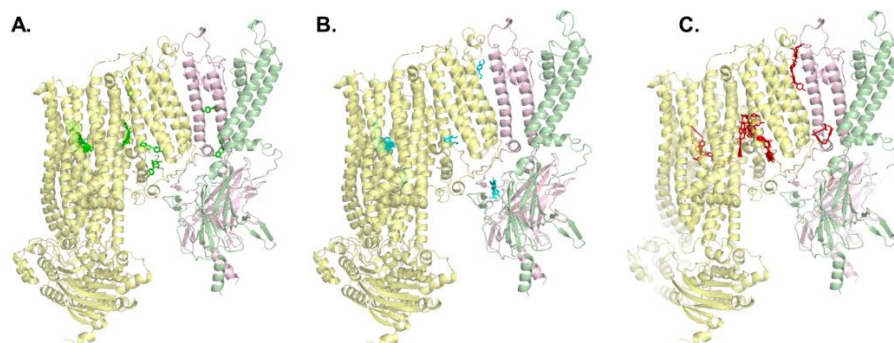
Hình 20.4. Kết quả lắp ghép cấu trúc K_{ATP} với các phối tử

(A) Mô tả sự phân bố ái lực tối thiểu (càng thấp càng tốt) của các vị trí lắp ghép của AZC, CFA và GLI với cấu trúc K_{ATP}. (B) Tư thế lắp ghép tốt nhất của AZC (xanh lá cây), CFA (xanh dương) và GLI (đỏ) trong cấu trúc K_{ATP}, phân tử repaglinid liên kết được thể hiện bằng màu tím. (C, D, E) Cấu trúc 2D và 3D về tư thế lắp ghép tốt nhất của AZC, CFA và GLI cũng như sự tương tác của chúng với cấu trúc K_{ATP}. (AZC) Afzelechin, (CFA) Coniferaldehyd, (GLI) Glimepirid

Kết quả ở **hình 20.4** cho thấy:

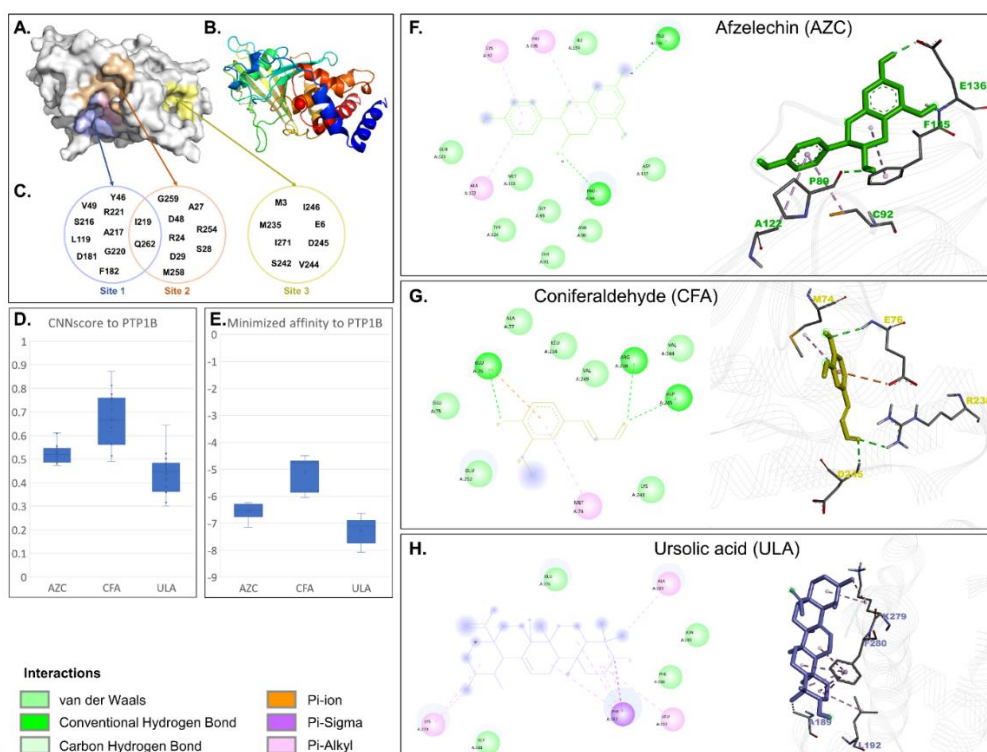
Afzelechin, coniferaldehyd và glimepirid đều gắn vào cấu trúc của kênh K_{ATP}. Nhìn chung, glimepirid có ái lực cao nhất với K_{ATP} (từ -10,9 đến -8,6 kcal/mol), tiếp theo là afzelechin (-8,3 đến -7,2 kcal/mol) và coniferaldehyd (-7,3 đến -5,8 kcal/mol). Phần lớn các tư thế của glimepirid liên kết với khoảng trống giữa miền xuyên màng 0 (TMD0) và TMD1 của tiểu đơn vị SUR1 trong khi hầu hết các tư thế của afzelechin và coniferaldehyd liên kết với khoảng trống giữa TMD1 và TMD2 của tiểu đơn vị SUR1 (**Hình 20.5**). Tuy nhiên, tư thế tốt nhất của cả 3 hợp chất liên kết vào cùng một khu vực giữa TMD1 và TMD 2 của tiểu đơn vị SUR1, gần với vị trí liên kết của chất ức chế Repaglinid. Afzelechin có hai tương tác alkyl (W1297 và P551), tương tác xếp chồng π - π (W1297), tương tác π -sigma (T548) và liên kết hydro (R1145).

Coniferaldehyd tương tác với R1300 và N547 thông qua liên kết hydro và với W1297 thông qua xếp chồng π - π (Hình 6d). Trong khi đó, glimepirid có tương tác mạnh hơn thông qua liên kết hydro (R1300, W1297 và Y1294) và tương tác alkyl (V596, L434, L592, V587, L1149, P551, H584 và L1027).



Hình 20.5. Tất cả 15 tư thể lắp ghép của (A) afzelechin, (B) coniferaldehyd và (C) glimepirid với kênh K_{ATP} được tạo ra từ phân tích lắp ghép

PHỤ LỤC 20.3. TRÊN MỤC TIÊU PTP1B



Hình 20.6. Cấu trúc của PTP1B và kết quả lắp ghép của PTP1B với 3 phối tử
(A) Biểu diễn bề mặt của cấu trúc PTP1B với các vị trí liên kết được dự đoán. (B) Biểu diễn dải băng của cấu trúc PTP1B với dải màu từ xanh đậm của đầu N đến màu đỏ của đầu C. (C) Biểu

diễn bề mặt của các vị trí liên kết được dự đoán và dự lượng cấu thành của chúng. (D, E) Biểu đồ mô tả sự phân bố CNNscore (càng cao càng tốt) và ái lực tối thiểu (càng thấp càng tốt) của vị trí lắp ghép của 3 phối tử với PTP1B. (F, G, H) Cấu trúc 2D và 3D về tư thế lắp ghép CNNscore tốt nhất của 3 phối tử và sự tương tác của chúng với PTP1B. (AZC) Afzelechin, (CFA)

Coniferaldehyd, (ULA) Acid ursolic

Kết quả ở **hình 20.6** cho thấy:

PTP1B được dự đoán sẽ có ba vị trí liên kết. Vị trí liên kết 1 và 2 đều tạo thành vị trí hoạt động của enzym trong khi vị trí 3 có thể là vị trí allosteric (dị lập thể). Afzelechin, coniferaldehyd và acid ursolic đều gắn vào cấu trúc PTP1B.

Acid ursolic được dự đoán có ái lực cao nhất với PTP1B (từ -8 đến -6,8 kcal/mol), tiếp theo là afzelechin (từ -7 đến -6,2 kcal/mol) và coniferaldehyd (từ -6 đến -4,5 kcal/mol). Trong khi đó, phạm vi liên tứ phân vị CNNscore của acid ursolic là thấp nhất vào khoảng 0,37 đến 0,48, tiếp theo là afzelechin ở mức 0,48 đến 0,54 và coniferaldehyd ở mức 0,57 đến 0,77. CNNscore tốt nhất của acid ursolic cao hơn afzelechin nhưng vẫn thấp hơn so với coniferaldehyd. Đặc biệt, tư thế tốt nhất của 3 phối tử đều nằm ngoài 3 vị trí liên kết được dự đoán của PTP1B và cách xa nhau. Afzelechin liên quan đến liên kết hydro (P89, E136) và tương tác π -alkyl (C92, A122, F135). Coniferaldehyd còn có các liên kết hydro (E76, R238, D245), tương tác π -alkyl (M74), π -ion (E76). Trong khi đó, acid ursolic chủ yếu tham gia vào các tương tác π -alkyl và alkyl (A189, L192, K279, L192). Cả điểm ái lực và CNNscore đều có thể dự đoán rằng acid ursolic có hoạt tính ức chế cao hơn afzelechin. Tuy nhiên, cả hai kết quả đều ước tính quá cao và quá thấp hoạt động ức chế của coniferaldehyd.

PHỤ LỤC 20.4. ĐẶC TÍNH HÓA LÝ VÀ MỨC ĐỘ GIỐNG THUỐC

Bảng 20.1. Đặc tính hoá lý và mức độ giống thuốc của afzelechin (AZC), coniferaldehyd (CFA), ursolic acid (ULA) và acarbose (ACB).

Hợp chất		AZC	CFA	ULA	ACB
Đặc tính lý hoá	MW (dalton)	274,08	178,06	456,36	645,25
	Số liên kết nhận H	5	3	3	19
	Số liên kết cho H	4	1	2	14
	Số liên kết có thể xoay	1	3	1	9
	LogP	1,877	1,708	6,083	-4,370

Mức độ giống thuốc	LogS	-2,753	-1,919	-4,383	0,377
	QED	0,637	0,565	0,414	0,103
	Luật Lipinski	Chấp nhận	Chấp nhận	Chấp nhận	Không chấp nhận
	Cảnh báo PAINS	0	0	0	0

Kết quả ở **bảng 20.1** cho thấy:

Các đặc tính hóa lý của 4 hợp chất đáp ứng quy tắc năm Lipinski đối với các hợp chất giống thuốc có hoạt tính qua đường uống. Xét về ước tính độ giống thuốc (QED, Quantitative Estimate of Druglikeness), afzelechin có điểm cao nhất, tiếp theo là coniferaldehyd, acid ursolic và acarbose. Cả 4 hợp chất không kích hoạt bất kỳ cảnh báo nào về PAINS (Pan Assay Interference Compounds).

PHỤ LỤC 20.5. ĐẶC TÍNH ADMET

Bảng 20.2. Đặc tính ADMET của afzelechin (AZC), coniferaldehyd (CFA), acid ursolic (ULA) và acarbose (ACB)

Hợp chất		AZC	CFA	ULA	ACB
Hấp thu	Hấp thu GI	Cao	Cao	Cao	Thấp
	Cơ chất Pgp	---	---	---	+++
Phân bố	PPB	88,86%	89,34%	97,44%	22,64%
	Sự xâm nhập BBB	---	++	--	-
Chuyển hoá	Ức chế CYP1A2	-	++	---	---
	Cơ chất CYP1A2	--	++	-	---
	Ức chế CYP2C19	--	--	---	---
	Cơ chất CYP2C19	---	-	+++	---
	Ức chế CYP2C9	-	---	--	---
	Cơ chất CYP2C9	+++	++	-	---
	Ức chế CYP2D6	+	---	---	---
	Cơ chất CYP2D6	++	+++	--	---
	Ức chế CYP3A4	+	---	-	---
	Cơ chất CYP3A4	--	--	-	---
Thải trừ	Độ thanh thải (ml/min/kg)	15,075	10,075	3,538	0,653

Hợp chất		AZC	CFA	ULA	ACB
Toxicity	LD ₅₀ (mg/kg)	2500	1560	2000	24000
	Độc tính trên gan	Không hoạt động	Hoạt động	Hoạt động	Hoạt động
	Độc tính gây ung thư	Không hoạt động	Không hoạt động	Hoạt động	Không hoạt động
	Độc tính miễn dịch	Không hoạt động	Hoạt động	Hoạt động	Hoạt động
	Gây đột biến	Không hoạt động	Không hoạt động	Không hoạt động	Không hoạt động
	Độc tính	Không hoạt động	Không hoạt động	Không hoạt động	Không hoạt động

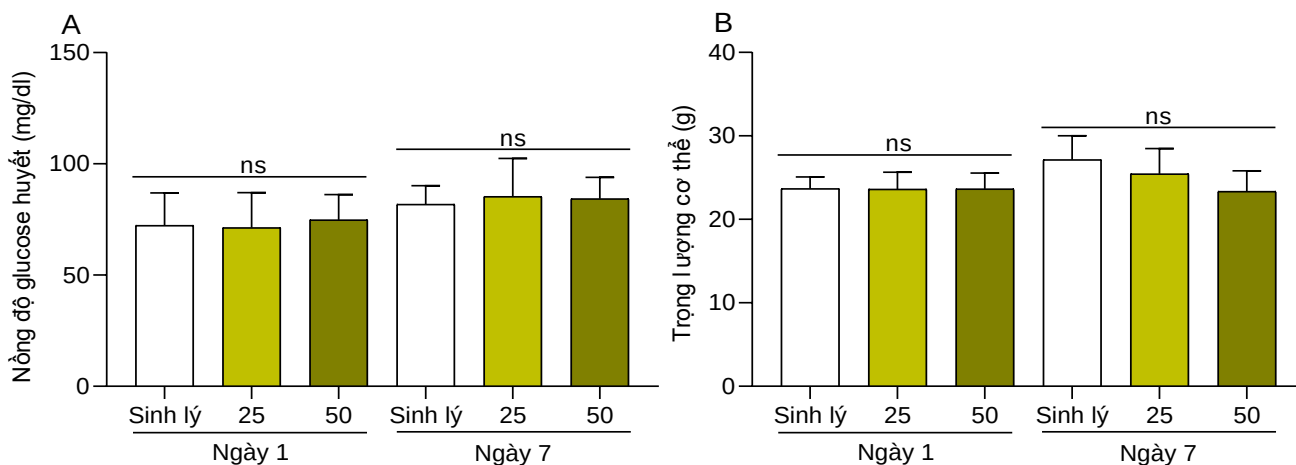
GI: Gastrointestinal (Đường tiêu hoá), Pgp: P-glycoprotein, PPB: Plasma protein binding (Liên kết protein huyết tương), BBB: Blood-brain barrier (Hàng rào máu não). Các giá trị xác suất được hiển thị dưới dạng ký hiệu - và +, từ rất khó xảy ra (---) đến rất có khả năng (+++). Các đặc tính mong muốn, trung tính và không mong muốn được đánh dấu tương ứng bằng màu xanh lá cây, đen và đỏ

Kết quả ở **bảng 20.2** cho thấy:

Ngoại trừ acarbose, 3 hợp chất còn lại có khả năng hấp thu tốt ở ruột, không phải là cơ chất của P-glycoprotein và có thể được chuyển hóa bởi ít nhất một enzym cytochrom P₄₅₀, tất cả đều thích hợp hơn về khả năng tạo thuốc. Ngoại trừ coniferaldehyd, các hợp chất còn lại đều có khả năng xuyên qua hàng rào máu não kém; đây không phải là vấn đề đối với thuốc ức chế α -glucosidase hoạt động ở ruột non nhưng có thể là vấn đề đối với thuốc ức chế PTP1B hoạt động trong tế bào não. Afzelechin và coniferaldehyd có khả năng thải trừ tốt trong khi acid ursolic và acarbose có khả năng thải trừ kém.

Acarbose có độc tính cấp tính rất thấp với giá trị LD₅₀ cao ở mức 24000 mg/kg. Các hợp chất còn lại có giá trị LD₅₀ dao động từ 1560 đến 2500 mg/kg. Afzelechin không kích hoạt bất kỳ độc tính nào trong 5 loại độc tính trong khi 3 hợp chất còn lại có khả năng gây độc tính trên gan, độc tính miễn dịch hoặc độc tính gây ung thư.

PHỤ LỤC 21. KẾT QUẢ ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT ETHANOL LÊN NỒNG ĐỘ GLUCOSE HUYẾT VÀ CÂN NẶNG CỦA CHUỘT BÌNH THƯỜNG



Hình 21.1. Tác động của cao chiết hạt ethanol từ hạt chuối cô đơn lên nồng độ glucose huyết và trọng lượng cơ thể của chuột bình thường sau 7 ngày uống

25 và 50: Cao chiết 25 và 50 mg/kg. $^{ns}p > 0,05$: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Phép kiểm Tukey)

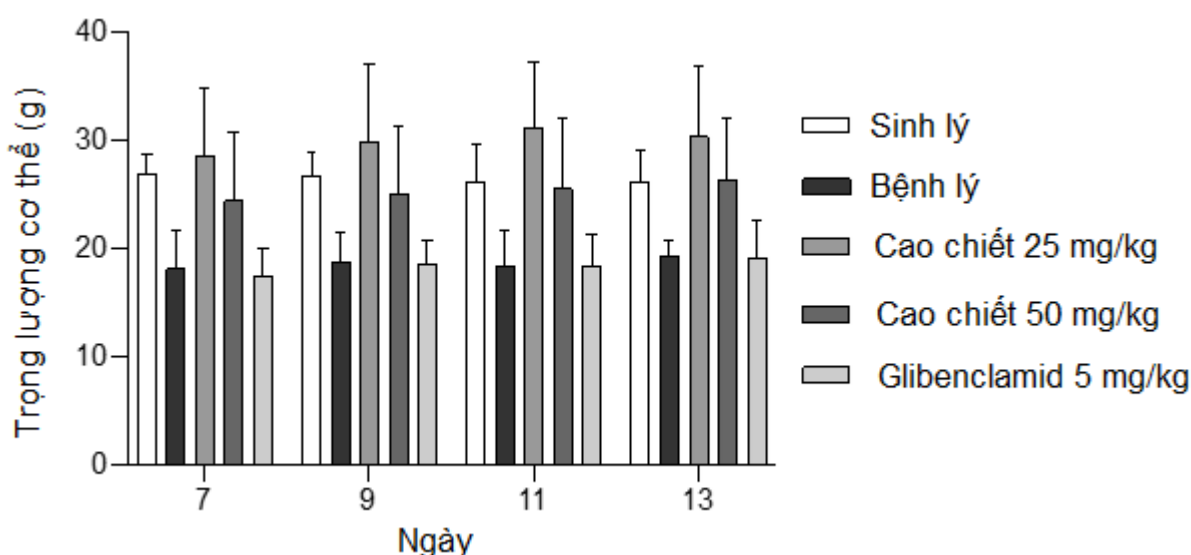
Kết quả ở **hình 21.1** cho thấy:

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ glucose huyết lúc đói của chuột trước và sau 7 ngày uống cao chiết hạt chuối cô đơn ở các liều thử nghiệm ($p > 0,05$).

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về trọng lượng cơ thể của chuột trước và sau 7 ngày uống cao chiết hạt chuối cô đơn ở các liều thử nghiệm ($p > 0,05$). Mặc dù vậy, cao chiết liều 25 và 50 mg/kg có xu hướng làm giảm nhẹ trọng lượng cơ thể chuột so với lô sinh lý sau 7 ngày uống.

PHỤ LỤC 22. KẾT QUẢ TÁC ĐỘNG CỦA CAO CHIẾT ETHANOL LÊN TRỌNG LƯỢNG CƠ THỂ, TRỌNG LƯỢNG CỦA CƠ QUAN VÀ TRỌNG LƯỢNG TƯƠNG ĐỐI CỦA CÁC CƠ QUAN

Trọng lượng cơ thể chuột được xác định bằng cân kỹ thuật số vào cùng lúc trong buổi sáng.



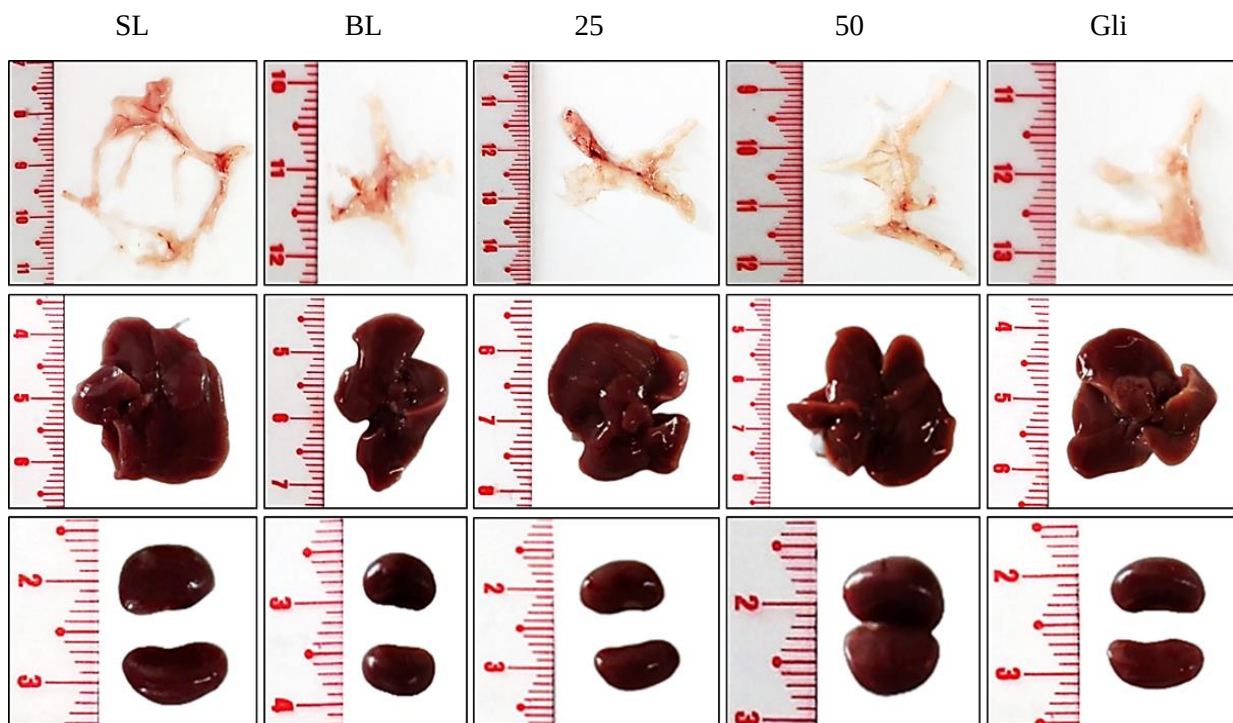
Hình 22.1. Trọng lượng cơ thể chuột ở các lô thử nghiệm ($n = 9$)

Kết quả ở **hình 22.1** cho thấy:

Sự chênh lệch về trọng lượng chuột vào ngày thứ 7 (ngày phân lô để bắt đầu điều trị) ở lô bệnh lý và các lô bệnh lý được điều trị là do các con chuột tăng glucose huyết (>200 mg/dl) được phân vào các lô thử nghiệm sao cho nồng độ glucose huyết giữa các lô này là tương đương nhau (ưu tiên chỉ tiêu glucose huyết, không ưu tiên chỉ tiêu cân nặng).

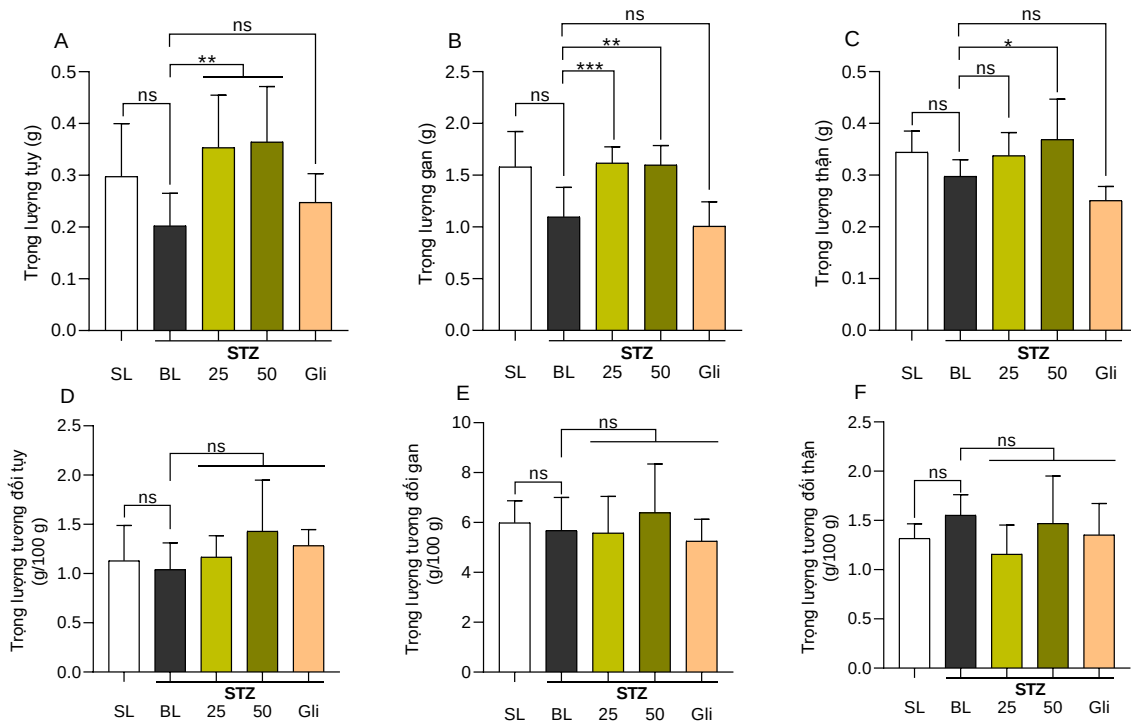
Trọng lượng trung bình của chuột ở lô bệnh lý và lô bệnh lý được điều trị với glibenclamid 5 mg/kg khoảng dưới 20 g, trong khi các lô còn lại duy trì cân nặng khoảng trên 25 g trong quá trình thử nghiệm. Nhìn chung, cao chiết ở 2 liều khảo sát thể hiện tác động cải thiện nhẹ trọng lượng cơ thể chuột sau 7 ngày điều trị.

Khi kết thúc thí nghiệm, các cơ quan của chuột bao gồm tụy, gan, thận được thu và quan sát đại thể. Trọng lượng tương đối (TLTĐ) của các cơ quan được tính theo công thức: $TLTĐ = [\text{Trọng lượng cơ quan (g)} / \text{Trọng lượng cơ thể tại thời điểm an tử (g)}] \times 100$.



Hình 22.2. Hình ảnh đại thể của tụy, gan và thận chuột ở các lô thử nghiệm

SL: Sinh lý, BL: Bệnh lý, 25 và 50: Cao chiết 25 và 50 mg/kg, Gli: Glibenclamid liều 5 mg/kg



Hình 22.3. Trọng lượng và trọng lượng tương đối của các cơ quan của chuột sau 7 ngày điều trị với cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ

(A, B, C) Trọng lượng của tụy, gan và thận; (D, E, F) Trọng lượng tương đối của tụy, gan và thận ($n = 9$). $^{ns}p > 0,05$: không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$ và $^{***}p < 0,001$: khác biệt có ý nghĩa thống kê (Phép kiểm Tukey). SL: Sinh lý, BL: Bệnh lý, 25 và 50: Cao chiết 25 và 50 mg/kg, Gli: Glibenclamid liều 5 mg/kg

Kết quả ở **hình 22.3** cho thấy:

Trọng lượng tụy, gan và thận ở lô bệnh lý thấp hơn so với lô sinh lý nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Cao chiết ở các liều khảo sát thể hiện tác dụng cải thiện trọng lượng tụy, gan và thận so với lô bệnh lý ($p < 0,05$). Trong khi đó, glibenclamid liều 5 mg/kg chưa thể hiện tác động này ($p > 0,05$). Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ trọng tương đối của cả ba cơ quan này giữa lô bệnh lý và lô sinh lý cũng như lô bệnh lý và các lô bệnh lý được điều trị.

**PHỤ LỤC 23. KẾT QUẢ TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE HUYẾT CỦA CAO CHIẾT
ETHANAOL TRÊN MÔ HÌNH CHUỘT GÂY TĂNG GLUCOSE HUYẾT BỞI STZ
(LẬP LẠI THỬ NGHIỆM LẦN THỨ 2)**

**Bảng 23.1. Tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết ethanol từ hạt chuối cô đơn trên mô
hình gây tăng glucose huyết bởi STZ**

Lô	Nồng độ glucose huyết (mg/dl)			Trọng lượng cơ thể (g)		
	Ban đầu	Trước điều trị	Sau điều trị	Ban đầu	Trước điều trị	Sau điều trị
Sinh lý	103,06 ± 14,27	106,83 ± 17,36***	116,69 ± 17,00	25,83 ± 0,95	28,57 ± 2,45	32,20 ± 3,36 ^{\$, \$\$\$}
Bệnh lý	96,08 ± 17,71	309,76 ± 93,62 ^{\$\$\$} (↑189,96%)	251,94 ± 97,47 ^{****, \$\$} (↑115,91%)	25,10 ± 1,87	22,66 ± 5,03*	21,90 ± 2,46 ^{####}
Cao chiết 25 mg/kg	91,17 ± 15,44	306,32 ± 75,32 ^{@@@} (↑186,74%)	109,97 ± 14,72 (↓56,35%)	25,77 ± 1,38	23,88 ± 4,54*	26,26 ± 5,45
Cao chiết 50 mg/kg	97,14 ± 14,77	309,06 ± 79,08 ^{@@@} (↑189,30%)	92,63 ± 17,56 (↓63,23%)	25,36 ± 1,63	23,66 ± 4,94*	26,58 ± 5,48
Glibenclamid 5 mg/kg	98,39 ± 13,11	300,96 ± 92,96 ^{@@@} (↑181,72%)	88,25 ± 22,12 (↓64,97%)	25,63 ± 1,69	22,64 ± 3,83*	23,19 ± 4,25

(↑a% hoặc ↓b%): Phần trăm tăng hoặc giảm nồng độ glucose huyết so với lô sinh lý hoặc bệnh lý ở cùng thời điểm. Trung bình ± SD (n = 9). ***p < 0,001: so với các lô còn lại, ****p < 0,0001: so với các lô còn lại, *p < 0,05: so với lô sinh lý, ####p < 0,0001: so với lô sinh lý, \$p < 0,05: so với trước điều trị; \$\$\$p < 0,0001: so với ban đầu, \$\$p < 0,01 and \$\$\$p < 0,001: so với ban đầu, @@@p < 0,0001: so với ban đầu và sau điều trị (Phép kiểm Tukey)

Kết quả ở **bảng 23.1** cho thấy:

Về nồng độ glucose huyết:

Ở thời điểm ban đầu, nồng độ glucose huyết của các lô thử nghiệm tương đương nhau (p > 0,05).

Ở thời điểm trước điều trị, nồng độ glucose huyết của lô bệnh lý và các lô bệnh lý được điều trị cao hơn ($> 180\%$) có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,001$). Nồng độ glucose huyết của lô bệnh lý và các lô bệnh lý được điều trị tương đương nhau ($p > 0,05$).

Ở thời điểm sau 7 ngày điều trị, nồng độ glucose huyết của lô bệnh lý cao hơn (115,91%) có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Nồng độ glucose huyết của các lô bệnh lý được điều trị thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý ($p < 0,0001$).

Về trọng lượng cơ thể:

Ở thời điểm ban đầu, trọng lượng cơ thể chuột của các lô thử nghiệm tương đương nhau ($p > 0,05$).

Ở thời điểm trước điều trị, trọng lượng cơ thể chuột của lô bệnh lý và các lô bệnh lý được điều trị thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Trọng lượng cơ thể chuột của lô bệnh lý và các lô bệnh lý được điều trị tương đương nhau ($p > 0,05$).

Ở thời điểm sau 7 ngày điều trị, trọng lượng cơ thể chuột của lô bệnh lý thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ($p < 0,0001$). Trọng lượng cơ thể chuột của các lô bệnh lý được điều trị cao hơn so với lô bệnh lý nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, cao chiết hạt chuối cô đơn liều 25 và 50 mg/kg có tác dụng hạ glucose huyết trên mô hình chuột gây tăng glucose huyết bởi STZ. Đồng thời, cao chiết ở 2 liều này cũng thể hiện tác động cải thiện nhẹ trọng lượng cơ thể chuột sau 7 ngày điều trị.