

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NCS. PHẠM THỊ LAN

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG
CHỐNG ĐÁI THÁO ĐƯỜNG CỦA
LÁ CÂY XÁU HỔ (*Mimosa Pudica* L.)
TRÊN THỰC NGHIỆM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

NCS. PHẠM THỊ LAN

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG
CHỐNG ĐÁI THÁO ĐƯỜNG CỦA
LÁ CÂY XẤU HỔ (*Mimosa Pudica* L.)
TRÊN THỰC NGHIỆM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LÝ – DƯỢC LÂM SÀNG

MÃ SỐ: 9720205

Người hướng dẫn khoa học:

- PGS TS. Bùi Thanh Tùng
- PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của **PGS.TS. Bùi Thanh Tùng** và **PGS. TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng**.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Phạm Thị Lan

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ tận tình của quý thầy cô, bạn bè đồng nghiệp và các nhà khoa học thuộc lĩnh vực y dược, sự ủng hộ, động viên của gia đình, bạn bè và người thân.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất đến:

PGS.TS. Bùi Thanh Tùng và **PGS. TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng**, những người thầy đã tận tình dìu dắt, chỉ bảo, giúp đỡ và động viên tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **Ban Giám đốc Viện Dược liệu; Khoa Dược lý-Sinh hóa ; Khoa Hóa Thực vật Viện Dược liệu; Phòng Quản lý Khoa học, Ban lãnh đạo và các thầy cô trong Khoa Dược- Trường Đại học Kinh doanh và Công nghệ Hà Nội** đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới: **GS. Sun Youn Kim, Đại Học Gachon, Hàn Quốc** đã giúp đỡ rất nhiều trong các thí nghiệm của luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể **Phòng Khoa học và Đào tạo** cùng các phòng ban có liên quan của **Viện Dược liệu, Bộ môn Dược lý- Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia** đã hết lòng giúp đỡ tôi trong suốt thời gian tôi thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè người thân và đồng nghiệp của tôi, những người luôn sát cánh bên tôi, sẻ chia những lúc khó khăn nhất, ủng hộ, động viên và hỗ trợ mọi mặt để tôi hoàn thành luận án này.

NCS. Phạm Thị Lan.

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC 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 bệnh đái tháo đường	3
1.1.1. Phân loại ĐTĐ	3
1.1.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh bệnh ĐTĐ típ 2	4
1.2. Một số đích phân tử trong điều trị đái tháo đường típ 2	9
1.2.1. 5'- Adenosin monophosphat-activated protein kinase (AMPK)	9
1.2.2. Alpha-glucosidase (α -glucosidase)	9
1.2.3. Protein tyrosin phosphatase 1B (PTP-1B)	10
1.2.4. Advanced glycation end products (AGEs)	11
1.2.5. Methyl glyoxal và sự hình thành các AGEs	12
1.3. Các biến chứng của bệnh ĐTĐ	16
1.3.1. Các biến chứng cấp tính:	16
1.3.2. Biến chứng thận do đái tháo đường	16
1.3.3. Các biến chứng khác của đái tháo đường	17
1.4. Các nhóm thuốc dùng trong điều trị ĐTĐ	18
1.4.1. Insulin	18
1.4.2. Các thuốc làm tăng tiết insulin	20
1.4.3. Các thuốc làm tăng nhạy cảm của tế bào đích với insulin:	22
1.4.4. Thuốc ức chế enzym alpha- glucosidase	23
1.4.5. Chất ức chế đồng vận chuyển natri-glucose 2 (SGLT-2i)	24
1.4.6. Các thuốc điều trị đái tháo đường khác	24
1.5. Một số mô hình gây micrĐTĐ típ 2 thực nghiệm trên động vật	25
1.5.1. Mô hình streptozotocin/ alloxan	26
1.5.2. Mô hình ăn chế độ ăn giàu chất béo	27
1.5.3. Mô hình kết hợp chế độ ăn giàu chất béo và STZ.	27
1.5.4. Mô hình gây ĐTĐ típ 2 bằng phương pháp biến đổi gen	28
1.5.5. Mô hình ĐTĐ típ 2 nguyên phát:	28
1.6. Tổng quan về nghiên cứu in silico	28
1.6.1. Docking phân tử (Molecular docking)	29
1.6.2. Mô phỏng động lực học phân tử	31
1.6.3. Sàng lọc các hợp chất giống thuốc	32
1.6.4. Dự đoán ADMET	32
1.7. Tổng quan về cây Xấu hổ	33
1.7.1. Vị trí phân loại:	33
1.7.2. Đặc điểm thực vật và phân bố	33
1.7.3. Thành phần hóa học	34
1.7.4. Tác dụng dược lý	36

Chương 2. NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
2.1. Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu.....	39
2.1.1. Dược liệu nghiên cứu	39
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu.....	39
2.1.3. Thiết kế liều thử cho mẫu nghiên cứu.....	39
2.1.4. Động vật thí nghiệm	39
2.1.5. Hóa chất, thuốc thử.....	40
2.1.6. Trang thiết bị, phương tiện, dụng cụ	41
2.1.7. Địa điểm nghiên cứu.....	43
2.2. Nội dung nghiên cứu:	43
2.3. Phương pháp nghiên cứu	45
2.3.1. Phương pháp thử nghiệm dung nạp glucose.....	45
2.3.2. Phương pháp đánh giá các tác dụng của phân đoạn có tác dụng tốt nhất trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ kiểu típ 2 do chế độ ăn giàu chất béo và streptozotocin.....	47
2.3.3. Nghiên cứu tác dụng ức chế enzym α - glucosidase và PTP-1B của hợp chất chính phân lập được từ cây Xấu hổ (<i>Mimosa pudica</i> L.) trên mô hình in silico	56
2.3.4. Nghiên cứu tác dụng ức chế enzym α - glucosidase và PTP-1B của hợp chất chính phân lập được từ cây Xấu hổ (<i>Mimosa pudica</i> L.) in vitro.....	59
2.3.5. Tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với độc tính glucose trên dòng tế bào HUVECs	60
2.3.6. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra	62
2.3.7. Phương pháp đánh giá tác dụng của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất đối với thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs)	64
2.4. Xử lý số liệu	64
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	66
3.1. Đánh giá tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm.	66
3.1.1. Kết quả đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao toàn phần (MP) và các cao phân đoạn theo phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) trên chuột bình thường	66
3.1.2. Kết quả đánh giá tác dụng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do chế độ ăn giàu chất béo và streptozotocin.	68
3.1.2.1. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ glucose máu	68
3.1.2.2. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ lipid máu	69

3.1.2.3. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên microalbumin niệu	70
3.1.2.4. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ creatinin máu, creatinin niệu và hệ số thanh thải creatinin.....	71
3.1.2.5. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên tình trạng viêm ở mô thận chuột.....	73
3.1.2.6. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên quá trình stress oxy hóa ở chuột	75
3.1.2.7. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên mô bệnh học thận của chuột	79
3.2. Kết quả đánh giá cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ in vitro và in silico.	82
3.2.1. Kết quả in vitro thử tác dụng ức chế α -glucosidase và PTP-1B của các hợp chất phân lập được.	82
3.2.2. Kết quả in silico thử tác dụng ức chế α -glucosidase và PTP-1B của các hợp chất phân lập được.....	83
3.2.2.1. Đánh giá mô hình docking.....	83
3.2.2.2. Kết quả docking.....	85
3.2.2.3. Đánh giá khả năng giống thuốc theo quy tắc Lipinski.....	87
3.2.2.4. Phân tích các thông số dược động học (ADMET) của hai hợp chất	87
3.2.3. Kết quả động lực học phân tử	89
3.2.4. Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với độc tính methylglyoxal (MGO)	92
Chương 4. BÀN LUẬN	97
4.1. Về tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm:.....	98
4.1.1. Về đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết toàn phần và các phân đoạn của cao chiết lá cây Xấu hổ theo phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT)	98
4.1.2. Về kết quả tác dụng và cơ chế tác dụng của phân đoạn EtOAc trên mô hình gây bệnh ĐTĐ típ 2 trên chuột	101
4.2. Về cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ in vitro và in silico	109
4.2.1. Về cơ chế tác dụng ức chế hai enzym α -glucosidase và PTP-1B của hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic.....	109
4.2.2. Về tác dụng và cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào khi nồng độ đường huyết tăng cao của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất theo cơ chế giảm tác dụng độc tính của MGO	111
4.3. Bàn luận chung về tác dụng dược lý theo hướng điều trị bệnh đái tháo đường của cây Xấu hổ.....	113
4.4. Đóng góp mới của luận án.....	116
KẾT LUẬN.....	118

KIẾN NGHỊ.....	121
----------------	-----

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

TÀI LIỆU THAM KHẢO

PHỤ LỤC 1: Phiếu kết quả giám định mẫu cây Xấu hổ.

PHỤ LỤC 2: Phương pháp chiết xuất dược liệu và phân lập các hợp chất.

PHỤ LỤC 3: Phụ lục các phổ.

PHỤ LỤC 4: Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của cao Xấu hổ phân đoạn EtOAc.

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Giải nghĩa
1	AG	Alpha-glucosidase	Alpha-glucosidase
2	AGEs	Advanced glycation end products	Các sản phẩm cuối cùng của quá trình glycation
3	AMPK	Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase	Protein kinase hoạt hóa Adenosin 5'-monophosphat
4	BMI	Body mass index	Chỉ số khối cơ thể
5	BSA	Bovine Serum Albumin	Albumin huyết thanh bò
6	CAT	Catalase	Catalase
7	DKA	Diabetic ketoacidosis	Nhiễm toan ceton do đái tháo đường
8	DPP4	Dipeptidylpeptidase-4	
9	ĐTĐ	Đái tháo đường	
10	EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid	Ethylen diamin tetra acetic acid
11	ESI-MS	Electron spray ionization mass spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
12	ESRD	End-stage renal disease	Bệnh thận giai đoạn cuối
13	GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry	Sắc ký khí-khối phổ
14	GFR	glomerular filtration rate	Tốc độ lọc cầu thận
15	GLO1; GLO2	Glyoxalase 1; Glyoxalase 2	Glyoxalase 1; Glyoxalase 2
16	GLP	Glucagon-like peptide	Chuỗi peptid giống glucagon
17	GLUT 4	Glucose transporter type 4	Vận chuyển glucose loại 4
18	GPx	Glutathione peroxidase	Glutathion peroxidase

19	HBA	Hydrogen bond acceptor	Nhóm nhận liên kết hydro
20	HBD	Hydrogen bond deliver	Nhóm cho liên kết hydro
21	HIV- AIDS	Human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người
22	HLA	Human Leukocyte Antigen	Kháng nguyên bạch cầu người
23	HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose	Hydroxypropyl methylcellulose
24	HUVECs	Human umbilical vein endothelial cell	Tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người
25	IDF	International Diabetes Federation	Liên đoàn ĐTĐ quốc tế
26	IL1 β	Interleukine-1 beta	Interleukin-1 beta.
27	MDA	Malonyldialdehyde	Malonyldialdehyd
28	MGO	Methylglyoxal	Methylglyoxal
29	MP		Cao chiết toàn phần cao chiết lá cây Xấu hổ
30	MP-E		Phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ
31	MP-H		Phân đoạn n- hexan cao chiết lá cây Xấu hổ
32	MP-B		Phân đoạn butanol cao chiết lá cây Xấu hổ
33	NADPH oxydase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase	Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat oxidase
34	NPDR	Non-proliferative diabetic	Bệnh võng mạc do ĐTĐ

		retinopathy	không tăng sinh
35	OGTT	Oral glucose tolerance test	Thử nghiệm dung nạp glucose đường uống
36	PBS	Phosphate buffer solution	Dung dịch đệm phosphat
37	PDR	Proliferative diabetic retinopathy	Bệnh vông mạc do ĐTD có tăng sinh
38	PKC	Protein kinase C	Protein kinase C
39	PKI3	Phosphoinositide 3-kinase	Phosphoinositid 3-kinase
40	PMSF	Phenylmethanolsulfonyl fluoride	Phenylmethanolsulfonyl fluorid
41	PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	Thụ thể kích hoạt tăng sinh peroxisom γ
42	PTKs	Protein tyrosine kinases	Protein tyrosin kinases
43	PTPs	Protein tyrosine phosphatases	Protein tyrosin phosphatases
44	RMSD	root mean square deviation	Độ lệch bình phương trung bình gốc
45	SGLT-2i	sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors	Chất ức chế đồng vận chuyển natri-glucose-2
46	SOD	Superoxide effutase	Superoxid effutase
47	STZ	Streptozotocine	Streptozotocin
48	T2D	Type 2 diabetes	ĐTD típ 2
49	TGF β	Transforming growth factor beta	Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng β
50	TLC	Thin layer chromatography	Sắc kí lớp mỏng
51	TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha	Yếu tố hoại tử khối u α

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Nguyên nhân ĐTD nguyên phát	4
Bảng 1.2. Một số loại insulin.....	19
Bảng 1.3. Lượng flavonoid toàn phần- total flavonoid (TF) và lượng phenol toàn phần- total phenolic (TP) có trong căn chiết từ toàn thân cây Xấu hổ và căn chiết của từng bộ phận riêng biệt như: lá, hạt, thân cây Xấu hổ.....	34
Bảng 2.1. Một số hóa chất, thuốc thử chính sử dụng	40
Bảng 2.2. Một số trang thiết bị, dụng cụ chính sử dụng	42
Bảng 3.1. Kết quả thử nghiệm dung nạp glucose đường uống với cao toàn phần và các phân đoạn cao chiết lá cây Xấu hổ	66
Bảng 3.2. Kết quả thử nghiệm dung nạp glucose đường uống đối với phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ	67
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ lipid máu ngày thứ 60.....	69
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ creatinin máu, creatinin niệu và hệ số thanh thải creatinin ngày thứ 60.	71
Bảng 3.5. Tác dụng ức chế enzym α -glucosidase và PTP-1B của các hợp chất phân lập được	83
Bảng 3.6. Kết quả docking các hợp chất.....	85
Bảng 3.7. Kết quả phân tích quy tắc Lipinski 5 của 2 hợp chất.....	87
Bảng 3.8. Kết quả dự đoán ADMET	88

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Con đường truyền tin nội bào của insulin.....	6
Hình 1.2. Cơ chế phân tử của tính kháng insulin	7
Hình 1.3. Sự hình thành MGO và AGEs trong bệnh ĐTĐ típ 2.....	15
Hình 2.1. Sơ đồ chung về các nội dung nghiên cứu	44
Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm dung nạp glucose đường uống với cao tổng và các phân đoạn cao chiết lá cây Xấu hổ	46
Hình 2.3. Thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng của các mẫu nghiên cứu có tác dụng tốt nhất trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ	49
Hình 2.4. Nguyên lý của phương pháp MTT	61
Hình 3.1. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ glucose máu ở chuột.....	68
Hình 3.2 Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên microalbumin niệu ngày thứ 60	70
Hình 3.3. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ TNF – α trên mô thận chuột ngày thứ 60.....	73
Hình 3.4. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ IL-1 β trên mô thận chuột ngày thứ 60	74
Hình 3.5. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên quá trình peroxy hóa lipid ngày thứ 60.....	75
Hình 3.6. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ SOD ngày thứ 60.....	76
Hình 3.7. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ CAT ngày thứ 60.....	77
Hình 3.8. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ GPx ngày thứ 60.....	78
Hình 3.9. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm thường (HE x 400)	80
Hình 3.10. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm chứng bệnh (HE x 400) .	80
Hình 3.11. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm được điều trị với glyclazid 5 mg/kg (HE x 400) ngày thứ 60.	81

Hình 3.12. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm được điều trị với cao chiết MP- E liều 50 mg/kg (HE x 400) ngày thứ 60.	81
Hình 3.13. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm được điều trị với cao chiết MP- E liều 100 mg/kg (HE x 400) ngày thứ 60.	82
Hình 3.14. Vùng hoạt động và kết quả redock của hai mục tiêu.	84
Hình 3.15. Minh họa 2D tương tác giữa hai phối tử đồng tinh thể và protein của chúng.	85
Hình 3.16. Minh họa 2D tương tác giữa hai hợp chất và mục tiêu.	86
Hình 3.17. RMSD của phức hợp isomaltase-acid protocatechuic (A) phức hợp PTP-1B-acid protocatechuic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử.	90
Hình 3.18. Năng lượng tự do của phức hợp isomaltase- acid protocatechuic (A) phức hợp PTP-1B- acid protocatechuic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử.	90
Hình 3.19. RMSD của phức hợp isomaltase- acid syringic (A) phức hợp PTP-1B- acid syringic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử.	91
Hình 3.20. Năng lượng tự do của phức hợp isomaltase- acid syringic (A) phức hợp PTP-1B- acid syringic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử. ..	91
Hình 3.21. Tỷ lệ sống sót của tế bào HUVECs sau khi được điều trị với phân đoạn EtOAc và hai hợp chất và aminoguanidin trong hai trường hợp có và không có MGO.....	93
Hình 3.22. Khả năng ức chế hình thành AGEs do MGO gây ra sau khi điều trị bằng của các mẫu thử	94
Hình 3.23. Khả năng phá vỡ AGEs của các mẫu thử được nghiên cứu thông qua số lượng amin tự do sinh ra sau phản ứng MGO-BSA.....	96
Hình 4.1. Tóm tắt kết quả nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng của cây Xấu hổ trong hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ	114

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đái tháo đường (ĐTĐ) là một rối loạn chuyển hóa mạn tính với tỷ lệ mắc bệnh đang gia tăng nhanh chóng trong những năm gần đây, đặc trưng bởi lượng đường huyết tăng cao dẫn đến suy giảm nghiêm trọng chức năng tim mạch, mắt, thận và thần kinh. Bệnh ĐTĐ típ 2 là do sự đề kháng với insulin hoặc thiếu insulin do tế bào β tuyến tụy tiết ra không đủ hoặc kết hợp cả hai [1]. Theo dữ liệu gần đây nhất của Liên đoàn Đái tháo đường Thế giới (International Diabetes Federation - IDF): 537 triệu người- khoảng 10,5% tổng số người trong độ tuổi 20-79 trên thế giới đang chung sống với bệnh đái tháo đường tính đến năm 2021. Con số này dự kiến sẽ tăng lên 643 triệu vào năm 2030 và 783 triệu vào năm 2045 [2]. Hơn nữa, ước tính có khoảng 240 triệu người mắc bệnh đái tháo đường hiện chưa được chẩn đoán. Tại Việt Nam, kết quả điều tra của Bộ Y tế năm 2021 cho thấy tỷ lệ mắc đái tháo đường ở người trưởng thành ước tính là 7,1%, tương đương với khoảng gần 5 triệu người đang mắc bệnh đái tháo đường. Trong đó, số đã được chẩn đoán chỉ chiếm khoảng 35% và số đang được quản lý, điều trị tại các cơ sở y tế chiếm 23,3%. Theo dự báo, số mắc đái tháo đường của Việt Nam cũng như toàn thế giới sẽ tiếp tục tăng nhanh trong những năm tới [3]. Hiện nay có một số nhóm thuốc điều trị ĐTĐ nhưng hiệu quả còn hạn chế, các thuốc hầu như không có tác dụng hạ glucose huyết lâu dài kể cả khi đã dùng phối hợp, hiệu quả ngăn ngừa biến chứng thấp, còn nhiều tác dụng không mong muốn, một số thuốc gây tăng cân, gây hạ đường huyết quá mức, buồn nôn, nôn, tiêu chảy... Do vậy, nghiên cứu các thuốc điều trị ĐTĐ hiệu quả và ít tác dụng phụ là rất cần thiết.

Tại các nước có nền y học cổ truyền phát triển như Việt Nam, bên cạnh các phương pháp y học hiện đại, các bài thuốc, vị thuốc đang được nghiên cứu ngày càng sâu để góp phần điều trị các bệnh, trong đó có bệnh đái tháo đường. Cây Xấu hổ là một dược liệu mọc hoang ở nhiều vùng của nước ta và đã được chứng minh sơ bộ là có tác dụng chống viêm, an thần, giảm đường huyết và có thể có tác dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường. Nguồn cung cấp nguyên liệu

về cây Xấu hổ rất tiềm năng. Việc phát triển các dược liệu thành thuốc hoặc các sản phẩm bảo vệ sức khỏe theo hướng chống đái tháo đường đang rất cần thiết. Các nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy cây Xấu hổ chứa các nhóm hợp chất như alkaloid, terpenoid, glycoprotein, crocetin dimethyl ester, phytosterol, glycosid, flavonoid, quinon, hợp chất phenolic, saponin, coumarin và tanin [4]. Một tác giả khác cũng phân lập được từ phân đoạn EtOAc của cao chiết Xấu hổ các hợp chất có tác dụng ức chế α -glucosidase như: stigmasterol; quercetin; avicularin [5]. Nhìn chung, các nghiên cứu về cây Xấu hổ còn rời rạc, chưa có nghiên cứu toàn diện bao gồm cả *in silico*, *in vitro* và *in vivo* về tác dụng và cơ chế tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường của cây Xấu hổ. Do đó, nghiên cứu làm sáng tỏ tác dụng và cơ chế tác dụng hạ đường huyết của cao phân đoạn và các hợp chất của cây Xấu hổ (*Mimosa pudica* L.) trên bệnh đái tháo đường là rất cần thiết. Do đó, nghiên cứu này tập trung đánh giá tác dụng hạ đường huyết, chống viêm, hạ lipid máu, cải thiện biến chứng tổn thương thận và sơ bộ cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ. Các kết quả nghiên cứu của luận án sẽ góp phần vào cung cấp cơ sở dữ liệu khoa học về tác dụng dược lý của cây Xấu hổ có tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường, từ đó đề xuất khả năng ứng dụng theo hướng làm thuốc điều trị bệnh đái tháo đường của cây Xấu hổ, và phát triển nguồn dược liệu Việt.

Do vậy, luận án “Nghiên cứu tác dụng chống đái tháo đường của lá cây Xấu hổ (*Mimosa pudica* L.) trên thực nghiệm.” được tiến hành nhằm mục tiêu:

1. Đánh giá tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm.

2. Đánh giá cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ *in vitro* và *in silico*.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về bệnh đái tháo đường

Bệnh đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh rối loạn chuyển hoá không đồng nhất, có đặc điểm tăng đường huyết do khiếm khuyết về tiết insulin, về tác động của insulin, hoặc cả hai. Tăng glucose mạn tính trong thời gian dài gây nên những rối loạn chuyển hoá carbohydrat, protein, lipid, gây tổn thương ở nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt ở tim và mạch máu, thận, mắt, thần kinh [6].

1.1.1. Phân loại ĐTĐ

Đái tháo đường típ 1

ĐTĐ típ 1 do tế bào β bị phá hủy nên bệnh nhân không còn hoặc còn rất ít insulin, 95% do cơ chế tự miễn (típ 1A), 5% vô căn (típ 1B). Bệnh nhân bị thiếu hụt insulin, tăng glucagon trong máu, không điều trị sẽ bị nhiễm toan ceton. Bệnh có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi nhưng chủ yếu ở trẻ em và thanh thiếu niên. Bệnh nhân cần insulin để ổn định glucose huyết.

Đái tháo đường típ 2

ĐTĐ típ 2 trước kia được gọi là ĐTĐ của người lớn tuổi hay ĐTĐ không phụ thuộc insulin, chiếm 90-95% các trường hợp ĐTĐ. Thể bệnh này bao gồm những người có thiếu insulin tương đối cùng với đề kháng insulin.

Bệnh nhân không có sự phá hủy tế bào beta do tự miễn, không có kháng thể tự miễn trong máu. Đa số bệnh nhân có béo phì hoặc thừa cân và/hoặc béo phì vùng bụng với vòng eo to. 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, tế bào mỡ, tế bào cơ (đề kháng insulin tại các cơ quan đích). Do tình trạng đề kháng insulin, ở giai đoạn đầu tế bào β bù trừ và tăng tiết insulin trong máu, nếu tình trạng đề kháng insulin kéo dài hoặc nặng dần, tế bào β sẽ không tiết đủ insulin và ĐTĐ típ 2 lâm sàng sẽ xuất hiện.

Bảng 1.1. Nguyên nhân ĐTĐ nguyên phát [4]

Các nguyên nhân	ĐTĐ típ 1	ĐTĐ típ 2
Yếu tố nguy cơ	Kháng nguyên HLA-DR3, HLA-DR4	Tiền sử gia đình Đặc tính dân tộc Ăn nhiều, ít tập luyện thể dục Nhiễm độc
Yếu tố khởi phát	Nhiễm virus Stress chuyển hoá	Béo phì Stress chuyển hoá
Yếu tố bệnh sinh	Phá huỷ đảo tụy theo cơ chế tự miễn	Các tế bào tại đảo tụy thoái hoá/suy yếu dần Giảm receptor insulin

Đái tháo đường thai kỳ

ĐTĐ được chẩn đoán trong 3 tháng giữa thai kỳ hoặc 3 tháng cuối của thai kỳ và không có bằng chứng về ĐTĐ típ 1, típ 2 trước đó.

Thể bệnh chuyên biệt của ĐTĐ

Thể chuyên biệt của ĐTĐ hay ĐTĐ thứ phát do các nguyên nhân khác, như ĐTĐ sơ sinh hoặc ĐTĐ do sử dụng thuốc và hoá chất như sử dụng glucocorticoid, điều trị HIV/AIDS hoặc sau cấy ghép mô...[6, 7].

1.1.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh bệnh ĐTĐ típ 2

1.1.2.1. Nguyên nhân

Đặc điểm lớn nhất trong sinh lý bệnh của đái tháo đường típ 2 là có sự tương tác giữa yếu tố gen và môi trường.

- Yếu tố di truyền.

- Yếu tố môi trường: đây là nhóm các yếu tố có thể can thiệp để làm giảm tỷ lệ mắc bệnh. Các yếu tố đó là:

+ Sự thay đổi lối sống: như giảm các hoạt động thể lực; thay đổi chế độ ăn uống theo hướng tăng tinh bột, giảm chất xơ gây dư thừa năng lượng.

+ Chất lượng thực phẩm

+ Các stress

- Tuổi thọ ngày càng tăng, nguy cơ mắc bệnh càng cao: đây là yếu tố không thể can thiệp được.

1.1.2.2. Cơ chế bệnh sinh bệnh ĐTĐ típ 2

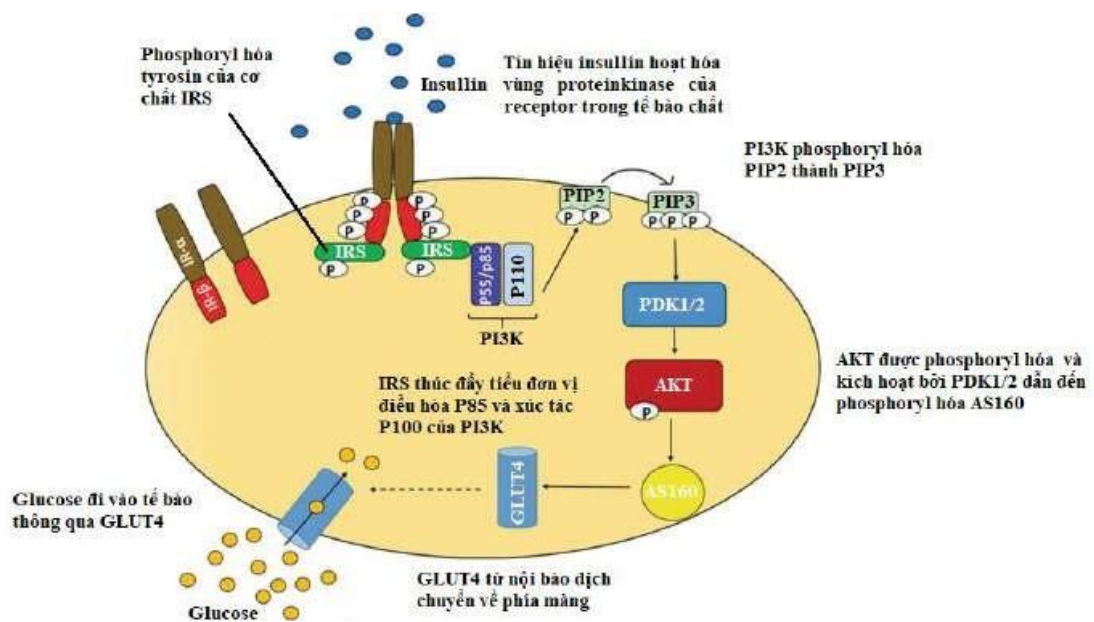
- Suy giảm chức năng tế bào β và kháng insulin

- Tình trạng thừa cân, béo phì, ít hoạt động thể lực, là những đặc điểm thường thấy ở người đái tháo đường típ 2 có kháng insulin. Tăng insulin máu, kháng insulin còn gặp ở người tiền đái tháo đường, tăng huyết áp vô căn, người mắc hội chứng chuyển hoá. Người đái tháo đường típ 2 bên cạnh kháng insulin còn có thiếu insulin-đặc biệt khi lượng glucose huyết tương khi đói trên 10,0 mmol/L [6]. Thừa cân, ít hoạt động thể lực là những yếu tố nguy cơ dẫn đến bệnh ĐTĐ.

1.1.2.2.1. Cơ chế tác dụng của insulin

Insulin là một peptid 51 acid amin, được sản xuất và tiết ra bởi các tế bào đảo tụy. Nó bao gồm hai chuỗi polypeptid, A và B, gồm 21 và 30 acid amin tương ứng, được nối với nhau bằng cầu nối disulfit. Hoạt động sinh học của insulin bắt đầu khi nó liên kết với thụ thể. Bản thân thụ thể của insulin (insulin receptor -IR) là gồm 2 tiểu đơn vị α và 2 tiểu đơn vị β . Tiểu đơn vị α có chứa vị trí gắn insulin nằm ở mặt ngoài của màng plasma. Tiểu đơn vị β xuyên qua màng với miền tyrosin kinase nội bào được kích hoạt bởi quá trình phosphoryl hóa. Insulin liên kết với tiểu đơn vị α của thụ thể và kích hoạt hoạt động tyrosin kinase của tiểu đơn vị β dẫn đến quá trình tự phosphoryl hóa và kích hoạt thụ thể insulin. Kinase này lại hoạt hóa tiếp nhiều protein kinase khác bằng phản ứng phosphoryl hóa các gốc tyrosin đặc hiệu. Cuối cùng những enzym này có thể phosphoryl hóa một nhóm các phân tử cơ chất nội bào điển hình như là thụ thể insulin nền (insulin receptor substrate -IRS). Quá trình phosphoryl hóa có thể kích hoạt con đường tín hiệu phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT, còn được gọi là protein kinase B (PKB), chịu trách nhiệm cho hầu hết các hoạt động trao đổi chất như thúc đẩy sự chuyển vị của protein vận chuyển glucose, glycogen, tổng hợp lipid, protein và kiểm soát quá trình tân tạo đường ở gan [8].

Các protein IRS phosphoryl hóa liên kết với các tiểu đơn vị điều tiết phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), điều này dẫn đến việc kích hoạt PI3K và PI3K phosphoryl hóa phosphatidylinositol 4,5-biphosphat (PIP2) thành phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP3). PIP3 lại kích hoạt các kinase: PDK-1 và PDK-2 và cuối cùng là kích hoạt AKT/PKB kinase. Sau đó, AKT xúc tác quá trình phosphoryl hóa protein cơ chất AS160 kích thích sự dịch chuyển các chất vận chuyển glucose GLUT-4 từ các túi tế bào chất đến bề mặt màng tế bào và do đó làm tăng sự vận chuyển glucose phụ thuộc insulin vào tế bào (hình 1.1) [9].



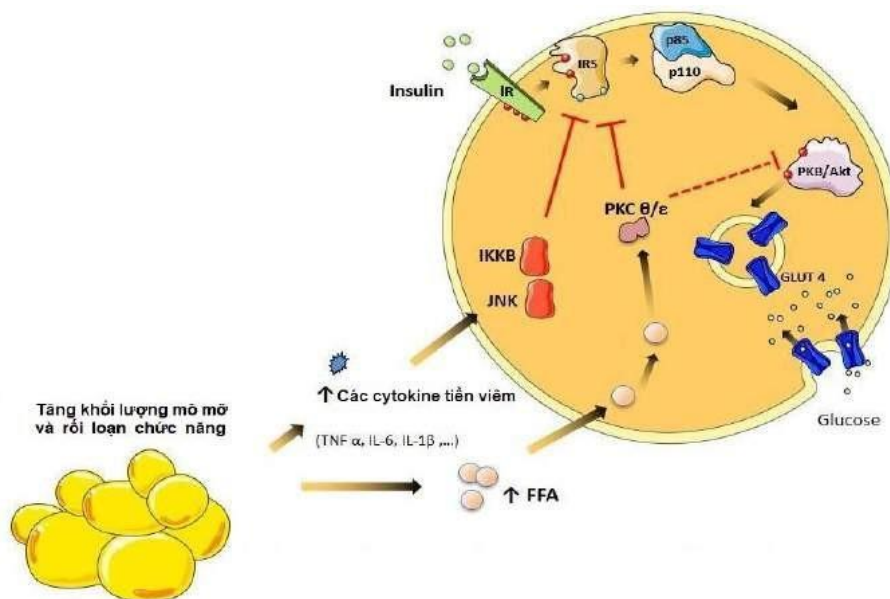
Hình 1.1. Con đường truyền tin nội bào của insulin [9]

Insulin được tiết từ các tế bào β trong các đảo tụy chủ yếu được điều hòa bởi sự xâm nhập glucose thông qua chất vận chuyển của nó. Glucose ngoại bào xâm nhập vào tế bào thông qua chất vận chuyển GLUT-2, glucose sau đó được chuyển hóa thông qua quá trình đường phân làm tăng tỷ lệ ATP/ADP, điều này kích hoạt việc đóng kênh K^+ nhạy cảm với ATP trên màng plasma, làm giảm nồng độ K^+ dẫn đến khử cực màng và mở kênh Ca^{2+} phụ thuộc điện áp. Các ion Ca^{2+} xâm nhập vào tế bào dẫn đến tăng mức Ca^{2+} nội bào và kích thích tăng giải phóng insulin từ tế bào β [10].

1.1.2.2.2. Tính kháng insulin

Kháng insulin: là tình trạng các tế bào đích insulin (như tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào cơ) không đáp ứng đúng với kích thích insulin bình thường của người dùng và tình trạng này có liên quan đến sự gián đoạn của việc truyền tín hiệu insulin. Điều đáng chú ý là đột biến gen hoặc protein của con đường truyền tin nội bào bị ức chế hiếm khi là nguyên nhân cho tình trạng kháng insulin và ĐTĐ típ 2. Kháng insulin và ĐTĐ típ 2 thường liên quan đến béo phì hoặc thừa cân và hiện được hỗ trợ bởi các yếu tố môi trường như các chất dinh dưỡng (đặc biệt là lipid) và sự thay đổi trong chuyển hóa cơ chất do không hoạt động thể chất. Các yếu tố đó là nền tảng trung tâm của hiện tượng viêm mô mỡ mãn tính và nhiễm độc lipid dẫn đến việc kích hoạt con đường phản ứng căng thẳng tế bào, gây ra sự thay đổi trong việc truyền tín hiệu insulin. Có thể do khiếm khuyết phân tử của con đường truyền tín hiệu insulin liên quan đến kháng insulin [11].

Bất hoạt IR thông qua tăng hoạt tính của các enzym khử phosphoryl của tyrosin trong con đường truyền tin nội bào của insulin. Một số enzym đã được nghiên cứu như các protein tyrosin phosphatase (PTP) trong đó chủ yếu là protein tyrosin phosphatase 1B (PTP-1B). PTP-1B là một enzym quan trọng khác trong việc suy giảm tín hiệu insulin vì nó khử phosphoryl của tyrosin trong IR và IRS do đó giảm tính nhạy cảm của insulin trên tế bào.



Hình 1.2. Cơ chế phân tử của tính kháng insulin [11]

Các enzym làm giảm tín hiệu PIP3 được biết như là các phosphatase thủy phân PIP3 thành PIP2. Bên cạnh đó, sự gia tăng phosphoryl hoá các phân tử serin hoặc threonin không những làm giảm khả năng hoạt hoá PIP3 mà còn làm giảm quá trình phosphoryl hóa tyrosin của IR, tăng thoái hoá IRS do đó làm giảm tác dụng và tăng kháng insulin.

Bất hoạt PIP3 thông qua ức chế tiểu đơn vị điều hoà ngược p85 nằm trên PI3K: sự thể hiện quá mức dạng hoạt động p100 trên PI3K hoặc kích thích quá mức Akt đều ức chế p85 làm giảm tác dụng sinh học của insulin. Các nhân tố dẫn đến tình trạng kháng insulin: các yếu tố quan trọng có thể dẫn đến tình trạng kháng insulin là hàm lượng acid béo tự do vượt mức, stress oxy hóa, các cytokin gây viêm như interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) yếu tố hoại tử khối u-alpha (TNF- α) [11].

1.1.2.2.3. Hiện tượng bù và rối loạn chức năng tế bào beta

Cả rối loạn chức năng tế bào β và kháng insulin đều dẫn đến tăng đường huyết kéo dài đặc trưng cho ĐTĐ típ 2. Tình trạng kháng insulin làm giảm tác dụng điều hòa chuyển hóa của insulin ở các mô đích, với biểu hiện rõ ràng nhất là sự tăng đường huyết. Khi nồng độ đường huyết cao sẽ kích thích tế bào β của đảo tụy tăng tiết insulin. Tăng sinh tế bào β và tăng insulin máu bù đắp cho việc tăng dần kháng insulin để duy trì lượng đường ở mức bình thường trong máu, sau một thời gian sẽ dẫn tới sự suy giảm khối lượng tế bào β . Rối loạn chức năng tế bào β là yếu tố quyết định quan trọng đối với ĐTĐ típ 2 được kết hợp bởi tình trạng kháng insulin.

Sự tương tác giữa rối loạn chức năng tế bào β và kháng insulin vẫn rất phức tạp. Sự khởi đầu của tăng đường huyết có thể kích hoạt cả rối loạn chức năng tế bào β và kháng insulin. Rối loạn chức năng tế bào β nghiêm trọng hơn kháng insulin. Với rối loạn chức năng tế bào β , sự tiết insulin bị suy giảm trong khi với tình trạng kháng insulin, insulin vẫn có thể được tiết ra nhưng biểu hiện không nhạy cảm với insulin trong các mô đích. Khi rối loạn chức năng tế bào β và tình trạng kháng insulin trầm trọng hơn, tăng đường huyết sẽ khuếch đại dẫn đến tiến triển thành bệnh ĐTĐ típ 2. Mối quan hệ giữa kháng insulin và rối loạn

chức năng tế bào β chủ yếu phụ thuộc vào trạng thái trao đổi chất được xác định bởi nồng độ đường huyết và insulin. Cả hai trạng thái bệnh lý ảnh hưởng lẫn nhau và có thể làm trầm trọng thêm bệnh ĐTĐ. Bảo tồn chức năng tế bào β và tín hiệu insulin trong các tế bào β và tín hiệu insulin trong các tế bào nhận glucose sẽ duy trì cân bằng nội môi glucose [12].

1.2. Một số đích phân tử trong điều trị đái tháo đường típ 2

Bệnh đái tháo đường là một bệnh mạn tính xảy ra khi tuyến tụy không sản xuất đủ lượng hoóc môn - insulin để điều chỉnh lượng đường trong máu hoặc khi cơ thể không thể sử dụng hiệu quả insulin mà nó tạo ra (theo WHO). Cơ chế bệnh sinh của bệnh ĐTĐ típ 2 gắn liền với sự đề kháng insulin hoặc và suy giảm chức năng của tế bào beta tại tuyến tụy. Nhiều nguyên nhân ở cấp độ phân tử dẫn đến tình trạng trên đã được nghiên cứu như các đích tác dụng phân tử nhằm giải thích sâu về cơ chế, để phát triển các thuốc sử dụng rộng rãi trong điều trị đái tháo đường, có thể kể đến như: AMPK, α -glucosidase, PTP-1B...

1.2.1. 5'- Adenosin monophosphat-activated protein kinase (AMPK)

AMPK là một phân tử cảm thụ năng lượng tế bào (cellular energy sensor), tương tác với các tín hiệu liên quan tới hoạt động sinh lý, hormon và dinh dưỡng của tế bào để cân bằng sự sản sinh adenosin triphosphat. AMPK điều hoà hoạt động đồng hoá năng lượng thông qua sự phosphoryl hoá của nhiều cơ chất khác nhau và tham gia vào hầu hết các con đường chuyển hoá của tế bào, được biết đến như một đích phân tử cho các thuốc điều trị đái tháo đường [13]. Metformin là loại thuốc được sử dụng phổ biến với những hiệu quả rõ ràng liên quan tới chuyển hoá glucose và các biến chứng đái tháo đường. Cơ chế tác dụng của metformin qua cả hai con đường phụ thuộc AMPK và không phụ thuộc AMPK dựa trên sự ức chế quá trình hô hấp tại ti thể, cũng có thể bao gồm ức chế glycerophosphat dehydrogenase và quá trình liên quan tới lysosom [14].

1.2.2. Alpha-glucosidase (α -glucosidase)

Các enzym chuyển hoá carbohydrat tại ruột non có khả năng phân cắt các chuỗi polysaccharid thành các monosaccharid đơn giản để có thể hấp thu được. Trong số đó, các enzym α -glucosidase đóng vai trò quan trọng trong việc phá vỡ

liên kết glucopyranosid ở các oligosaccharid và disaccharid để giải phóng các monosaccharid là dạng được hấp thu vào cơ thể, do đó các enzym này tham gia điều hoà lượng glucose và sự tăng đường huyết sau ăn. Sự ức chế hoạt động của α -glucosidase là một mục tiêu căn bản trong việc nghiên cứu và phát triển nhiều loại thuốc mới hiệu quả và ít độc tính hơn. Các chất ức chế α -glucosidase tham gia điều chỉnh tình trạng tăng đường huyết mà không tác động trực tiếp lên sự bài tiết insulin được biết đến là các thuốc đường uống làm giảm đường huyết thể hệ đầu tiên, có thể sử dụng theo phương pháp đơn trị liệu hoặc liệu pháp kết hợp với insulin và các thuốc khác. Hiện tại sử dụng trong lâm sàng là các carbohydrat tương tự acarbose, voglibose và miglitol có khả năng liên kết thuận nghịch với α -glucosidase và ngăn chặn quá trình phân giải saccharid [15].

1.2.3. Protein tyrosin phosphatase 1B (PTP-1B)

Quá trình phosphoryl hoá tyrosin của các protein trong cơ thể là một trong những cơ chế quan trọng nhất liên quan tới kiểm soát sự sinh trưởng và biệt hoá tế bào cũng như điều chỉnh các chức năng của tế bào. Đây là một quá trình thuận nghịch được chi phối bởi các hoạt động tương phản giữa protein tyrosin phosphatases (PTPs) chịu trách nhiệm cho quá trình de phosphoryl hoá và protein tyrosin kinases (PTKs) có vai trò trong quá trình phosphoryl hoá. Sự sai lệch và thiếu sót trong hoạt động của PTPs và PTKs gây ra sự bất thường của quá trình phosphoryl hoá là nguyên nhân dẫn tới một số bệnh như đái tháo đường, các hội chứng viêm và ung thư. PTP-1B thuộc nhóm các PTPs nội bào tham gia vào quá trình điều hoà ngược insulin (negative insulin regulation) và tập hợp các tín hiệu liên quan tới leptin (leptine signal system). Cụ thể là PTP-1B xúc tác sự phosphoryl hoá các gốc tyrosin (tyrosine residues) của phức hệ hoạt hoá thụ thể insulin b (activated insulin receptor b subunit) và cơ chất hình thành thụ thể insulin 1 (insulin receptor substrat-1), do đó ảnh hưởng đáng kể đến thời gian và biên độ của sự đáp ứng giữa tế bào và insulin. Những đánh giá tích cực về PTP-1B như một đích tác dụng hiệu quả là tiền đề cho sự nghiên cứu phát triển và sản xuất các thuốc ức chế chọn lọc phân tử này sử dụng trong điều trị đái tháo đường và các bệnh chuyển hoá liên quan [16].

1.2.4. Advanced glycation end products (AGEs)

AGEs là tên gọi chung của nhiều sản phẩm hình thành từ các hợp chất Amadori thông qua các phản ứng tách nước, chuyển vị, ngưng tụ và oxy-hoá. Các hợp chất Amadori trước đó là sản phẩm của quá trình ngưng tụ không có sự xúc tác của enzym (a non-enzymatic condensation reaction) được biết đến là phản ứng Maillard giữa nhóm carbonyl của đường khử (ceton hoặc aldehyd) và nhóm amin của các phân tử protein, lipid và acid nucleic [17-19].

Dưới điều kiện là tăng đường huyết và/hoặc stress oxy hoá, phản ứng Maillard bắt đầu với sự chuyển đổi của các phức gốc Schiff linh động (reversible Schiff base adducts) thành các sản phẩm tái cấu trúc Amadori dạng liên kết cộng hoá trị ổn định hơn. Sau vài ngày tới vài tuần, các sản phẩm Amadori tiếp tục trải qua các phản ứng tái cấu trúc để hình thành các nhóm chức liên kết chặt chẽ và trở thành các AGEs. Sự hình thành và tích lũy các AGEs vẫn xảy ra trong quá trình lão hoá theo sinh lý bình thường, tuy nhiên sự kiện này diễn ra với tốc độ nhanh và mạnh hơn ở các bệnh nhân mắc đái tháo đường.

AGEs cũng gây ra tổn thương tại các mô liên quan trực tiếp tới các biến chứng mạn tính của đái tháo đường. Một số nghiên cứu khác cho thấy các AGEs có thể làm giảm đáp ứng với insulin ở ngoại vi, tham gia việc phá huỷ các tế bào beta, kích thích sản sinh quá mức các tế bào miễn dịch và gây độc cho tế bào[20].

Sự hình thành MGO là kết quả của sự duy trì nồng độ glucose cao trong máu và các nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở cả đái tháo đường típ 1 và típ 2 đều biểu hiện nồng độ cao của MGO và AGEs hình thành từ MGO. Nhiều nghiên cứu tiếp theo nhấn mạnh tầm quan trọng của MGO trong đái tháo đường và các biến chứng liên quan [21].

Những nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng sự tương tác giữa AGEs và các thụ thể của AGEs (RAGE- receptor for AGE) làm phát sinh chuỗi phản ứng stress oxy hoá ở nhiều loại tế bào gây ra tình trạng viêm ở hệ thống mạch máu, thúc đẩy sự hoạt động của các đại thực bào và tiểu cầu và hình thành huyết khối. AGEs làm tăng sự bám dính của các tế bào miễn dịch với các tế bào nội mô

(endothelial cells) của các vi mạch thông qua sự hoạt động của các phân tử bám dính nội bào và sự hình thành các gốc tự do.

Sự tích lũy của AGEs ở các tế bào ngoại mạch tại võng mạc (retinal pericytes) trong bệnh đái tháo đường ảnh hưởng đáng kể tới chức năng và thời gian tồn tại của loại tế bào này. Tương tác giữa AGEs và RAGE thúc đẩy sự sản sinh các gốc tự do dẫn tới sự chết theo chu trình của các tế bào. AGEs cũng gây ra sự kích thích các yếu tố nhân kappa B (nuclear factor- κ B,) và hoạt động của Caspase-3 là một enzym liên quan tới sự chết tế bào. Hơn nữa, sự điều hoà tăng RAGE từ AGEs ở cấp độ phân tử mRNA cũng diễn ra ở các tế bào ngoại mạch thông qua sự sản sinh các gốc tự do nội bào. Vòng lặp điều hoà này lại làm biến đổi các tín hiệu của AGEs gây gia tăng thêm những độc tính lên tế bào [18].

Những độc tính này do AGEs gây ra cũng được tìm thấy trên các loại tế bào khác như tế bào beta tuyến tụy, tế bào nội mô và tế bào gian mao mạch tại cầu thận (mesangial cells),...[18, 19].

1.2.5. Methyl glyoxal và sự hình thành các AGEs

Methyl glyoxal (MGO), một chất chuyển hoá hoạt động mạnh (highly reactive metabolite), là một tác nhân chính trong việc hình thành các AGEs. Như đã đề cập ở phần trên, sự duy trì nồng độ cao của glucose là nguyên nhân quan trọng nhất trong phản ứng phi enzym gắn kết cộng hóa trị của đường với protein hoặc lipid (glycation) tạo ra các sản phẩm chứa nhóm chức dị thể (heterogenous group) đã được biết đến là AGEs. Tuy nhiên, glucose chỉ là những phân tử đường hoạt động rất yếu, thực tế thì sự hình thành các AGEs chủ yếu đến từ nhiều sản phẩm chuyển hoá của glucose và MGO là một tiền chất chủ yếu (precursor) để tạo thành các AGEs [19].

MGO được chuyển hoá chủ yếu từ quá trình thoái hoá phi enzym của triose phosphat, glyceraldehyd-3-phosphat và dihydroxyaceton-phosphat. Ngoài ra, MGO cũng được hình thành từ sự oxy hoá của aceton, quá trình dị hoá của threonin và sự thoái hoá của protein. Các phân tử này hoạt động rất mạnh và phần lớn phản ứng với arginin trên phân tử protein tạo thành argpyrimidin,

hydroimidazon (MGO-derived hydroimidazolone, MG-H1, MG-H2, MG-H3) và tetrahydropyrimidin. Trong đó MGO-H1 được coi là các AGE chính tạo thành từ MGO. Vì arginin xuất hiện nhiều trong các chuỗi chức năng của protein nên các AGE này gây ra những hậu quả nghiêm trọng lên sự hoạt động của tế bào. MGO cũng có thể tương tác với lysin để tạo ra N(epsilon)carboxymethyl-lysin(CML) hoặc N(epsilon) carboxy -ethyl-lysin(CEL) là các loại AGEs khác. Các protein bị thay đổi cấu trúc bởi MGO-Hs và MGO-H1 hoạt động như các phối tử của RAGE dẫn tới sự thiết lập các tín hiệu và làm tăng sự biểu hiện của một số cytokin. Glyoxalase 1 (GLO1) và glyoxalase 2 (GLO2) là những enzym quan trọng đóng vai trò ngăn chặn glycation thông qua việc xúc tác cho phản ứng chuyển đổi MGO thành D-lactat với sản phẩm trung gian là S-D-lactoyglutathion. Sự giảm biểu hiện của GLO1 hoặc suy giảm hoạt động của enzym này đều ảnh hưởng đến nồng độ MGO, do đó có thể thông qua GLO1 để kiểm soát sự hình thành quá mức MGO [21-23].

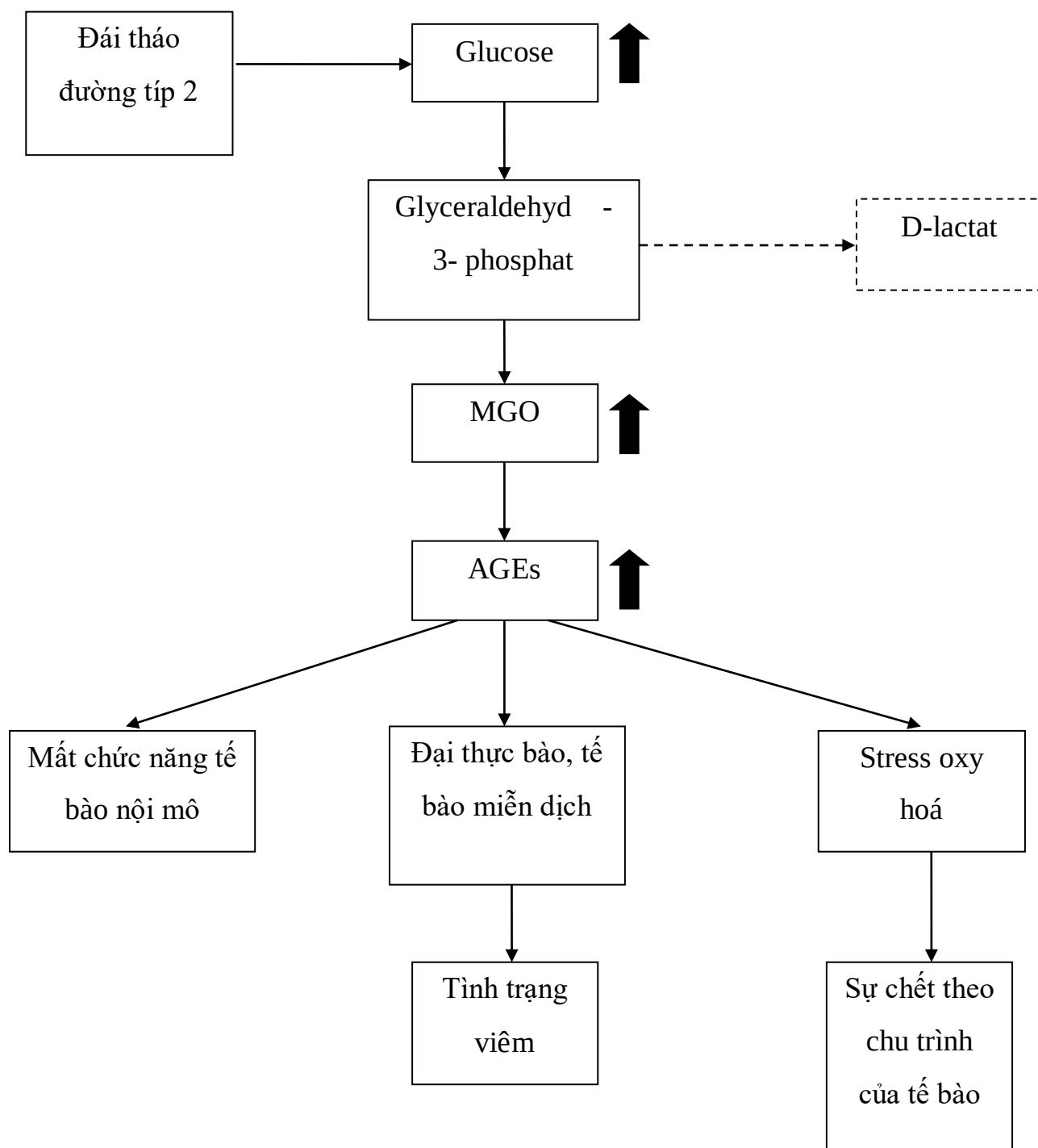
Những hậu quả do MGO biểu hiện trong đái tháo đường

Sự hình thành MGO là kết quả của sự duy trì nồng độ glucose cao trong máu và các nghiên cứu đã chỉ ra rằng ở cả đái tháo đường típ 1 và típ 2 đều biểu hiện nồng độ cao của MGO và AGEs hình thành từ MGO. Nhiều nghiên cứu tiếp theo nhấn mạnh tầm quan trọng của MGO trong đái tháo đường và các biến chứng liên quan [21].

Một nghiên cứu trên các bệnh nhân mắc đái tháo đường có biến chứng thận chỉ ra mối tương quan theo chiều thuận của nồng độ MGO trong huyết tương và tỉ lệ albumin/creatinin trong khi những biến đổi về mức lọc cầu thận lại tương quan nghịch đảo với nồng độ MGO trong suốt quá trình theo dõi. Nồng độ MGO cũng ảnh hưởng tới độ dày của màng trong mạch máu và sự tăng lên của áp lực máu trong mạch cho thấy mối liên hệ giữa MGO và các bệnh mạch máu lớn ở đái tháo đường. Mối liên hệ giữa các AGEs và các bệnh về tim mạch cũng được chỉ ra dựa trên những bằng chứng nghiên cứu về sự mất chức năng của thận, tình trạng viêm mức độ nhẹ, thay đổi cấu trúc và chức năng màng trong mạch và tính mềm dẻo của mạch máu [24].

Lớp nội mô mạch máu (endothelium) là lớp màng đơn mỏng tạo thành từ các tế bào nội mô bao phủ bề mặt trong của các mạch máu trong cơ thể. Ở điều kiện sinh lý bình thường, lớp màng có vai trò làm giảm trương lực mạch máu, điều hoà tính thấm thành mạch, ngăn cản sự tập trung và bám dính của tiểu cầu, hạn chế hoạt động của hệ thống đông máu và thúc đẩy sự ly giải fibrin. Sự rối loạn chức năng của lớp nội mô mạch máu trong bệnh đái tháo đường biểu hiện ở những thay đổi trong điều hoà vận mạch, sự tăng lên của các chất oxi-hoá, tình trạng viêm và chức năng rào chắn của màng.

MGO là một tiền chất của AGEs quan trọng trong các tế bào nội mô. Sự tăng hoạt động của enzym GLO1 ngăn cản sự hình thành của các AGEs dạng CML và CEL dưới tình trạng tăng đường huyết. Một số nghiên cứu cho thấy việc sử dụng MGO ở chuột gây ra những thay đổi tại các vi mạch tương tự khi mắc đái tháo đường như suy giảm sự co giãn của mạch, suy thoái hệ mạch tại da do mất dần các tế bào nội mô và giảm độ dày màng, sự tăng lên quá mức của các chất oxy hoá. Nồng độ cao của MGO không chỉ thúc đẩy quá trình sản xuất các superoxid hình thành các stress oxy hoá mà còn gây ra những độc tính trên vật liệu di truyền (genotoxicity) của các tế bào nội mô và hoạt hoá sự chết của tế bào [21].



Hình 1.3. Sự hình thành MGO và AGEs trong bệnh ĐTD típ 2 [21]

1.3. Các biến chứng của bệnh ĐTĐ

Các biến chứng của bệnh đái tháo đường típ 2 có những đặc điểm liên quan mật thiết đến quá trình phát sinh và tiến triển của bệnh. Về phân loại biến chứng, có thể phân ra các biến chứng cấp tính và mạn tính.

1.3.1. Các biến chứng cấp tính:

+ Hôn mê nhiễm toan ceton: là một biến chứng đặc trưng bởi những rối loạn nặng nề trong chuyển hoá carbohydrat, protein và lipid do thiếu insulin, gây nên sự nguy hiểm tức thời đến tính mạng người bệnh nên cần phải được theo dõi tại các khoa điều trị tích cực.

+ Hạ glucose máu: nguyên nhân có thể do tăng bài tiết insulin (chất có tác dụng ức chế sản xuất glucose tại gan, kích thích tiêu thụ glucose ở cơ vân và mô mỡ), tình trạng giảm tiếp nhận thức ăn hoặc tăng mức độ luyện tập (làm tăng sử dụng glucose ở cơ vân)

+ Hôn mê tăng glucose máu không nhiễm toan ceton: có nhiều điểm giống với hôn mê nhiễm toan ceton, khác biệt chủ yếu là tăng glucose máu, mất nước và rối loạn điện giải, có thể phân biệt là không có thể ceton hoặc có rất ít trong nước tiểu

+ Hôn mê nhiễm toan lactic

+ Các bệnh nhiễm trùng cấp

Các biến chứng mạn tính: được chia ra bệnh mạch máu lớn và nhỏ hoặc theo cơ quan bị tổn thương (VD: bệnh thận do đái tháo đường, bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh thần kinh do đái tháo đường...) [1, 6, 7].

1.3.2. Biến chứng thận do đái tháo đường

Bệnh thận do đái tháo đường xuất hiện ở 20-40% bệnh nhân bị đái tháo đường [25]. Bệnh thận do ĐTĐ thường xuất hiện sau khoảng 10 năm ở bệnh nhân ĐTĐ típ 1 nhưng có thể xảy ra ở ngay thời điểm chẩn đoán ĐTĐ típ 2 [26].

Bệnh thận do đái tháo đường là một hội chứng lâm sàng đặc trưng bởi sự xuất hiện của albumin niệu vi lượng dai dẳng đồng thời với đái tháo đường phụ

thuộc hoặc không phụ thuộc insulin. Ban đầu, bệnh nhân có biểu hiện tăng tốc độ lọc cầu thận (GFR) gần gấp đôi giá trị bình thường và thỉnh thoảng xuất hiện albumin niệu vi lượng. Những dấu hiệu này có thể xuất hiện trong vòng 5 năm. Sau đó trong vòng 20 năm, GFR giảm xuống và albumin niệu xuất hiện trước khi có sự biểu hiện của tăng protein niệu vừa và nhẹ. Bước cuối cùng trong diễn tiến tự nhiên của bệnh được đặc trưng bởi tăng protein niệu nặng có hoặc không mắc kèm hội chứng thận hư và suy thận nhẹ đến bệnh thận giai đoạn cuối (ESRD). Nguyên nhân của những sự suy giảm trên là do sự thay đổi trong cấu trúc của tế bào thận, bắt đầu bằng sự tích lũy chất nền ngoại bào ở trung bì và màng đáy cầu thận, sau đó hình thành các nốt trung bì thể hiện các đặc điểm tổn thương của bệnh thận đái tháo đường cùng với những tổn thương kẽ ống thận [27]. Đặc điểm hình thái của bệnh thận do đái tháo đường bao gồm phì đại cầu thận, dày màng đáy, giãn nở trung bì, teo ống thận, xơ hóa mô kẽ và dày tiểu động mạch [28]. Tăng đường huyết, tăng huyết áp và khuynh hướng di truyền là những yếu tố nguy cơ chính phát triển bệnh thận do đái tháo đường. Ngoài ra, tăng lipid huyết, thói quen hút thuốc, số lượng và nguồn gốc của protein trong chế độ ăn uống cũng đóng một vai trò như các yếu tố nguy cơ [29]. Có nhiều dữ liệu gợi ý về cơ chế bệnh sinh của bệnh thận do đái tháo đường. Cơ chế theo con đường huyết động học liên quan đến hệ renin-angiotensin-aldosterol và hệ urotensin. Các cytokin viêm và profibrotic bao gồm yếu tố tăng trưởng chuyển dạng β (TGF- β), yếu tố hoại tử khối u α (TNF- α) các kinase như protein kinase C (PKC) và Janus kinase cũng có vai trò trong tiến triển của bệnh thận đái tháo đường. Và đóng vai trò quan trọng nhất là các chất trung gian gây stress oxy hóa như NADPH oxydase [30].

1.3.3. Các biến chứng khác của đái tháo đường

+ Bệnh võng mạc do ĐTĐ

Tăng đường huyết có thể gây tổn thương tiến triển cho các mạch máu trong võng mạc, có thể dẫn đến xuất huyết, bong võng mạc và mù lòa [31]. Đây là biến chứng phổ biến nhất của ĐTĐ với tỉ lệ mắc ở bệnh nhân là khoảng 35% [32]. Bệnh võng mạc do ĐTĐ được đặc trưng bởi các tổn thương như: thay đổi

tính thấm thành mạch, vi mạch mao mạch, thoái hóa mao mạch và sự hình thành quá mức của mạch máu mới. Bệnh vồng mạc do ĐTĐ được chia thành hai loại là bệnh không tăng sinh (NPDR) và bệnh có tăng sinh (PDR) [33].

Đây là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến mù lòa ở người trưởng thành trong độ tuổi từ 20-74 tuổi [34].

+ Biến chứng thần kinh do ĐTĐ

Tương tự như các biến chứng ĐTĐ khác, bệnh thần kinh do ĐTĐ là một tình trạng đa yếu tố liên quan tới một số yếu tố nguy cơ như mức HbA1c, tăng huyết áp, tình trạng hút thuốc và BMI [35]. Hơn một nửa bệnh nhân đái tháo đường sẽ gặp phải biến chứng thần kinh với nguy cơ là một hoặc nhiều chi dưới bị cắt cụt, tỉ lệ này lên đến 15% [36].

+ Biến chứng tim mạch do ĐTĐ

Rối loạn tim mạch trong bệnh đái tháo đường bao gồm xơ vữa động mạch sớm, biểu hiện như nhồi máu cơ tim và đột quỵ cũng như suy giảm chức năng tim, chủ yếu rối loạn chức năng tâm trương. Biến chứng tim mạch chiếm hơn một nửa tỉ lệ tử vong ở bệnh nhân ĐTĐ và bệnh nhân ĐTĐ cũng có nguy cơ nhồi máu cơ tim cao gấp ba lần so với người bình thường [37]. Các yếu tố nguy cơ của biến chứng tim mạch do ĐTĐ bao gồm: có sự hiện diện của các biến chứng vi mạch khác, tuổi tác, giới tính, BMI, kiểm soát đường huyết và HbA1c, huyết áp và tình trạng hút thuốc [31].

1.4. Các nhóm thuốc dùng trong điều trị ĐTĐ

1.4.1. Insulin

Insulin là một protein nhỏ với phân tử lượng là 5808 Da, bao gồm 51 acid amin xếp thành 2 chuỗi A và B, nối với nhau bằng cầu nối disulfid. Proinsulin là 1 protein đơn chuỗi dài, được xử lý tại bộ máy Golgi của tế bào β đảo tụy, nó sẽ được thủy phân thành insulin và peptid C bằng cách loại bỏ 4 acid amin [38, 39]. Insulin sau khi đi vào tuần hoàn, sẽ khuếch tán vào các mô và gắn lên 1 receptor đặc hiệu ở các mô đích ở gan, cơ và mô mỡ [39]. Receptor của insulin được cấu thành từ 4 tiểu đơn vị, 2 tiểu đơn vị α và 2 tiểu đơn vị β là sản phẩm của 2 gen

đơn. Khi insulin gắn vào tiểu đơn vị α , việc kích hoạt thụ thể sẽ bắt đầu thông qua việc phosphoryl hóa tập hợp các protein nội bào bao gồm các IRS và SHC protein (Protein biến đổi SHC 1 là một protein ở người được mã hóa bởi gen SHC1; Protein IRS-1 được biết là có liên quan đến nhiều loại ung thư). Hoạt động vận chuyển glucose của insulin phụ thuộc vào sự hoạt hóa của PI3K. PI3K được hoạt hóa bằng tương tác giữa các IRS protein và tạo ra PIP3, từ đó điều hòa hoạt động của nhiều kinase xuôi dòng bao gồm PKB (Akt), các đồng dạng không điển hình của PKC và mTOR. Đồng dạng Akt2 có vai trò quan trọng trong bước cuối cùng của quá trình hấp thu glucose vào mô cơ và mô mỡ cũng như điều hòa sản xuất glucose ở gan. Chất nền của Akt2 cũng điều phối sự chuyển vị của chất vận chuyển glucose GLUT4 [38]. Khi đến màng sinh chất, GLUT4 hợp nhất với màng và vận chuyển glucose vào trong tế bào [33, 39]. Tăng quá trình tổng hợp glycogen và đường phân [38, 39].

Tác dụng phụ phổ biến nhất của nhóm thuốc này là gây hạ đường huyết. Một số tác dụng phụ khác như đau đầu, phát ban, chóng mặt, lo âu, ho và khô miệng [38].

Bảng 1.2. Một số loại insulin [19]

Insulin tác dụng ngắn	Insulin lispro
	Insulin aspart
	Insulin glulisine
	Regular insulin
	Regular insulin inhaled
Insulin tác dụng kéo dài	NPH insulin
	Insulin glargin
	Insulin detemir
	Insulin degludec
Insulin hỗn hợp	70 NPH/30 regular
	75/25 NPL, Lispro
	50/50 NPL, Lispro
	70/30 NPA, Aspart
	70/30 Degludec/Aspart

1.4.2. Các thuốc làm tăng tiết insulin

1.4.2.1. *Sulfonylurease (SU)*: thuốc gắn lên vị trí đặc hiệu trên phức hợp kênh K_{ATP} của tế bào β (SUR) và ức chế hoạt động của nó, dẫn đến làm thay đổi điện thế màng tế bào [38, 40]. Ca^{2+} đi vào màng tế bào, kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin [38, 39].

Khi insulin gắn vào tiểu đơn vị α , việc kích hoạt thụ thể sẽ bắt đầu thông qua việc phosphoryl hóa tập hợp các protein nội bào bao gồm các IRS và Shc protein. Hoạt động vận chuyển glucose của insulin phụ thuộc vào sự hoạt hóa của PI3K. PI3K được hoạt hóa bằng tương tác giữa các IRS protein và tạo ra PIP3, từ đó điều hòa hoạt động của nhiều kinase xuôi dòng bao gồm PKB (Akt), các đồng dạng không điển hình của PKC và mTOR. Đồng dạng Akt2 có vai trò quan trọng trong bước cuối cùng của quá trình hấp thu glucose vào mô cơ và mô mỡ cũng như điều hòa sản xuất glucose ở gan. Chất nền của Akt2 cũng điều phối sự chuyển vị của chất vận chuyển glucose GLUT4 [40].

Các thuốc này có thể có một số tác dụng phụ: gây hạ đường huyết nên người bệnh sẽ có các triệu chứng như run rẩy, đổ mồ hôi, chóng mặt và lú lẫn.

Lượng đường trong máu quá thấp có thể đe dọa tính mạng. Do đó, để phòng tình trạng này, người bệnh cần ăn uống hợp lý và không bỏ bữa. Các tác dụng phụ khác gồm tăng cân, nước tiểu sẫm màu và đau dạ dày [38].

1.4.2.2. *Loại giống Sulfonylure (nhóm meglitinid)*

- *Nateglinid*:

Là dẫn xuất của D - phenylalanin có tác dụng kiểm soát sự tăng đường huyết sau bữa ăn, do vậy sẽ cải thiện tình trạng tăng glucose huyết sau khi ăn ở bệnh nhân ĐTĐ típ 2. Trong cơ thể, nateglinid gắn vào receptor đặc hiệu (SUR 1) ở tế bào β của tụy làm chặn kênh K^+ nhạy cảm với ATP, gây khử cực màng tế bào làm mở kênh calci. Ca^{2+} kích thích giải phóng insulin. Do thuốc có đặc điểm gắn nhanh và tách ra nhanh khỏi receptor đặc hiệu nên kích thích bài tiết insulin nhanh, nhanh chóng kiểm soát glucose huyết sau khi ăn, rút ngắn giai đoạn kích thích bài tiết insulin, làm giảm nguy cơ tăng cao insulin trong máu

nên tránh được tình trạng hạ glucose huyết và sự suy kiệt tế bào β của tụy [41], [42].

- *Repaglinid*

Repaglinid cũng có tác dụng kiểm soát glucose huyết nhanh sau khi ăn, cách dùng giống nhau với liều khởi đầu 500 μg sau đó điều chỉnh liều phụ thuộc vào đáp ứng của bệnh nhân nhưng không vượt quá 16 mg/ngày [41], [43].

Gliclazid được xếp vào sulfonylurea thế hệ 2, được cấp bằng sáng chế vào năm 1966 và cấp phép lưu hành trên thị trường vào năm 1972. Gliclazid gắn chọn lọc với sulfonylurea receptor (SUR-1) trên màng tế bào beta đảo tụy. Thuốc có tác dụng bảo vệ tim mạch khi không gắn vào thụ thể SUR- 2A trên tim. Khi gắn vào SUR-1, gliclazid khóa kênh K^+ làm giảm dòng K^+ từ trong ra ngoài tế bào dẫn đến khử cực tế bào. Việc khử cực tế bào làm hoạt hóa kênh calci phụ thuộc điện thế, làm mở kênh và dòng Ca^{2+} di chuyển vào trong tế bào. Nồng độ Ca^{2+} nội bào tăng, Ca^{2+} gắn và hoạt hóa calmodulin. Phức hợp Ca^{2+} -calmodulin làm tăng cường quá trình xuất bào của các bọc dự trữ insulin dẫn đến tăng giải phóng insulin.

1.4.2.3. Thuốc có tác dụng giống incretin

Chất chủ vận thụ thể peptid-1 (GLP-1) giống glucagon. Chất chủ vận thụ thể GLP-1 bắt chước tác dụng của GLP-1, một peptid được tạo ra trong ruột non giúp tăng cường phụ thuộc vào glucose insulin bài tiết và làm chậm quá trình làm rỗng dạ dày. Các thuốc đồng vận GLP-1 có thể làm giảm cảm giác thèm ăn và giảm cân và kích thích tế bào beta. Exenatid hiện nay thường dùng kết hợp với metformin hoặc sulfonylure (ở giai đoạn phải kết hợp 2 thuốc) hoặc với cả hai (ở giai đoạn phải kết hợp 3 thuốc) [44].

Các tác dụng phụ thông thường nhất của chất đồng vận GLP-1 là về dạ dày, ruột đặc biệt nôn, buồn nôn. Các chất đồng vận GLP-1 cũng có nguy cơ nhẹ bị viêm tụy cấp [38].

1.4.2.4. Thuốc ức chế enzym phân hủy incretin: DPP-4- Nhóm Gliptin

Gliptin là nhóm thuốc ức chế enzym DPP-4 (Dipeptidylpeptidase-4) để làm tăng nồng độ GLP1 nội sinh, GLP1 có tác dụng kích thích bài tiết insulin, và ức chế sự tiết glucagon khi có tăng glucose huyết sau khi ăn [21]. Chỉ định hiện nay của thuốc ức chế DPP-4 là kết hợp với thuốc hạ đường máu khác: metformin hoặc sulfonyleure hoặc TZD (ở giai đoạn kết hợp 2 thuốc) hoặc kết hợp với cả 2 (ở giai đoạn kết hợp 3 thuốc).

Các thuốc ức chế enzym DPP-4 gồm: Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin, Linagliptin.

Khi sử dụng nhóm thuốc này có thể có các tác dụng phụ như: bị đau họng, nghẹt mũi, đau dạ dày và tiêu chảy. Một số tác dụng phụ nghiêm trọng của nhóm thuốc này gồm nguy cơ bị suy gan tụy cấp, suy tim nặng và đau khớp [38].

1.4.3. Các thuốc làm tăng nhạy cảm của tế bào đích với insulin:

+ Nhóm Biguanid

Hiện nay, Metformin là thuốc duy nhất của nhóm Biguanid được sử dụng điều trị ĐTĐ. Metformin là thuốc được sử dụng rộng rãi ở tất cả các quốc gia. Đây là thuốc điều trị chính của đái tháo đường típ 2 [44].

Metformin tác động chủ yếu là ức chế sản xuất glucose từ gan nhưng cũng làm tăng độ nhạy của insulin ở mô đích ngoại vi. Tác động hạ glucose trong khoảng 2-4 mmol/L và có thể giảm HbA1c đến 2%. Vì nó không kích thích tụy chế tiết insulin nên không gây hạ glucose huyết khi sử dụng đơn độc.

Metformin còn là thuốc được khuyến cáo lựa chọn dùng điều trị người đái tháo đường thừa cân, béo phì, để duy trì hoặc làm giảm cân nặng, thuốc còn có tác động có lợi đến giảm lipid máu.

Metformin có thể gây ra tác dụng không mong muốn ở đường tiêu hoá, nên dùng cùng bữa ăn và bắt đầu bằng liều thấp (500 mg/ngày).

Các thuốc nhóm này có thể gây tác dụng phụ: buồn nôn, nôn, đầy hơi, tiêu chảy, thiếu vitamin B12 và đau dạ dày. Những vấn đề này thường mất đi trong một vài

tuần do cơ thể của bạn đã quen với thuốc. Trong một số ít trường hợp, metformin có thể gây nhiễm toan lactic do cơ thể tích tụ nhiều acid lactic.

+ *Nhóm Thiazolidinedion*

Thuốc làm tăng nhạy cảm của cơ và tổ chức mỡ với insulin bằng cách hoạt hoá PPAR γ (peroxisom proliferator-activated receptor γ) vì vậy làm tăng thu nạp glucose từ máu. Thuốc làm tăng nhạy cảm của insulin ở cơ vân, mô mỡ đồng thời ngăn cản quá trình sản xuất glucose từ gan.

Nhóm này có thể gây một số tác dụng phụ như: thuốc có thể khiến người bệnh tích nước và dẫn tới phù, tăng cân và tăng mức cholesterol xấu (LDL-C). Nhóm thuốc này cũng có một số tác dụng phụ nghiêm trọng, như gây gãy xương và suy tim cũng như tăng nguy cơ ung thư bàng quang ở phụ nữ [38].

1.4.4. Thuốc ức chế enzym *alpha-glucosidase*

Enzym *alpha-glucosidase* có tác dụng phá vỡ đường đôi (disaccharid) thành đường đơn (monosaccharid). Cơ chế tác dụng của thuốc không liên quan đến sự bài tiết insulin ở tế bào beta của tụy mà thông qua sự ức chế α -*glucosidase* (oligosaccharidase và disaccharidase) ở niêm mạc ruột non. Các thuốc nhóm này gắn vào các enzym trên với ái lực cao, cạnh tranh ức chế làm giảm sự hấp thu của ruột với tinh bột, dextrin và các disaccharid. Ngoài ra, thuốc còn ức chế glucoamylase, maltase ở ruột. Cuối cùng, làm giảm hấp thu glucose gây hạ glucose máu [44]. Thuốc dùng trên bệnh nhân ĐTĐ típ 2 có béo phì. Những thuốc nhóm này gồm:

- Acarbose: Glucobay (50mg và 100mg). Tác dụng không mong muốn: đầy bụng, ỉa chảy... Liều thuốc có thể tăng từ 25mg đến 50mg hoặc 100mg/mỗi bữa ăn.

- Nhóm Voglibose: thuốc này hiện không có tại Việt Nam

Tác dụng không mong muốn thường gặp ở nhóm thuốc này là rối loạn tiêu hóa: đau bụng, tiêu chảy, buồn nôn...

Hiện nay tại một số nước trên thế giới không khuyến cáo sử dụng nhóm glitazon do tăng nguy cơ biến cố tim mạch (rosiglitazon), hoặc ung thư nhất là ung thư bàng quang (pioglitazon) [38].

1.4.5. Chất ức chế đồng vận chuyển natri-glucose 2 (SGLT-2i)

Chất ức chế đồng vận chuyển natri-glucose 2 (SGLT2) (canagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin) ức chế SGLT2 ở phần gần ống thận, nó ức chế tái hấp thu glucose bởi vậy nó gây ra glucose niệu và làm giảm glucose máu. Chất ức chế SGLT2 cũng có thể làm giảm cân nhẹ và hạ huyết áp. Chất ức chế SGLT-2i đã được chứng minh là làm giảm tỷ lệ tử vong, các biến cố tim mạch có hại nghiêm trọng và suy tim nhập viện ở những bệnh nhân tăng nguy cơ mắc bệnh tim mạch. Ngoài ra, chất ức chế SGLT-2i đã được chứng minh là có thể ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh thận mạn tính ở bệnh nhân đái tháo đường và giảm mức lọc cầu thận hoặc albumin niệu [21].

Tác dụng phụ thường gặp nhất của nhóm thuốc này là viêm đường sinh dục tiết niệu, đặc biệt là nhiễm nấm. Triệu chứng hạ huyết áp tư thế cũng có thể xảy ra. Các chất ức chế SGLT-2 có thể gây ra nhiễm toan ceton do đái tháo đường (DKA) ở bệnh nhân đái tháo đường loại 1 và loại 2 và nhiễm toan ceton có thể xảy ra ở mức đường huyết thấp hơn so với các nguyên nhân khác của DKA [38].

1.4.6. Các thuốc điều trị đái tháo đường khác

+ Chất ức chế dopamin

Bromocriptin là một chất ức chế dopamin hạ HbA1C khoảng 0,5% mặc dù cơ chế chưa được hiểu rõ. Mặc dù được chấp nhận dùng cho bệnh nhân đái tháo đường típ 2 nhưng không thường dùng bởi vì những tác dụng phụ của nó.

+ Chất tương tự Amylin

Pramlintid tương tự amylin là một hormon do tế bào beta tuyến tụy tiết ra, giúp làm giảm nồng độ glucose huyết sau ăn. Pramlintid làm chậm bài tiết glucagon sau ăn, làm chậm quá trình làm trống dạ dày, điều khiển sự no. Nó được sử dụng đường tiêm, dạng kết hợp với insulin.

Nguyên tắc điều trị chung bệnh đái tháo đường cho tất cả bệnh nhân gồm thay đổi lối sống, gồm chế độ ăn và luyện tập. Theo dõi thích hợp nồng độ glucose máu là cần thiết để phòng tránh biến chứng của đái tháo đường.

Một vài điểm mới trong hướng dẫn điều trị ĐTĐ típ 2 của ADA (Hiệp hội đái tháo đường Hoa Kỳ) 2022: Tầm soát ĐTĐ típ 2: nên bắt đầu từ 35 tuổi cho tất cả mọi người, thay vì 45 tuổi như khuyến cáo trước đây. Bút insulin: hiện nay có những bút thông minh (smart pen), tên mới là bút insulin có kết nối (connected insulin pen - CIP), với khả năng ghi nhận và chuyển dữ liệu về liều đã sử dụng qua app điện thoại. Điều trị béo phì: FDA (Food and Drug Administration)- Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ chấp thuận thêm một đồng vận thụ thể GLP-1 là semaglutid, bên cạnh liraglutid 3mg trước đây. Tách bệnh thận mạn ra một phần riêng khỏi biến chứng mạch máu nhỏ, thêm khuyến cáo sử dụng finerenon [45] điều trị ĐTĐ típ 2 phối hợp các thuốc nhằm tạo ra đủ hiệu lực giúp đạt được hoặc duy trì mục tiêu đường huyết theo ba nguyên tắc chính: hạn chế hạ đường huyết quá mức, hạn chế tăng cân, ưu tiên giảm cân, tiết kiệm chi phí cho người bệnh. Do đó, các thuốc có thể hay sử dụng đến bao gồm: DPP-4i (Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor); GLP1-RA (glucagon-like peptide-1 receptor agonist); SGLT-2i (Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor); SGLT-2i thì có Forxiga và Jardiance hay được sử dụng; một số loại insulin, SU và TZD. Kiểm soát đường huyết, huyết áp và lipid máu cho bệnh nhân cao tuổi [45]

1.5. Một số mô hình gây ĐTĐ típ 2 thực nghiệm trên động vật

Bệnh đái tháo đường (ĐTĐ) là một rối loạn chuyển hóa có đặc điểm chính là glucose trong máu tăng cao, do thiếu insulin tuyệt đối hoặc tương đối và/hoặc giảm chức năng của insulin; Đái tháo đường là tình trạng tăng đường huyết mạn tính đặc trưng bởi những rối loạn chuyển hoá carbohydrat, có kèm theo rối loạn chuyển hóa lipid và protein do giảm tuyệt đối hoặc tương đối tác dụng sinh học của insulin và/hoặc tiết insulin [46]. Cho đến nay, các mô hình động vật đã được phát triển để nghiên cứu về bệnh ĐTĐ, bao gồm mô hình trên

các loài linh trưởng, các động vật có vú lớn như chó, mèo, lợn và các loài động vật nhỏ. Trong các mô hình thử nghiệm trên các loài động vật nhỏ, chuột và các loài gặm nhấm thường được sử dụng ưu tiên vì có thể dễ dàng giúp giảm chi phí nghiên cứu cho chế độ ăn và nơi cư trú. Thông thường, các mô hình động vật gặm nhấm được phân thành hai loại chính: (1) mô hình di truyền hoặc cảm ứng tự phát và (2) mô hình không di truyền hoặc cảm ứng thực nghiệm [47]. Các mô hình cảm ứng thực nghiệm được tạo ra bằng phương pháp hóa học với hai tác nhân phổ biến là alloxan và streptozotocin, chế độ ăn uống hoặc kết hợp cả hai. Trong nghiên cứu trước đây, tác nhân hóa học để gây ĐTĐ típ 2 là streptozotocin tiêm liều trung bình (40 – 55 mg/kg) trên chuột đã được nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo trước đó. Phương pháp này có ưu điểm là gây ĐTĐ típ 2 với cơ chế bệnh sinh tương tự như đối với cơ chế bệnh sinh trên người: sử dụng thức ăn nhiều chất béo để gây đề kháng insulin, sau đó là liều STZ từ thấp đến trung bình để gây ra tình trạng thiếu insulin từ nhẹ đến trung bình [48-50].

1.5.1. Mô hình streptozotocin/ alloxan

Streptozotocin hay 2-deoxy-2 (3-methyl-3-nitrosoureido) -D-glucopyranose (STZ) là một chất tương tự nitrosourea được sử dụng rộng rãi trong các mô hình gây ĐTĐ ở chuột. Tế bào β đảo tụy tương đối nhạy cảm với STZ. STZ được hấp thu vào bên trong tế bào β nhờ các chất vận chuyển GLUT-2 ở trên màng tế bào [51]. STZ phá hủy tế bào β đảo tụy thông qua cơ chế chính là alkyl hóa ADN do chuyển nhóm methyl từ STZ vào phân tử ADN gây ra một chuỗi các phản ứng sau đó và cuối cùng dẫn đến phân mảnh ADN. Ngoài ra, sự tạo thành các gốc oxy hóa có nguồn gốc oxy ROS (reactive oxygen species) cũng góp phần trong tác dụng của STZ lên phá hủy tế bào β [52]. Việc sử dụng STZ và nicotinamid trong mô hình gây ĐTĐ thực nghiệm đã được khuyến cáo vì nicotinamid có tác dụng bảo vệ những tế bào tiết insulin chống lại độc tính của STZ [53]. Liều cao STZ gây giảm bài tiết insulin gây ra ĐTĐ típ 1 trong khi liều thấp STZ gây ra sự suy giảm nhẹ trong việc tiết insulin, gần giống với các đặc tính của giai đoạn muộn ĐTĐ típ 2 [54], [55].

Năm 1943, Dunn và McLetchie báo cáo rằng alloxan có khả năng gây ra ĐTD ở động vật [56]. Alloxan gây ĐTD bằng cơ chế dựa trên sự phá hủy tế bào β đảo tụy dẫn đến làm suy giảm số lượng cũng như chất lượng insulin được tiết ra sau đó. Điều này được gây ra bởi 2 tác dụng riêng biệt của alloxan: 1: ức chế có chọn lọc sự bài tiết insulin gây ra bởi sự tăng glucose máu thông qua ức chế thụ thể glucokinase, 2: gây ra sự hình thành ROS dẫn đến hoại tử có chọn lọc các tế bào β [57],[52]. Alloxan có thể gây độc tính ở trên thận vì phạm vi liều hiệu quả của nó rất hẹp nên ít được sử dụng [58].

1.5.2. Mô hình ăn chế độ ăn giàu chất béo

Béo phì sẽ phát triển ở các loài gặm nhấm khi chúng được ăn một chế độ ăn nhiều chất béo (40-60% tổng lượng calo). Các mô hình này sẽ có đặc điểm là gây thừa cân, béo phì, rối loạn dung nạp glucose và kháng insulin. Độ tuổi thích hợp nhất của các loài gặm nhấm để gây ĐTD bằng mô hình này là 6-8 tuần tuổi. Sau khoảng 4 tuần, các biểu hiện đặc trưng của ĐTD đã xuất hiện tuy nhiên thời gian cho ăn càng lâu thì các đặc trưng của kháng insulin càng tăng lên. Mức độ tăng đường huyết phụ thuộc vào khối lượng và loại chất béo cũng như thời gian cho ăn chất béo cao [59].

1.5.3. Mô hình kết hợp chế độ ăn giàu chất béo và STZ.

Với mô hình này, chuột được cho ăn chế độ ăn giàu chất béo để tạo ra đề kháng insulin sau đó sẽ tiêm STZ để gây ra rối loạn chức năng tế bào β đảo tụy. Mô hình này sao chép cơ chế bệnh sinh tương tự như cơ chế bệnh sinh ở người bị ĐTD típ 2 [61]. Mặc dù thời gian để phát triển ĐTD tương đối dài (8 tuần), và có nhiều cách tiếp cận phương pháp này bằng cách sử dụng các loại chất béo khác nhau kết hợp với các mức liều STZ từ thấp đến trung bình nhưng tỉ lệ thành công của mô hình này cao hơn so với các mô hình khác. Do đó, mô hình kết hợp chế độ ăn giàu chất béo và STZ có thể là một phương pháp thay thế để gây ĐTD típ 2 ở chuột [47].

Ngoài ra, còn có nhiều mô hình gây đái tháo đường ở trên động vật thực nghiệm khác như: mô hình chuột béo phì di truyền và mô hình chuột đái tháo

đường di truyền; mô hình dinh dưỡng bằng fructose, mô hình cảm ứng bởi monosodium glutamat (MSG), mô hình kết hợp STZ và nicotinamid... [47], mô hình gây ĐTĐ típ 2 bằng phương pháp di truyền [60].

1.5.4. Mô hình gây ĐTĐ típ 2 bằng phương pháp biến đổi gen

Cùng với phát hiện về cơ chế phân tử của insulin, các nhà khoa học cũng đưa ra các phương pháp gây ĐTĐ cho động vật bằng cách bất hoạt hoặc biến đổi gen. Một số mô hình động vật được tạo ra bằng cách bất hoạt gen mã hóa insulin receptor như: Chuột nhắt ĐTĐ típ 2 LIRKO (Liver-specific insulin receptor knockout) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào gan. Chuột nhắt ĐTĐ típ 2 MIRKO (muscle specific insulin receptor knockout) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào cơ vân. Chuột nhắt ĐTĐ típ 2 NIRKO (CNS-specific insulin receptor knockout) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào não. Chuột nhắt ĐTĐ típ 2 FIRKO (adipose tissue specific knockout of the IR) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào mỡ. Chuột nhắt BATIRKO xóa IR trong mô mỡ nâu. Chuột nhắt BIRKO thiếu IR trong tế bào β tuyến tụy [61].

1.5.5. Mô hình ĐTĐ típ 2 nguyên phát:

Thường được sử dụng các động vật mắc bệnh đái tháo đường típ 2 có thể được lấy từ việc chọn giống (các động vật có một hoặc một số gen đột biến được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác) hoặc từ lai tạo chuột béo phì không bị đái tháo đường bằng nhân giống lặp đi lặp lại qua nhiều thế hệ với chuột BB, chuột đái tháo đường béo phì Tsumara Suzuki. Những động vật này bị đái tháo đường là do di truyền hoặc do khiếm khuyết đơn hoặc đa gen (chuột KK, chuột db/db (chuột mắc ĐTĐ típ 2 do đột biến gen liên quan đến thụ thể leptin) hoặc chuột béo Zucker). Bệnh đái tháo đường típ 2 ở người phần lớn là kết quả của sự tương tác giữa môi trường và sự khiếm khuyết đa gen. Do đó, động vật khiếm khuyết đa gen sẽ gần giống với người hơn động vật khiếm khuyết đơn gen [62].

1.6. Tổng quan về nghiên cứu *in silico*

Quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc mới là một quá trình rất phức tạp, gồm nhiều giai đoạn, từ lựa chọn mục tiêu phân tử của thuốc mới cho đến

khi thuốc được phê duyệt và đưa ra thị trường. Quá trình này tốn nhiều thời gian và tiền bạc mà tỷ lệ thành công lại rất thấp (< 2% của hợp chất mới được nghiên cứu có thể có đặc tính sinh học phù hợp để làm thuốc).

Hiện nay, vấn đề thiết kế thuốc hiệu quả nhất đã được giải quyết bằng cách sử dụng kỹ thuật thiết kế thuốc dựa trên sự hỗ trợ của máy tính [63]. Trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc mới, máy tính là công cụ hỗ trợ đắc lực, từ việc tìm kiếm các hợp chất hóa học có tác dụng sinh học, đến tối ưu hóa cấu trúc các hợp chất nhằm tăng hoạt tính sinh học, giảm độc tính, nghiên cứu các tính chất dược động học của thuốc, đến các khâu nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng. Tất cả được gọi chung là phương pháp “*in silico*” nhằm phân biệt với các phương pháp còn lại như *in vitro*, *in vivo* và *in situ*.

Thuật ngữ *in silico* có nguồn gốc từ tiếng Latin, dùng để diễn đạt các công việc được thực hiện trên máy tính thông qua các chương trình giả lập dùng để mô phỏng các quá trình tự nhiên. So với các phương pháp thực nghiệm truyền thống, phương pháp *in silico* có ưu thế giúp thiết kế những phân tử thuốc mới với những ưu thế vượt trội như: giải thích bản chất phân tử của các tương tác thuốc, rút ngắn thời gian thực hiện. Ngoài ra, phương pháp *in silico* cho phép dự đoán hoạt tính sinh học sử dụng các mô hình toán học, nghiên cứu dự đoán cơ chế tác dụng, cơ chế gây độc của các hợp chất. Do đó, phương pháp này giúp tiết kiệm đáng kể cả thời gian và tiền bạc trong việc phát triển một thuốc mới.

1.6.1. Docking phân tử (Molecular docking)

Docking là phương pháp thiết kế thuốc dựa vào cấu trúc mục tiêu tác động, nghiên cứu khả năng gắn kết một hay nhiều phân tử cơ chất vào mô hình điểm gắn kết (binding site - active site) của protein, enzym, DNA.... trong không gian ba chiều [64]. Docking phân tử hay protein docking là kỹ thuật mô hình hóa nhằm dự đoán vị trí và cấu hình thuận lợi mà phân tử cơ chất (ligand) có thể gắn kết trên phân tử protein. Phân tử cơ chất được dịch chuyển trong không gian bao quanh phân tử protein để tìm vị trí có năng lượng liên kết tự do âm nhất, sử dụng các hàm đánh giá và phương pháp tìm kiếm cực trị toàn cục khác nhau. Từ

đó có thể tìm ra những hợp chất có tác dụng dược lý tốt mà chưa cần làm thí nghiệm.

Khi cơ chất gắn kết lên một phân tử protein mục tiêu, cần chú ý đến sự phù hợp về hình dạng, kích thước và năng lượng liên kết tự do giữa cơ chất với đích. Năng lượng liên kết của phức hợp cấu tử - receptor được tính bởi hàm tính điểm (*scoring function*) và được cho bởi hằng số liên kết (K_d) và năng lượng tự do Gibbs (ΔG). Dự đoán về năng lượng liên kết được thực hiện bằng cách đánh giá những tương tác hóa lý quan trọng bao gồm: các tương tác liên phân tử, các ảnh hưởng của hiệu ứng hòa tan (solvat), hiệu ứng entanpy và entropy [65]. Do đó, số lượng các tham số hoá lý được đánh giá càng lớn thì độ chính xác càng cao. Tuy nhiên, nếu số lượng biến càng lớn thì thời gian tính toán sẽ lâu. Các hàm tính điểm hiệu quả nên đưa ra sự cân bằng giữa độ chính xác và tốc độ, đây là một điểm quan trọng khi làm việc với cơ sở dữ liệu lớn.

Ngoài yêu cầu phù hợp về hình dạng, kích thước, giữa cơ chất và mục tiêu còn những tương tác khác như tương tác Van der Waals, tương tác tĩnh điện, liên kết hydro, liên kết cộng hóa trị... Tuy nhiên, protein thường có kích thước lớn và mềm dẻo nên rất khó để khảo sát hết tất cả các khả năng tương tác giữa protein và cơ chất. Trong docking, phân tử protein thường được đưa vào dưới dạng cấu trúc cứng, cơ chất có thể chuyển động tương đối so với protein và thay đổi cấu hình. Một số phần mềm docking cũng cho phép thay đổi cấu hình trên một số đơn vị acid amin [66].

Docking có vai trò quan trọng trong việc dự đoán ái lực và hoạt tính của các dược chất đối với protein, từ đó dự đoán khả năng hoạt hóa hoặc ức chế một protein chức năng. Bên cạnh đó, docking cũng giúp dự đoán trung tâm hoạt động và vị trí, cấu hình thuận lợi của cơ chất tham gia phản ứng khi xem xét cơ chế xúc tác của enzym [67].

***Quy trình docking**

Quy trình docking được thực hiện thông qua ba bước chính:

Bước 1: Chuẩn bị phối tử;

Bước 2: Chuẩn bị protein;

Bước 3: Mô phỏng docking.

Chuẩn bị phối tử: Cấu trúc của các phối tử có thể được lấy từ hệ thống dữ liệu có sẵn như PubChem, Zinc. Ngoài ra, chúng ta có thể sử dụng các phần mềm như ChemDraw, Chems sketch... để xây dựng cấu trúc. Sau khi xây dựng được cấu trúc 3D, cần tiến hành các bước gồm: gán trường lực, tối ưu hóa năng lượng và xây dựng file pdbqt để chuẩn bị cho quá trình docking.

Chuẩn bị protein: Cấu trúc tinh thể của phức hợp protein thường có sẵn và được lấy từ ngân hàng dữ liệu protein RCSB (<https://www.rcsb.org/>). Trong trường hợp chưa có sẵn, chúng ta có thể xây dựng cấu trúc 3D theo phương pháp mô phỏng tính tương đồng (homology modeling) [68]. Quá trình chuẩn bị protein thường gồm: loại nước và các phối tử (nếu có), thêm hydro, gán trường lực, hiệu chỉnh trạng thái proton hóa của các acid amin và xây dựng file pdbqt.

Mô phỏng docking: Trước khi tiến hành docking, cần khoanh vùng tìm kiếm (grid box) cho thuật toán. Vị trí của vùng tìm kiếm thông thường sẽ được đặt ở trung tâm hoạt động của protein. Kích thước của vùng tìm kiếm không nên quá lớn và không nên quá nhỏ. Nếu quá lớn thì quá trình docking sẽ tốn kém thời gian và độ lặp lại không cao. Nếu quá nhỏ thì phần mềm chỉ tìm kiếm được một vùng rất nhỏ, không có ý nghĩa. Sau khi xác định vị trí và kích thước của vùng tìm kiếm, phần mềm sẽ tự động tìm kiếm và đưa ra cấu dạng phù hợp với năng lượng thấp nhất. Cuối cùng, các phần mềm chuyên dụng như: Discovery Studio, MOE, Pymol... sẽ được sử dụng để biểu diễn tương tác của cấu dạng này với protein.

1.6.2. Mô phỏng động lực học phân tử

Quy trình mô phỏng động lực học phân tử (MD) được tiến hành qua 4 bước chính sau: 1. Lựa chọn mô hình tương tác; các điều kiện giới hạn; các điều kiện ban đầu (vị trí, vận tốc...); lựa chọn tập hợp (NVE, NVT, NPT...); trường lực; nhiệt độ, áp suất; bộ tích phân (integrator), bộ điều nhiệt (thermostat)... 2. Thực hiện mô phỏng cho đến khi đạt được sự cân bằng (equilibration) 3. Thực hiện

mô phỏng sản xuất (production) để thu thập các giá trị trung bình về vị trí, vận tốc... 4. Phân tích kết quả.

1.6.3. Sàng lọc các hợp chất giống thuốc

Các hợp chất được gọi là “giống thuốc” khi chúng đáp ứng ít nhất 2 trong 5 các tiêu chí của quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski.

Đặc điểm giống thuốc là một khái niệm định tính được sử dụng trong thiết kế thuốc, ước tính dựa trên đặc điểm cấu trúc phân tử [69]. Một số đặc điểm cấu trúc nhất định của các hợp chất có thể dự đoán khả năng trở thành một loại thuốc hay không. Việc nghiên cứu về các đặc tính này của các hợp chất là một trong những bước rất quan trọng trong quá trình phát triển thuốc. Quy tắc được xây dựng bởi Christopher A. Lipinski vào năm 1997, dựa trên quan sát rằng hầu hết các loại thuốc điều trị là các phân tử tương đối nhỏ và thân dầu [70]. Nó dự đoán xác suất thành công hoặc thất bại cao do “giống thuốc” đối với các phân tử tuân thủ 2 hoặc nhiều trong số các quy tắc sau:

- Khối lượng phân tử: $MW < 500$ Dalton;
- Không có nhiều hơn 5 nhóm cho liên kết hydro (các nhóm -NH và -OH);
- Không có nhiều hơn 10 nhóm nhận liên kết hydro (các nguyên tử N và O);
- LogP (Hệ số phân bố octanol/nước): $\text{LogP} < 5$;
- Độ khúc xạ mol phải nằm trong khoảng 40-130.

1.6.4. Dự đoán ADMET

Trong quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc mới, một hợp chất có thể trở thành thuốc phải trải qua rất nhiều giai đoạn đánh giá, tốn kém rất nhiều thời gian và tiền bạc. Khi các ứng cử viên thuốc được phát hiện, một bước quan trọng đó là đánh giá các đặc tính hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính của chúng (ADMET). Người ta ước tính rằng có khoảng 40%–60% ứng cử viên thuốc bị rút lại trong các thử nghiệm tiền lâm sàng vì lo ngại về ADMET [71]. Các hợp chất phải có khả năng vượt qua các hàng rào sinh lý khác nhau như: hàng rào tiêu hóa, hàng rào máu não và hàng rào vi tuần hoàn để đến được các đích, phát huy tác dụng được lý. Khi vào cơ thể, chúng có thể chuyển đổi

thành chất cho tác dụng dược lý hoặc có thể trở thành chất độc, dẫn đến các tác dụng phụ [72].

1.7. Tổng quan về cây Xấu hổ

1.7.1. Vị trí phân loại:

Tên khoa học: *Mimosa pudica* L.

Tên gọi khác: cây trinh nữ, cây e thẹn, cây mắc cỡ, hàm tu thảo [73].

Vị trí phân loại trong giới thực vật [74]. Thuộc ngành ngọc lan (*Magnoliophyta*); lớp: ngọc lan (*Magnoliopsida*); phân lớp: hoa hồng (*Rosidae*); bộ: đậu (*Fabales*); họ: đậu (*Fabaceae*); phân họ: trinh nữ (*Mimosoideae*); chi: trinh nữ (*Mimosa*); loài: *Mimosa pudica* L.

1.7.2. Đặc điểm thực vật và phân bố

Đặc điểm hình thái

Cây nhỏ, thân có gai hình móc. Lá hai lần kép lông chim, cuống phụ xếp như hình chân vịt, khi khê động vào lá sẽ cụp xuống. Cuống chung gầy, mang nhiều lông, dài 4 cm, cuống phụ 2 đôi, có lông trắng cứng. Lá chét 15-20 đôi nhỏ, gần như không có cuống. Hoa màu tím đỏ, tụ thành hình đầu trái xoan. Quả giáp dài 2 cm, rộng 3 mm, tụ thành hình ngôi sao, ở phần giữa các hạt quả hẹp lại, có lông cứng ở mép. Hạt gần như hình trái xoan, dài 2 mm, rộng 1.5 mm [73].

Phân bố và bộ phận dùng

Cây mọc hoang ở nhiều nơi, thường trên phần đất khô cằn do có khả năng cố định đạm, xa khu dân cư đông đúc. Cây được tìm thấy ở các ven đường cái, bờ đê, bãi hoang ở nhiều nơi ở nước ta và một số nước ở khu vực nhiệt đới của Châu Mỹ, Châu Phi và Châu Á.

Bộ phận dùng là toàn cây hoặc lá, rễ, có thể thu hái quanh năm, rửa sạch đất cát, thái mỏng, phơi hay sấy khô [73].

1.7.3. Thành phần hóa học

Nghiên cứu về thành phần hóa học cho thấy, cây Xấu hổ có chứa các hợp chất như phytosterol, acid amin, alkaloid, tanin, glycosid, acid béo [75]. Thành phần hóa học của Xấu hổ đã được nhiều nghiên cứu công bố và các nghiên cứu cũng khá nhất quán về các hợp chất có mặt trong cây Xấu hổ bao gồm có: các alkaloid, terpenoid, glycoprotein, crocetin dimethyl ester, phytosterol, glycosid, flavonoid, quinon, hợp chất phenolic, saponin, coumarin và tanin [4].

Các phân tích hóa học khác về thành phần các flavonoid và phenol trong toàn thân, trong rễ, trong lá và trong hạt Xấu hổ cho thấy lượng flavonoid toàn phần và lượng phenol toàn phần trong lá là cao nhất và cao hơn đáng kể so với các bộ phận khác trong toàn cây [76]. Cụ thể như sau:

Bảng 1.3. Lượng flavonoid toàn phần- total flavonoid (TF) và lượng phenol toàn phần- total phenolic (TP) có trong căn chiết từ toàn thân cây Xấu hổ và căn chiết của từng bộ phận riêng biệt như: lá, hạt, thân cây Xấu hổ [29]

Mẫu cao chiết XH	TF (mg/g)	TP (mg/g)
Toàn cây	0,42±0,03	2,55±0,33
Thân cây	0,34±0,02	2,58±0,51
Lá	0,81±0,02	9,87±0,07
Hạt	0,43±0,03	2,31±0,04

- Một số chất có hoạt tính đã được phân lập như:

Acid mimosin jasmonic; C-glycosylflavon; 2-hydroxymethyl-chroman-4-1; phenol keton; 7',3',4'-trihydroxy-3,8-dimethoxyflavon; tubulin; L-malat, magie kali trans-aconitat; dimethyl amoni, kali 5-O-β-D-glucupyranosylgentsiat, mimupodin [77].

Nghiên cứu thành phần chiết xuất lá Xấu hổ cho thấy sự hiện diện của các thành phần có hoạt tính sinh học như: mimosin, terpenoid, flavonoid, glycosid, alkaloid, quinin, phenol, tanin, saponin và coumarin [78].

Nghiên cứu thành phần trong rễ của cây Xấu hổ cho thấy sự hiện diện của flavonoid, phytosterol, alkaloid, acid amin, tanin, glycosid và acid béo. Dịch

chiết phân đoạn ether có thành phần chủ yếu gồm có các flavonoid, phytosterol, alkaloid và acid amin. Phân đoạn acetone có sự hiện diện của flavonoid. Phân đoạn chloroform cho thấy sự hiện diện của các alkaloid. Các loại tinh dầu và acid béo được chứa chủ yếu trong phân đoạn benzen. Rễ có các hợp chất chính như flavonoid, phytosterol, alkaloid, acid amin, tanin, glycosid và acid béo [79].

Các mô tươi được phát hiện có nor-epinephrin, d-pinitol (3-monomethyl ether của inositol) và β -sitosterol [78].

Chiết xuất hạt: phần cao chiết cồn của hạt MP cho thấy số lượng hợp chất phenol cao nhất so với các phần khác. Tổng hàm lượng phenol trong cao chiết cồn của hạt MP, phân đoạn n-hexan, phân đoạn chloroform và phân đoạn n-butanol lần lượt là 224,38 μg , 171,16 μg , 193,74 μg và 221,16 μg GAE/ mg. Phần cao chiết cồn của hạt MP có lượng flavonoid cao nhất so với các phần khác. Tổng hàm lượng flavonoid trong cao chiết cồn của hạt MP, phân đoạn n-hexan, phân đoạn chloroform và phân đoạn n-butanol lần lượt là 186 μg , 126,74 μg , 156,97 μg và 166,27 μg QE/mg. Trong nghiên cứu này, phân tích HPLC cũng xác nhận sự hiện diện của một số phenol và flavonoid trong đó. phần cao chiết cồn của hạt MP có hàm lượng TPC và TFC cao nhất, tiếp theo lần lượt là các phân đoạn n-butanol, chloroform và n-hexan. Trong đó: tổng hàm lượng phenol của dịch chiết được biểu thị bằng mg đương lượng acid gallic (GAE) trên gam mẫu; tổng hàm lượng flavonoid của dịch chiết được biểu thị bằng mg đương lượng quercetin (QE) trên gam mẫu [80].

Các hợp chất khác:

Nghiên cứu về thành phần hóa học cây Xấu hổ người ta đã phân lập được mười bốn hợp chất đó là: crocetin, crocin [81]; 6-hydroxy flavon (2), 2'-hydroxy flavanon [4, 82], acid p-hydroxy benzoic, acid p-coumaric; acid chlorogenic, acid jasmonic và L- mimosin [83]. Các thành phần này đã được xác định cấu trúc bằng cách so sánh dữ liệu hóa lý và phổ đặc trưng của chúng với dữ liệu được báo cáo trong tài liệu. Acid caffeic, ethyl gallat, catechin, acid gallic và tyrosin cũng là những thành phần đã được xác định là có mặt trong cây Xấu hổ bằng phép đo sắc ký lớp mỏng (TLC) kết hợp với phương pháp khối phổ (MS).

Dùng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phân tích phân đoạn EtOAc của toàn bộ cây Xấu hổ cũng cho thấy sự hiện diện của các hợp chất hữu cơ như: 2'-hydroxy flavanon, 6-hydroxy flavon, ethyl gallat, catechin và acid gallic [83].

Dùng phương pháp phân tích sắc kí khí quang phổ khối (Q-TOF GC MS) cho thấy căn chiết methanol cây Xấu hổ có mặt một số hoạt chất quan trọng như: iminotricarbonitril, phenylbutanol, acid naphthalein carboxylic, acid eicosatriynoic, acid β -D-glucopyranosiduronic và năm hợp chất không xác định trong số 46 hợp chất được phát hiện [84].

Từ phân đoạn EtOAc của cao chiết Xấu hổ, người ta cũng phân lập được từ các hợp chất: stigmasterol; quercetin; avicularin. Các hợp chất này đã được chứng minh là có tác dụng hạ đường huyết với cơ chế ức chế α -glucosidase [5].

Hoạt chất stigmasterol phân tách từ cây Xấu hổ có tác dụng như một chất thải sắt kim loại, peroxid và lipid peroxid (là các sản phẩm đẩy nhanh quá trình lão hóa và gây tổn thương tế bào); Stigmasterol còn được gọi là yếu tố chống cứng khớp; giá trị IC₅₀ của stigmasterol được tìm thấy là 91,08 μ g/ mL so với acarbose là 351,02 μ g/ mL [85], [39].

Quercetin là một flavonoid được tách chiết từ cây Xấu hổ có tác dụng nhiều mặt như làm giảm mức đường huyết, bảo vệ tuyến tụy khỏi stress oxy hóa, trong khi acarbose chỉ hoạt động bằng cách giảm mức đường huyết bằng cách ngăn chặn quá trình tiêu hóa carbohydrat. Trong tác dụng kết hợp của một flavonoid, phân tử phụ thuộc vào loại, số lượng và vị trí của các nhóm glycosyl liên quan đến tác dụng cho proton của flavonoid. Quercetin có thể cho thấy hoạt tính cao hơn acarbose do tác động kết hợp của việc có nhóm 3",4"-dihydroxy cùng với sự thay thế 5"-OH và 3" [86].

1.7.4. Tác dụng dược lý

Tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường

Một dạng thuốc kết hợp tám loại thảo dược khác nhau bao gồm cả cây Xấu hổ được thử nghiệm trên mô hình chuột bị đái tháo đường do streptozotocin

với liều 50 mg/kg và 100 mg/kg cho kết quả là sự giảm đáng kể nồng độ glucose trong máu đồng thời cũng làm tăng lượng insulin huyết tương, glycogen trong gan và hemoglobin toàn phần [87].

Nghiên cứu khác của Sutar và các cộng sự trên mô hình chuột bị đái tháo đường do alloxan đã chỉ ra hiệu quả làm giảm đáng kể nồng độ glucose trong máu sau khi sử dụng cao chiết cây Xấu hổ khi so với chất chuẩn là metformin [88].

Cao chiết của cây Xấu hổ cũng được chứng minh là hỗ trợ điều trị đái tháo đường, có hiệu quả giảm đường huyết và trọng lượng trên chuột béo phì bị đái tháo đường. Hơn nữa, nghiên cứu cũng chỉ ra tác dụng ức chế enzym α -glucosidase) [5].

Những hợp chất có khả năng ức chế enzym α -glucosidase đã được phân lập từ dịch chiết cây Xấu hổ bao gồm stigmasterol, quercetin và avicularin với IC_{50} lần lượt là 91.08 ± 1.54 , 75.16 ± 0.92 và 481.7 ± 0.703 $\mu\text{g} / \text{mL}$ so với thuốc đối chứng là acarbose (351.02 ± 1.46 $\mu\text{g} / \text{mL}$) [5].

Một hợp chất khác là myoinositol đã được phân lập từ dịch chiết methanol của cây Xấu hổ và được thử nghiệm trên mô hình chuột được tiêm streptozotocin mang lại những hiệu quả liên quan tới hoạt động đáp ứng của insulin. Myoinositol cải thiện sự điều hoà các yếu tố $\text{PPAR}\gamma$, glucose transporter típ 4 trong mô mỡ bằng cách tương tác với các yếu tố này tại vị trí hoạt động. Hợp chất cũng biểu hiện tiềm năng điều trị thông qua tác dụng ngăn cản sự tăng nồng độ lipid cấp và mạn tính, khả năng bảo vệ tế bào ở các cơ quan như gan, thận, tụy, tim và mô mỡ ở chuột mắc đái tháo đường [89].

Tác dụng ức chế thần kinh trung ương

Những kết quả nghiên cứu chứng minh kinh nghiệm trong dân gian dùng cây Xấu hổ để chống mất ngủ. Xấu hổ có tác dụng hiệp đồng với hexobarbital, meprobamat đồng thời tăng tác dụng của bibactal cho thấy tác dụng ức chế thần kinh trung ương của cây Xấu hổ [73].

Một nghiên cứu khác chỉ ra tác dụng an thần của rễ cây Xấu hổ thông qua khả năng làm dịu, giảm các kích thích thần kinh và mang lại hiệu quả trong điều trị mất ngủ, hồi hộp [75], [88].

Dịch chiết phân đoạn ethyl acetat của cây Xấu hổ cải thiện các hành vi liên quan đến khả năng học tập và ghi nhớ ở chuột dựa trên cơ chế làm tăng các chất truyền tín hiệu ở hệ thần kinh như dopamin, norepinephrin và các thay đổi trong hoạt động của acetylcholinesterase và caspase-3 [90].

Tác dụng kháng khuẩn:

Nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch nuôi cấy *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumonia* và *Citrobacter divergens* với cao chiết methanol từ thân và lá cây Xấu hổ ở các nồng độ 50, 100 và 200 µg/đĩa cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của cây [91].

Tác dụng làm lành vết thương

Kanan và các cộng sự đã tiến hành đánh giá tác dụng làm lành vết thương qua cơ chế kháng nấm của các cao chiết từ thân và rễ cây Xấu hổ khi so với chất đối chứng là gentamycin, trong đó phân đoạn cao chiết methanol cho hiệu quả cao nhất [92].

Cây Xấu hổ có khả năng rút ngắn giai đoạn co vết thương và quá trình biểu mô hoá giúp các vết thương lành nhanh hơn [93].

Các tác dụng khác

Cây Xấu hổ còn được biết đến với khả năng làm giảm đau, giải độc acid asenơ do làm tăng hàm lượng –SH và hô hấp tế bào ở chuột được cho uống acid asenơ, khả năng ức chế hoạt động hyaluronidase và protease trong nọc độc của rắn *Echis carinatus*, *Vipera russelii* và *Naja naja* [73, 94].

Chương 2. NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu

2.1.1. Dược liệu nghiên cứu

Dược liệu nghiên cứu là lá của cây Xấu hổ (*Mimosa pudica* L.) được thu hái tại Nam Định, Việt Nam vào tháng 12/2019 và được xác định tên khoa học bởi **PGS.TS Phạm Thanh Huyền** (Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu), sau đó sấy khô và đo độ ẩm. Lưu mẫu tại Khoa Tài nguyên, Viện dược liệu (số tiêu bản: DL-251219) (Phụ lục 1)

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là cao chiết toàn phần, các phân đoạn cao chiết và hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic, phân lập được cung cấp bởi Khoa Hóa Thực vật Phân tích, Viện Dược liệu. Quá trình điều chế cao chiết và phân lập các hợp chất được trình bày trong phụ lục 2.

2.1.3. Thiết kế liều thử cho mẫu nghiên cứu

Dựa trên những nghiên cứu trước đây về tác dụng hạ đường huyết của cây Xấu hổ [95, 96], dùng mô hình thử nghiệm dung nạp glucose máu đường uống (OGTT). Trong thử nghiệm này: liều thử nghiệm trên chuột được lựa chọn như sau:

Thử nghiệm OGTT lần 1: liều 100 mg/kg với tất cả các phân đoạn và cao toàn phần.

Thử nghiệm OGTT lần 2 với phân đoạn tốt nhất: với hai mức liều 50 mg/kg và 100 mg/kg.

Sau khi xác định mức liều có tác dụng dựa theo kết quả thử nghiệm OGTT, lựa chọn mức liều để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

2.1.4. Động vật thí nghiệm

Đối tượng nghiên cứu là chuột nhắt trắng chủng Swiss, giống đực, 8 tuần tuổi, khỏe mạnh, trọng lượng trung bình 18-22 g do Viện vệ sinh dịch tễ trung

ương cấp. Chuột sau khi mua về được làm quen với phòng chăn nuôi ít nhất 1 tuần trước khi bắt đầu thí nghiệm. Được nuôi bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, chế độ ăn theo từng giai đoạn thí nghiệm và nước uống tự do theo nhu cầu của chuột.

2.1.5. Hóa chất, thuốc thử

Một số hóa chất, thuốc thử chính được sử dụng trong luận án được trình bày trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Một số hóa chất, thuốc thử chính sử dụng

STT	Tên hóa chất	Nguồn gốc
1	Streptozotocin (STZ) lọ 1g	Sigma, Singapore
2	Acid citric monohydrat và natri citrat dihydrat	Đạt tiêu chuẩn dược dụng
3	Dung dịch đệm PBS lọ 500mL	Fisher Bioreagents, USA
4	1,1,3,3-tetramethoxypropan lọ 100mL	Sigma, Singapore
5	Gliclazid (biệt dược Diamicron 60mg)	Les Laboratoires Servier Industrie-Pháp, lô SX: VN 20549 – 17
6	ELISA Nephrot kit	Thermo Fisher Scientific, USA
7	Dung dịch đệm natri photphat (pH 7,0) dung dịch GSH 10 mmol/L, nicotinamid adenin dinucleotid phosphat (NADPH), natri azid, glutathion reductase	Đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích
8	1-methyl-2-phenylindol 10,3 mmol/L, butylated hydroxytoluen 2µg/mL	
9	Dung dịch đệm (100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8,2)	

Các hóa chất và dung môi khác	• Dung môi EtOH 96%; Ethyl acetat... • Acetonitril (Sigma); • Acid formic 0.05% (Sigma); • 2',7'-Dichlorofluorescein diacetat; AG; BSA; MGO; MTT-Sigma (St. Louis, MO) • EGM-2 (Endothelial cell Growth Medium-2)- Lonza (Walkersville, MD) • HUVECs- (Manassas, VA, Mỹ); Các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người được nuôi cấy trong môi trường EGM-2 chứa 4% huyết thanh bào thai bò (FBS- fetal bovine serum) và duy trì ở nhiệt độ 37°C trong tủ ẩm tạo ẩm với 5% CO₂, • FBS (Rockville, MD) • Enzym α-glucosidase; p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid (pNPG), p-Nitrophenol; PTP-1B (tái tổ hợp ở người); p-Nitrophenyl phosphat (pNPP) (Sigma, Singapore) ...	Các dung môi chiết xuất đạt tiêu chuẩn công nghiệp. Các dung môi, hệ đệm đạt tiêu chuẩn phân tích Các hóa chất, dung môi khác đạt tiêu chuẩn được dùng
-------------------------------	---	---

2.1.6. Trang thiết bị, phương tiện, dụng cụ

Một số trang thiết bị, dụng cụ chính sử dụng trong luận án được trình bày trong bảng 2.2.

Bảng 2.2. Một số trang thiết bị, dụng cụ chính sử dụng

TT	Thiết bị	Nguồn gốc
1	Cân kỹ thuật Precisa BJ 610C	Thụy Sĩ
2	Máy chiết công nghiệp 20 l Rotary evaporator WEV-1020	Hàn Quốc
3	Máy cất quay Rotavapor R-220, Rotavapor R-200	Buchi, Thụy Sĩ
4	Máy siêu âm Power sonic 405	Powersonic, Hàn Quốc
5	Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ bao gồm cột sắc ký Agilent LC 1200 kết nối hệ khối phổ LTQ Orbitrap XL™	Thermo Scientific Company
6	Thiết bị Microplate Reader	Molecular Devices, CA, Mỹ
7	Thiết bị Multilabel plate Reader	Perkin Elmer, MA, Mỹ
8	Máy đo glucose huyết Acon On Call Plus	Acon Biotech-USA
9	Máy ly tâm lạnh	Heraeus Sepatech - Đức
10	Máy đo quang phổ UV-VIS U1800	Hitachi - Nhật Bản
11	Máy sinh hóa TC 3300 plus	ERBA Diagnostics Mannheim- USA
12	Cân phân tích Mettler moledo độ chính xác 0,1mg	Thụy Sĩ
13	Máy đo quang phổ EVO 210	Thermo-Fisher, USA
14	Máy cắt tiêu bản microtome (Leica RM2125)	Leica Biosystems - Đức.
15	Micro pipet một đầu kênh 2-20µL, 10-100 µL, 100-1000 µL Lọ đựng mẫu dùng cho hệ tiêm mẫu LC tự động Cuvet (1mL, 3mL), Eppendorf 1.5 mL	Dụng cụ dùng cho thí nghiệm

	Bông y tế, phễu lọc, đầu côn các loại Các dụng cụ thủy tinh dùng trong thực nghiệm: Pipet, bình định mức, cốc có mỏ, ống đong và các dụng cụ cần thiết khác	
--	--	--

2.1.7. Địa điểm nghiên cứu

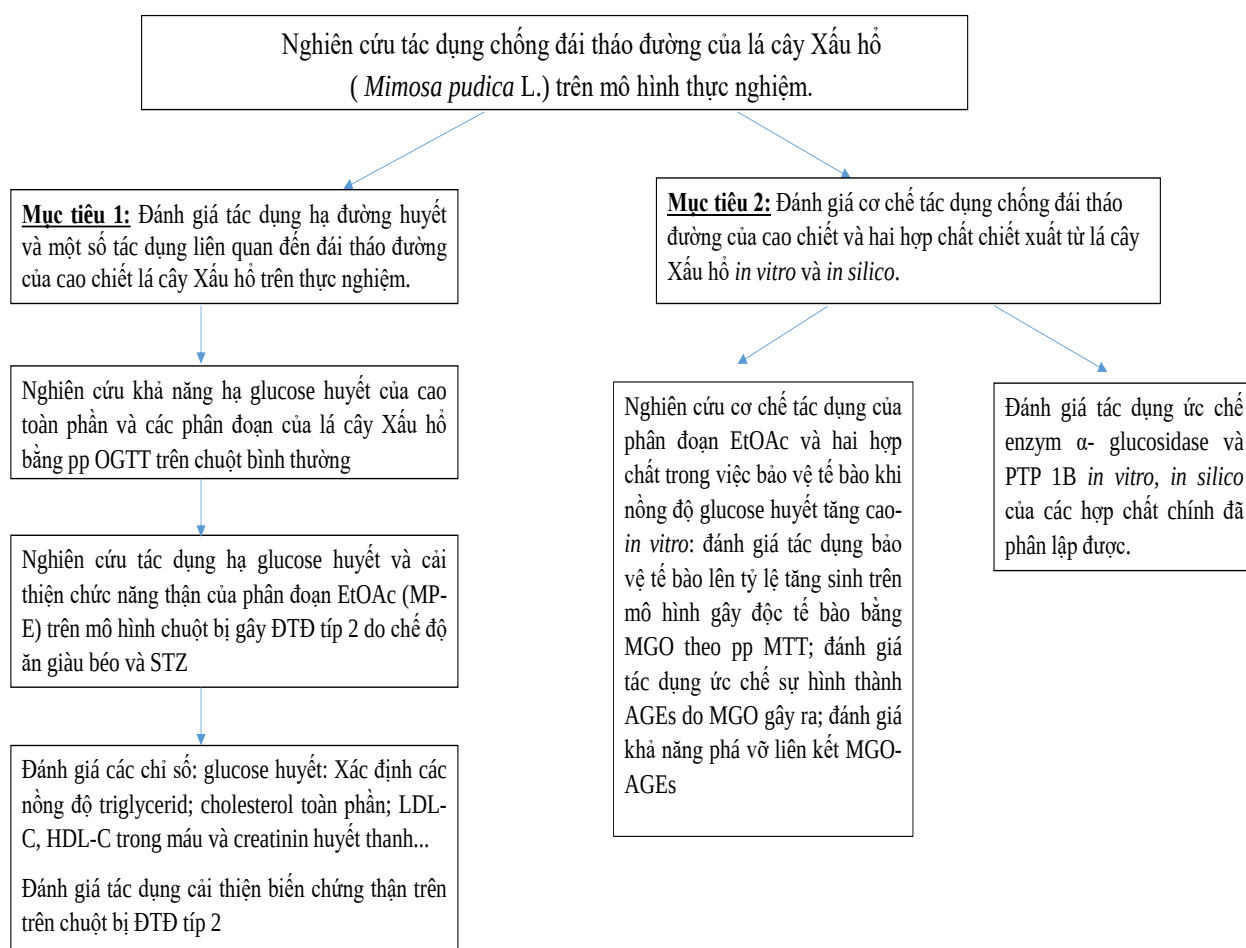
- Đánh giá khả năng sống sót của tế bào với độc tính do MGO gây ra sau khi xử lý với cao chiết cây Xấu hổ theo phương pháp MTT; Đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra của cao chiết cây Xấu hổ: tại ***Phòng thí nghiệm của giáo sư Sun Yeou Kim; Khoa Dược, Đại học Gachon (College of Pharmacy, Gachon University).***

- Các thử nghiệm *in vitro*, *in silico*: đánh giá tác dụng chống đái tháo đường *in vitro*; *in silico* của các hợp chất tự nhiên đã được phân lập từ lá cây Xấu hổ: được tiến hành tại ***Bộ môn Dược lý- Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội.*** Trong đó, phương pháp *in- silico* dựa trên kỹ thuật mô hình hóa, sử dụng máy tính và các phần mềm chuyên dụng để sàng lọc ra các hợp chất có tác dụng giống thuốc.

- Các thử nghiệm *in- vivo*: đánh giá tác dụng của cao chiết lá cây Xấu hổ trên mô hình bệnh ĐTĐ típ 2 do STZ gây ra ở chuột nhắt về tác dụng hạ glucose huyết và các ảnh hưởng trên các chỉ số sinh hóa: được tiến hành tại ***Bộ môn Dược lý- Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội.***

2.2. Nội dung nghiên cứu:

Sơ đồ chung về các nội dung nghiên cứu gắn với các mục tiêu được tóm tắt như sau:



Hình 2.1. Sơ đồ chung về các nội dung nghiên cứu

Với mục tiêu 1: Đánh giá tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm.

- Nghiên cứu khả năng hạ glucose huyết của cao toàn phần và các phân đoạn cao chiết của cây Xấu hổ bằng phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) trên chuột bình thường.

Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết và cải thiện chức năng thận của cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn ethyl acetat trên mô hình chuột bị gây ĐTD kiểu típ 2 do chế độ ăn giàu chất béo và streptozotocin: Đánh giá các chỉ số: glucose huyết; xác định các nồng độ triglycerid; cholesterol toàn phần, LDL, HDL trong máu và creatin huyết thanh; Đánh giá tác dụng cải thiện biến chứng thận trên chuột bị ĐTD típ 2; Định lượng creatinin niệu, microalbumin niệu, hệ số thanh thải creatinin.

Với mục tiêu 2: Đánh giá cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ *in vitro* và *in silico*.

- Đánh giá tác dụng ức chế enzym α -glucosidase và PTP-1B *in vitro*; *in silico* của hợp chất chính phân lập được

- Nghiên cứu cơ chế tác dụng của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất trong việc bảo vệ tế bào khi nồng độ glucose tăng cao: *in vitro* : Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào lên tỷ lệ tăng sinh của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất trên mô hình gây độc tế bào bằng MGO theo phương pháp MTT; Đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra; Đánh giá tác dụng phá vỡ liên kết MGO-AGEs;

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp thử nghiệm dung nạp glucose

Phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao toàn phần và các phân đoạn cao chiết lá cây Xấu hổ theo phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) trên chuột bình thường

Nguyên tắc

Nghiệm pháp dung nạp glucose (OGTT) được tiến hành theo phương pháp được trình bày trong nghiên cứu của Chaimum-aom N và cộng sự [97].

Thử nghiệm OGTT trên chuột được tiến hành với cao ethanol toàn phần và các phân đoạn n - hexan, ethyl acetat (EtOAc) và butanol (BuOH) của cao Xấu hổ ở liều 100 mg/kg. Sau đó phân đoạn có tác dụng tốt nhất sẽ được tiến hành thử nghiệm OGTT lặp lại một lần nữa với liều 50 mg/kg và 100 mg/kg.

Cách tiến hành

Thử nghiệm OGTT với cao toàn phần và các phân đoạn với liều 100mg/kg

Chuột được nuôi ổn định trong vòng 7 ngày bằng thức ăn chuẩn từ viện vệ sinh dịch tễ trung ương và đã được kiểm tra đường huyết bằng máy đo glucose huyết Acon On Call Plus với kết quả kiểm tra glucose huyết bình

thường, sau đó tiến hành đánh dấu, chia làm 6 nhóm, mỗi nhóm 8 chuột và để nhịn đói qua đêm (chỉ sử dụng nước uống trong suốt quá trình đánh giá).

Lô 1: (Chứng trắng): được cho uống nước

Lô 2: (Chứng dương): uống gliclazid 5 mg/kg

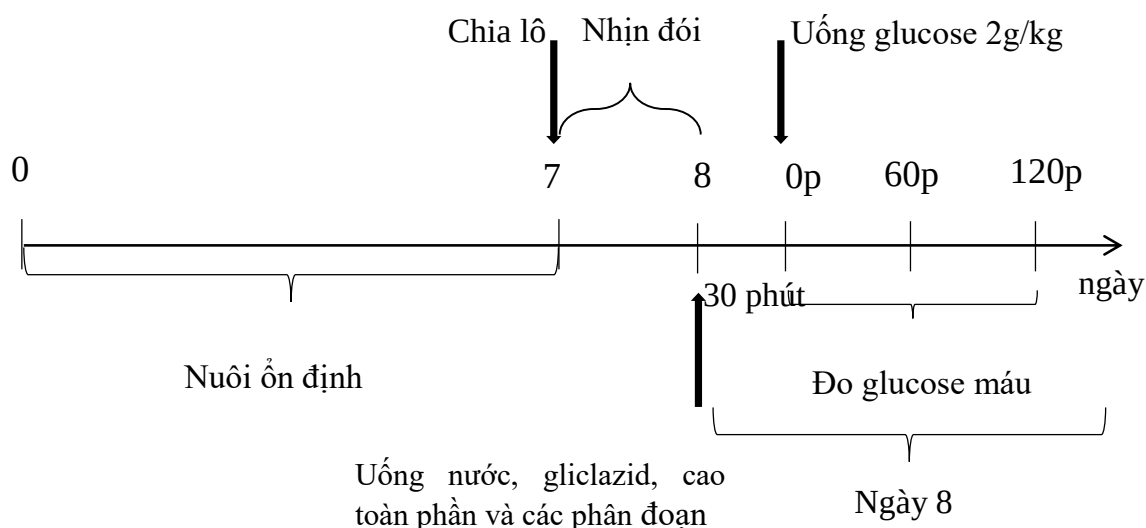
Lô 3: uống cao toàn phần ethanol liều 100 mg/kg

Lô 4: uống cao phân đoạn n-hexan liều 100 mg/kg

Lô 5: uống cao phân đoạn ethyl acetat liều 100 mg/kg

Lô 6: uống cao phân đoạn butanol liều 100mg/kg

Sau 30 phút cho chuột uống glucose với liều là 2 g/kg. Kiểm tra và ghi lại mức đường huyết tại các thời điểm 0, 60, 120 phút kể từ lúc chuột được uống glucose. Trả lại chuột vào lồng sau khi hoàn thiện đánh giá (Hình 2.3).



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm dung nạp glucose đường uống với cao tổng và các phân đoạn cao chiết lá cây Xấu hổ

Sau khi tiến hành thử nghiệm OGTT với cao toàn phần và các phân đoạn, chọn ra phân đoạn có tác dụng tốt nhất trên glucose máu chuột, sau đó tiến hành thử nghiệm OGTT với phân đoạn tốt nhất đó trên các mức liều 50, 100 mg/kg.

Chuột được nuôi ổn định trong vòng 7 ngày bằng thức ăn chuẩn từ Viện vệ sinh dịch tễ trung ương, sau đó tiến hành đánh dấu, chia làm 4 nhóm, mỗi nhóm 8 chuột và để nhịn đói qua đêm (chỉ sử dụng nước uống trong suốt quá trình đánh giá).

Lô 1: (Chứng sinh lý): được cho uống nước

Lô 2: (Chứng dương): uống gliclazid 5 mg/kg

Lô 3: uống cao phân đoạn tác dụng tốt nhất liều 50 mg/kg

Lô 4: uống cao phân đoạn tác dụng tốt nhất liều 100 mg/kg

Sau 30 phút, chuột được cho uống glucose với liều là 2 g/kg. Kiểm tra và ghi lại mức đường huyết tại các thời điểm 0, 60, 120 phút kể từ khi cho uống glucose. Trả lại chuột vào lồng sau khi hoàn thiện đánh giá.

Thông số đánh giá

Thông số đánh giá là giá trị glucose máu, đơn vị là mmol/L được đo bằng máy Acon On Call Plus.

2.3.2. Phương pháp đánh giá các tác dụng của phân đoạn có tác dụng tốt nhất trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ kiểu 2 do chế độ ăn giàu chất béo và streptozotocin

Thiết kế thí nghiệm

Tạo chuột béo phì bằng chế độ dinh dưỡng giàu chất béo trong vòng 8 tuần và gây ĐTĐ típ 2 bằng STZ [98], [99], [100].

Chuột nhắt được nuôi ổn định bằng thức ăn chuẩn từ Viện vệ sinh dịch tễ trung ương trong vòng 1 tuần. Sau đó được chia thành 2 nhóm:

Nhóm I: Nhóm chứng sinh lý được ăn chế độ ăn bình thường. Chuột được nuôi trong vòng 8 tuần. Sau 8 tuần, chuột được tiêm đệm citrat (10 mM, pH 4,5)

Nhóm II: Chuột nhắt trắng được cung cấp một chế độ ăn giàu chất béo trong vòng 8 tuần để gây béo phì. Thức ăn mua từ Viện vệ sinh dịch tễ trung ương (TĂ) có năng lượng 2200 Kcal/kg, được bổ sung lipid theo tỉ lệ 850 g TĂ và 150 g mỡ lợn, sấy khô, thức ăn mới có năng lượng 3220 Kcal/kg, với 40% năng lượng do chất béo [48], [101]. Những chuột được lựa chọn chuột béo phì là chuột có trọng lượng lớn hơn 35 g, có lớp mỡ dày hơn, đặc biệt ở vùng bụng và lưng để thực hiện gây đái tháo đường típ 2. Sau đó, những chuột béo phì này được tiêm streptozotocin (STZ) để gây ĐTĐ típ 2. STZ được pha loãng trong

dung dịch đệm citrat (10 mM, pH 4,5) với liều 50 mg/kg, có nhắc lại trong ba ngày tiếp theo. 72 giờ sau khi tiêm STZ, đo đường huyết chuột sau 8h khi chuột bị bỏ đói qua đêm. Những chuột có đường huyết cao hơn hoặc bằng 10 mmol/L [102] sẽ đạt tiêu chuẩn để tiếp tục tham gia nghiên cứu.

Phân lô nghiên cứu

Chuột bị ĐTĐ típ 2 được tiến hành phân nhóm để đánh giá tác dụng hạ đường huyết, mỗi nhóm gồm 10 con (cỡ mẫu $n = 10$) được phân phối ngẫu nhiên.

Nhóm 1: Chứng sinh lý: Chuột nhóm I được cho uống nước

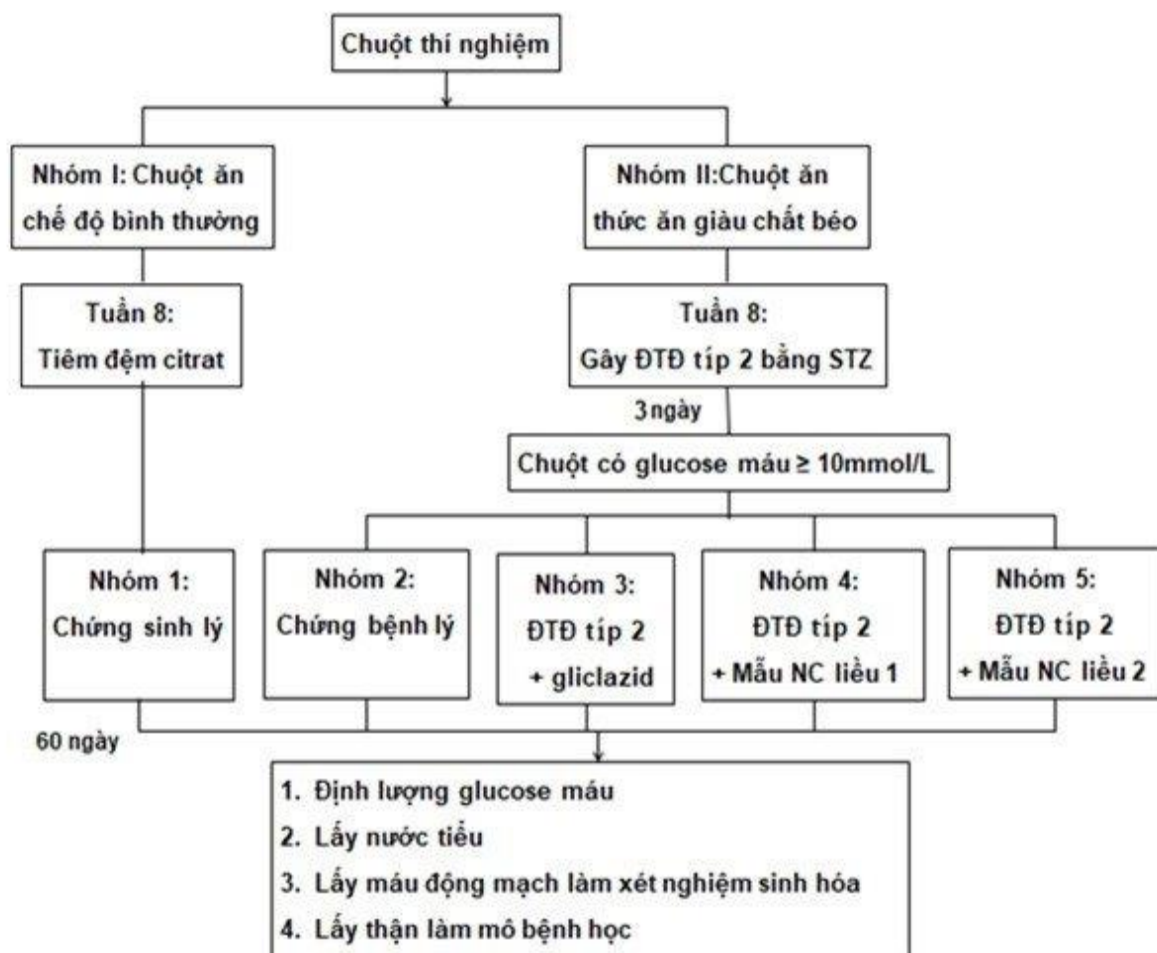
Nhóm 2: Chứng bệnh lý: Nhóm chuột bị ĐTĐ được cho uống nước

Nhóm 3: Nhóm chứng dương: chuột bị ĐTĐ và được cho uống gliclazid liều 5 mg/kg/ngày hòa tan trong nước.

Nhóm 4: Cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc (**MP-E**) 50 mg/kg: Chuột bị ĐTĐ típ 2 được cho uống cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn có tác dụng tốt nhất với liều 1: 50 mg/kg/ngày.

Nhóm 5: Cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc (**MP-E**) 100 mg/kg: Chuột bị ĐTĐ típ 2 được cho uống cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn có tác dụng tốt nhất với liều 2: 100 mg/kg/ngày.

Vào ngày 60 của quá trình thí nghiệm, chuột được nhốt trong các lồng trao đổi chất riêng lẻ và mẫu nước tiểu 24 giờ được thu thập (V nước tiểu) để phân tích các thông số nước tiểu (albumin niệu, creatinin niệu, độ thanh thải creatinin). Máu từ động mạch chủ bụng được thu thập trước khi chuột bị giết và được đem đi phân tích các chỉ số sinh hóa máu (cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL-C, HDL-C và creatinin huyết thanh). Giết chuột, mổ lấy thận, đem rửa bằng nước muối đẳng trương lạnh và ngay lập tức đông lạnh trong nitơ lỏng cho đến khi mang đi phân tích (định lượng TNF- α , IL-1 β ; định lượng MDA, đo hoạt độ enzym chống oxi hóa, mô bệnh học thận) (Hình 2.3).



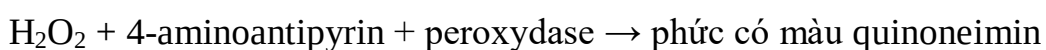
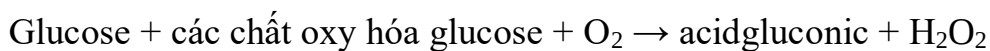
Hình 2.3. Thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng của các mẫu nghiên cứu có tác dụng tốt nhất trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ

Phương pháp xác định các thông số đánh giá trong thí nghiệm

Định lượng glucose huyết

Nguyên tắc

Glucose huyết được định lượng bằng phương pháp theo tài liệu tham khảo của tác giả Togashi Y và cộng sự [103]. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc của phản ứng:



Cường độ màu của mẫu tỉ lệ thuận với nồng độ glucose của mẫu.

Cách tiến hành

Sát trùng, tạo vết cắt trên đuôi chuột, bỏ giọt máu đầu, lấy giọt máu thứ 2 để đo glucose máu bằng máy Acon On Call Plus. Sát trùng và cầm máu.

Thông số đánh giá

Giá trị glucose máu đơn vị là mmol/L được đo bằng máy Acon On Call Plus.

Mẫu nghiên cứu được coi là có tác dụng hạ glucose huyết nếu giá trị glucose huyết thấp hơn so với lô chứng bệnh lý đạt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Định lượng triglycerid máu, cholesterol toàn phần, LDL, HDL và creatin huyết thanh

Trong bệnh ĐTĐ, rối loạn lipid máu rất phổ biến và là yếu tố quan trọng có liên quan đến sự phát triển các biến chứng của bệnh ĐTĐ. Để đánh giá tác dụng cải thiện lipid huyết của cao chiết phân đoạn lá cây Xấu hổ, chúng tôi tiến hành định lượng triglycerid máu, cholesterol toàn phần, LDL-C, HDL-C. Định lượng creatin huyết thanh để phục vụ cho việc tính toán độ thanh thải creatinin.

Tiến hành

Các mẫu máu được ly tâm ở mức 3000 vòng/phút trong 10 phút. Triglycerid (TG), cholesterol toàn phần (TC), LDL-C (low density lipoprotein cholesterol): lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp) và HDL-C (HDL (high density lipoprotein cholesterol): lipoprotein cholesterol tỷ trọng cao) và creatinin huyết thanh (SCr) được đo bằng máy phân tích sinh hóa tự động.

Thông số đánh giá

Nồng độ TC, TG, HDL-C, LDL-C đơn vị tính là mmol/L, creatinin máu đơn vị $\mu\text{mol/L}$ được đo bằng máy sinh hóa TC 3300 plus (ERBA Diagnostics Mannheim- USA).

Mẫu nghiên cứu được coi là có hiệu quả cải thiện các chỉ số lipid máu và creatinin huyết thanh nếu triglycerid máu, cholesterol toàn phần, LDL-C, creatinin huyết thanh thấp hơn và/ hoặc HDL-C cao hơn so với lô chứng bệnh lý đạt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đánh giá tác dụng cải thiện biến chứng thận trên chuột bị ĐTĐ típ 2

Để đánh giá tác dụng cải thiện chức năng thận của cao chiết phân đoạn cây Xấu hổ, nước tiểu 24h của chuột được thu thập để phân tích các thông số nước tiểu, hệ số thanh thải creatinin, các cytokin viêm, quá trình stress oxy hóa và vi phẫu mô bệnh học thận.

Định lượng creatinin niệu, microalbumin niệu, hệ số thanh thải creatinin

Tiến hành

Các mẫu nước tiểu 24 giờ được thu thập từ mỗi con chuột bị bệnh đái tháo đường được ly tâm ở mức 2000 vòng/phút trong 10 phút. Nồng độ microalbumin, creatinin trong nước tiểu được đo bằng bộ kit ELISA Nephrot. Tất cả các phân tích được thực hiện theo các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thông số đánh giá

Nồng độ microalbumin niệu đơn vị $\mu\text{g/mL}$, creatinin niệu đơn vị $\mu\text{mol/L}$, thể tích nước tiểu (mL) được đo bằng bộ kit ELISA Nephrot.

Độ thanh thải creatinin (CrCl) được tính toán ở từng con chuột theo phương trình:

$$\text{CrCl (mL/phút)} = \frac{U_{\text{Cr}} \times V_{\text{nước tiểu}}}{S_{\text{Cr}} \cdot T}$$

Trong đó:

U_{Cr} : nồng độ creatinin trong nước tiểu ($\mu\text{mol/L}$)

$V_{\text{nước tiểu}}$: thể tích nước tiểu thu thập (mL)

S_{Cr} : nồng độ creatinin trong huyết thanh thu thập tại thời điểm chính giữa khoảng thời gian thu thập nước tiểu ($\mu\text{mol/L}$)

T : thời gian thu thập nước tiểu (phút)

Mẫu nghiên cứu được coi là có tác cải thiện các thông số nước tiểu trên chuột khi nồng độ microalbumin niệu thấp hơn và hoặc creatinin / độ thanh thải creatinin cao hơn so với lô chứng bệnh lý đạt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Định lượng TNF- α và IL-1 β

Nguyên tắc

Các marker sinh học của quá trình viêm như TNF- α , và IL-1 β liên quan đến sự tiến triển của biến chứng thận ở bệnh đái tháo đường thông qua sự thay đổi tính thấm thành mạch, cơ chế giãn mạch và co mạch, chất nền ngoại bào, sự gia tăng của trung mô, nội mô và tế bào cơ trơn mạch máu, cũng như cảm ứng và gây độc tế bào, quá trình apoptosis và hoại tử trong cơ chế bệnh sinh và sự tiến triển của biến chứng thận ở bệnh ĐTĐ [104]

Do đó, định lượng TNF- α , và IL-1 β có thể cho thấy mức độ cải thiện biến chứng thận ở chuột bị ĐTĐ típ 2 do STZ.

Mô thận được nghiền đồng nhất trong dung dịch đệm HCl 10 mmol/L (pH 7.4) chứa 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0,01% Tween 80, 1 mmol/L PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) và ly tâm ở mức 9000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Dịch nổi thu được sử dụng để xác định nồng độ các cytokin. Các cytokin: yếu tố hoại tử khối u (TNF- α), và IL-1 β được đo dựa vào các kit ELISA. Các mẫu được phân tích thành hai lần theo hướng dẫn của nhà sản xuất [105].

Tiến hành

96 đĩa được ủ qua đêm ở 4°C với 100 μ g kháng thể đơn dòng TNF- α hoặc IL-1 β (1 μ g/mL) trong dung dịch đệm phosphat (PBS, pH= 7,2). Tiến hành rửa đĩa 4 lần bằng đệm rửa (PBS 1+ 0,05% Tween 20), thấm khô, ủ với dung dịch khóa bao gồm PBS và 1% albumin huyết thanh bò trong 1 giờ. Sau đó rửa đĩa và thêm 100 μ l mỗi mẫu hoặc chất chuẩn đồng nhất. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 2 h. Rửa đĩa, bổ sung 100 μ L kháng thể phát hiện TNF- α hoặc IL-1 β (0,25 μ g/mL), kháng thể được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2h. Thêm 100 μ L avidin kết hợp với peroxydase cải ngựa (1:2000) và ủ trong 30 phút. Phát hiện màu bằng 2,2'-acino-bis [3-ethylbenzothiazon 6 –sulfonic acid], để ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự thay đổi màu. Màu sắc được theo dõi bằng đầu lọc vi tấm ở bước sóng 405nm. Đường chuẩn Elisa được thành lập bằng cách sử dụng TNF- α và IL-1 β của chuột được pha trong dung dịch đệm PBS.

Thông số đánh giá

Các giá trị TNF- α , và IL-1 β đơn vị ng cytokin/mg protein được đo bằng bộ kit ELISA (Thermo Fisher Scientific, USA).

Mẫu nghiên cứu được coi là có tác dụng chống viêm nếu hàm lượng TNF- α , và IL-1 β thấp hơn so với lô chứng bệnh lý đạt mức ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Xác định hoạt độ ức chế peroxy hóa lipid

Mẫu nghiên cứu là mô thận chuột được chuẩn bị theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu của Gandhi đã trình bày trong phần trên.

Nguyên tắc

Trong bệnh đái tháo đường, stress oxy hóa là một trong những nguyên nhân dẫn đến các biến chứng trong đó có biến chứng thận. Malonyldialdehyd (MDA) - sản phẩm của quá trình peroxy hóa màng tế bào, là một trong những marker của quá trình stress oxy hóa. Định lượng MDA có thể xác định được mức độ tổn thương màng tế bào do stress oxy hóa gây ra [106]. Phương pháp được tiến hành bằng phản ứng của malonyldialdehyd với 2 phân tử 1-methyl-2-phenylindol ở 45°C.

Tiến hành

Lấy 0,64 mL 1-methyl-2-phenylindol 10,3 mmol/L, 0,2 mL mẫu thử và 10 μ L butylated hydroxytoluen 2 μ g/mL. Sau đó đem hỗn hợp phản ứng lắc đều, thêm tiếp 0,15 mL HCl 37%. Ủ hỗn hợp ở 45°C trong vòng 45 phút và ly tâm ở 10000 vòng/phút trong vòng 10 phút. Lấy phần dịch nổi đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 586 nm. Sử dụng 1,1,3,3- tetramethoxypropan để xây dựng đường chuẩn.

Thông số đánh giá

Lượng peroxy hóa lipid được thể hiện bằng số μ mol MDA tương đương/mg protein.

Mẫu nghiên cứu được coi là có tác dụng ức chế quá trình peroxy hóa lipid nếu hàm lượng MDA thấp hơn so với lô chứng bệnh lý có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Đo hoạt độ enzym chống oxy hóa

Nguyên tắc

Sự peroxy hóa lipid là một yếu tố chính gây ra sự phát triển của stress oxy hóa dẫn đến bệnh đái tháo đường típ 2 rõ rệt và các biến chứng mạch máu vĩ mô và vi mô liên quan [107]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tình trạng chống oxy hóa bị giảm đi đáng kể trong bệnh ĐTĐ típ 2 do sự suy giảm của các hệ thống enzym chống oxy hóa (glutathion peroxidase, catalase, and superoxid dismutase) hoặc các chất chống oxy hóa không phải enzym như vitamin E, C [108]. Do đó đây là những dấu ấn sinh học quan trọng trong đo lường stress oxy hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đo hoạt độ của enzym chống oxy hóa trong thể đồng nhất của các mô thận, bao gồm glutathion peroxidase (GPx), superoxid effutase (SOD) và catalase (CAT). Các hoạt độ của các enzym này được chuẩn hóa bằng cách sử dụng nồng độ protein toàn phần.

Tiến hành

Xác định hoạt độ CAT

Hoạt độ enzym CAT được đo ba lần theo phương pháp Aebi bằng cách theo dõi sự biến mất của H_2O_2 ở bước sóng 240 nm [109]. Thêm 30 μ L dịch thể đồng nhất thận vào 2,5 mL dung dịch đệm phosphat 50 mmol/L (pH 7,0). Thử nghiệm bắt đầu bằng cách thêm 0,5 mL dung dịch H_2O_2 0,1 mol/L và đo độ hấp thu ở 240 nm cứ sau 10 giây trong vòng 2 phút và được sử dụng để tính hoạt độ CAT. Trong mẫu chứng âm, dung dịch H_2O_2 được thay thế bằng dung dịch đệm phosphat. Hoạt độ enzym CAT được xác định bằng cách sử dụng hệ số molar extinction cho H_2O_2 là $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ và được biểu thị bằng nmol H_2O_2 đã bị chuyển đổi mỗi phút trên tổng số protein, trong đó hoạt độ 1 IU là 1 μ mol H_2O_2 biến đổi thành H_2O mỗi phút.

Xác định hoạt độ SOD

Tổng hoạt độ SOD trong thể đồng nhất mô thận được xác định theo phương pháp của Marklund với một số thay đổi [110]. Phương pháp này dựa trên khả năng của SOD để ức chế quá trình tự oxy hóa của pyrogallol. Trộn 970 μ L dung dịch đệm (100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8,2), 10 μ L dịch thể đồng nhất và 20 μ L pyrogallol 13 mmol/L được trộn lẫn. Xét nghiệm

được thực hiện trong cuvet nhiệt ở 25°C và đo độ hấp thu được ghi lại trên máy đo quang phổ (EVO 210, Thermo-Fisher) ở 420 nm. Một đơn vị hoạt độ SOD được định nghĩa là lượng enzym có thể ức chế quá trình oxy hóa tự động 50% pyrogallol trong phản ứng.

Xác định hoạt độ GPx

Hoạt độ GPx được đo bằng xét nghiệm enzym đôi [111]. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL chứa 770 μ L dung dịch đệm natri photphat (pH 7,0) 50 mmol/L, 100 μ L dung dịch GSH 10 mmol/L, 100 μ L dung dịch nicotinamid adenin dinucleotid phosphat (NADPH) 2 mmol/L, 10 μ L dung dịch natri azid 1,125 mol/L, 10 μ L dung dịch glutathion reductase 100 IU/mL và 10 μ L mẫu thử. Hỗn hợp được để ổn định trong 10 phút. Phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm 50 μ L dung dịch H₂O₂ 5 mmol/L vào hỗn hợp và quá trình oxy hóa NADPH được đo trong 5 phút ở 340 nm. Một đơn vị glutathion peroxidase được định nghĩa là lượng enzym có thể tạo ra 1 μ mol NADP⁺ từ NADPH mỗi phút. Hoạt độ GPx được xác định bằng cách sử dụng hệ số molar extinction của NADPH là 6220 M⁻¹ cm⁻¹ ở bước sóng 340nm và được biểu diễn là IU/mg protein toàn phần.

Định lượng protein

Lượng protein toàn phần được đo theo phương pháp Bradford [112] sử dụng bovine serum albumin (BSA) làm chất chuẩn. 20 μ L dung dịch protein được thêm vào 1 mL dung dịch Bradford và được ủ trong bóng tối 10 phút. Đo mật độ quang tại bước sóng 595 nm.

Phân tích mô bệnh học thận

Nguyên tắc

Để đánh giá mức độ cải thiện tổn thương trên mô thận trên chuột bị ĐTĐ típ 2 gây ra bởi STZ, mô thận chuột được chuẩn bị theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu của Gandhi [113].

Tiến hành

Sau khi động vật bị giết, chọn ngẫu nhiên chuột trong mỗi nhóm để làm mô bệnh học. Thận ngay lập tức được bảo quản trong 4% đệm trung tính

formalin và nhúng vào parafin nóng chảy, sau đó để nguội, khiến cho parafin đông lại xung quanh mẫu thận để tạo ra các khối mô. Sau đó, các phần mô có độ dày 5 μm được cắt bằng dao microtom (Leica RM2125). Những phần này được nhuộm bằng hematoxylin-eosin (H & E) để quan sát mô bệnh học. Các phần nhuộm màu được gắn DPx (dibutyl phthalat trong xylene) để phân tích và chụp ảnh dưới kính hiển vi ánh sáng có độ phân giải cao.

Thông số đánh giá

Đánh giá cấu trúc hình thái vi thể thận được thực hiện tại Trung tâm giải phẫu bệnh, bệnh viện đa khoa Trí Đức, Hà Nội.

2.3.3. Nghiên cứu tác dụng ức chế enzym α -glucosidase và PTP-1B của hợp chất chính phân lập được từ cây Xấu hổ (*Mimosa pudica* L.) trên mô hình *in silico*

Mô hình docking

- *Chuẩn bị protein*: cấu trúc đồng tinh thể của phức hợp α -D-glucopyranose và *saccharomyces cerevisiae* isomaltase được chứng minh là có độ tương đồng cao nhất với α -glucosidase và phù hợp với mô hình lắp ghép được tải xuống từ ngân hàng Dữ liệu Protein Data Bank ([http:// www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/)) với ID: 3A4A và lưu dưới định dạng PDB [114]. Kích thước hộp tìm kiếm được lựa chọn là $28\text{\AA} \times 28\text{\AA} \times 28\text{\AA}$, khoảng cách giữa các ô lưới là $1\text{\AA}$ với tọa độ trục (x; y; z) = (21,284; -0,761; 18,638) [115]. Tương tự, cấu trúc enzym PTP-1B (ID: 2QBS) chứa phối tử đồng tinh thể 4-bromo-3-(carboxymethoxy)-5-[3-(cyclohexylamin)phenyl] acid thiophen-2-carboxylic. Kích thước hộp lưới được xác định là $60\text{\AA} \times 60\text{\AA} \times 46\text{\AA}$ với tọa độ tâm (x; y; z) = (46,535; 16,643; 5,369). Tất cả các phân tử nước và tinh thể được loại bỏ khỏi protein bằng phần mềm Discovery Studio Visualizer 4.0. Sau đó, các nguyên tử hydro sẽ được thêm vào protein và tối ưu hóa, gắn trường lực Kollman. Cuối cùng lưu dưới định dạng pdbqt (bằng phần mềm Autodock Tools 1.5.7).

- *Chuẩn bị phối tử*: Cấu trúc 3D của 2 hợp chất acid protocatechuic và acid syringic đã được tải xuống từ cơ sở dữ liệu PubChem

(www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) ở định dạng SDF và được chuyển đổi sang định dạng PDB bằng phần mềm Chimera. Sau đó, các phối tử được tối ưu hóa bằng phần mềm Avogadro và được chuyển đổi sang định dạng pdbqt bằng phần mềm Autodock Tools.

Đánh giá mô hình docking

Để đánh giá kết quả quá trình docking, phối tử đồng tinh thể sau khi được tách ra khỏi protein sẽ được redock lại vào vị trí hoạt động của protein mục tiêu. Kết quả quá trình docking được gọi là đáng tin cậy nếu giá trị độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) nhỏ hơn 1,5 Å [116]. Phối tử đồng kết tinh sau khi re-dock sẽ được dùng để so sánh với các phân tử hợp chất, so sánh sự tương đồng về cấu dạng và khả năng tương tác với các acid amin trong hốc phản ứng và năng lượng tương tác tính bởi hàm tính điểm (scoring function) của Autodock vina. Tương tác phân tử giữa các hợp chất có năng lượng liên kết tốt với protein mục tiêu được thể hiện bằng phần mềm Discovery Studio Visualizer 2020.

Đánh giá quy tắc Lipinski 5

Năm 1997, Christopher Lipinski và cộng sự đã đưa ra bộ quy tắc 5 tiêu chí (Rules of 5- RO5) về dự đoán tính giống thuốc của các hợp chất, theo đó thuốc dùng đường uống thường có đặc tính hóa lý và cấu trúc trong một phạm vi giá trị nhất định. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được tải từ cơ sở dữ liệu Pubchem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Một dược chất đường uống thỏa mãn ít nhất 2 trong 5 tiêu chí sau:

- Trọng lượng phân tử: $MW < 500$ Dalton.
- Số lượng nhóm cho liên kết hydro (HBD) (Số lượng các nhóm $-NH$ và $-OH$): $HBD < 5$ (Không có nhiều hơn 5 nhóm cho liên kết hydrogen).
- Số lượng nhóm nhận liên kết hydro (HBA) (Bao gồm nguyên tử O và N): $HBA < 10$ (Không có nhiều hơn 10 nhóm nhận liên kết hydrogen).
- Hệ số phân bố octanol/nước: $LogP < 5$ (có tính ưa dầu cao).
- Độ khúc xạ mol phải nằm trong khoảng 40-130 [117].

Các thông số hóa lý này liên quan đến khả năng hòa tan trong nước, tính thấm ở ruột và bao gồm các bước đầu tiên trong sinh khả dụng đường uống của 1 thuốc. Nếu một hợp chất không đáp ứng quy tắc RO5 sẽ có nguy cơ gặp phải các vấn đề khi sử dụng đường uống. Tuy nhiên, một chất đáp ứng RO5 cũng không thể đảm bảo sẽ trở thành thuốc, vì RO5 không đề cập đến các đặc điểm cấu trúc hóa học cụ thể được tìm thấy trong thuốc và hợp chất không phải thuốc [70].

Dự đoán các thông số dược động học và độc tính (ADMET)

Trong rất nhiều công cụ dự đoán ADMET, ngoài một số phần mềm như CASE ULTRA, DEREK, META-PC, METEOR, PASS, GUSAR..., còn có các công cụ trực tuyến như ADMETlab, admetSAR, pkCSM, SwissADMET... được sử dụng khá phổ biến [118]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng công cụ đánh giá online pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction>) với dữ liệu đầu vào là công thức SMILE của các hợp chất lấy từ cơ sở dữ liệu PubChem.

Mô phỏng động lực học phân tử

Động lực học phân tử giúp đánh giá chuyển động vật lý và tương tác của tất cả các nguyên tử trong phức hợp protein-phối tử với chính nó và môi trường xung quanh nó. Chúng tôi sử dụng phần mềm MOE 2015.10 để thực hiện mô phỏng động lực học phân tử (MD) của phức hợp phối tử-protein với tư thế năng lượng liên kết thấp nhất. Mô phỏng động lực MOE sử dụng phương trình chuyển động Nosé-Poincaré-Andersen (NPA). Các bước và giao thức mặc định của MD đã được chọn để tối ưu hóa trạng thái cân bằng hệ thống 600ps và quá trình thí nghiệm được thực hiện trong 500ps ở nhiệt độ 310K. RMSD được tính như sau:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N di^2}$$

trong đó di là khoảng cách giữa nguyên tử i ở hai thời điểm khác nhau và N là tổng số nguyên tử của phức hợp protein-phối tử [119].

2.3.4. Nghiên cứu tác dụng ức chế enzym α -glucosidase và PTP-1B của hợp chất chính phân lập được từ cây Xấu hổ (*Mimosa pudica* L.) in vitro

2.3.4.1. Phương pháp nghiên cứu khả năng ức chế enzym α -glucosidase in vitro

Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của hoạt chất nghiên cứu được thực hiện theo phương pháp của Moradi-Afrapoli F và cộng sự [120]. Cụ thể như sau:

- Chất thử được hòa tan trong DMSO và pha loãng trong dung dịch đệm phosphat 10 mM (pH 6.8) để có nồng độ 256 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; và 50 μL được đưa vào các giếng của khay 96 giếng.
- Thêm vào mỗi giếng 20 μL α - glucosidase (0,5U/mL) và 130 μL dung dịch đệm phosphat 10 mM (pH 6.8), trộn đều và ủ ở 37°C trong 15 phút.
- Cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (pNPG) được đưa tiếp vào từng giếng thí nghiệm rồi ủ tiếp ở 37°C trong 60 phút.
- Đĩa thí nghiệm chỉ có mẫu thử, dung dịch đệm phosphat và pNPG được sử dụng làm mẫu đối chứng trắng (blank). Giếng thí nghiệm chỉ có DMSO 10%, dung dịch đệm phosphat, enzym và pNPG cũng được sử dụng làm mẫu đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo sự chính xác.
- Dừng thí nghiệm bằng cách thêm vào 80 μL Na_2CO_3 0,2M và đo mật độ quang ở bước sóng 405 nm bằng máy đo ELISA Plate Reader (Bio-Rad).
- Khả năng ức chế enzym α - glucosidase của mẫu thử được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - (A_{\text{mẫu thử}} / A_{\text{đối chứng}} * 100)$$

Trong đó: $A_{\text{đối chứng}} = \text{OD}_{\text{đối chứng}} - \text{OD}_{\text{blank}}$

$$A_{\text{mẫu thử}} = \text{OD}_{\text{mẫu thử}} - \text{OD}_{\text{blank mauthu}}$$

- Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50%) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve2Dv4.

2.3.4.2. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế enzym Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP-1B) in vitro

Đánh giá tác dụng ức chế enzym PTP-1B được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Hung và cs, có thay đổi cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [121]. Cơ chất là p-nitrophenyl phosphat (pNPP) được sử dụng trong thí nghiệm. Dung dịch đệm gồm có 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA (ethylen diamin tetraacetic acid), và 50 mM citrat (pH 6.0). Thí nghiệm được tiến hành bằng cách thêm 10 µL dung dịch mẫu thử vào 20 µL dung dịch enzym PTP-1B (1 µg/ml), và trộn đều với 40 µL pNPP 4 mM trong 130 µL dung dịch đệm trong đĩa 96 giếng. Ủ ở 37°C trong vòng 30 phút, sau đó thêm 10 µL NaOH 1M để dừng phản ứng. Đo lượng p-nitrophenol sinh ra bằng cách đo độ hấp thu quang tại bước sóng 405 nm. Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Acid ursolic được sử dụng làm chứng dương. Phần trăm ức chế hoạt độ enzym PTP-1B (% I) được tính theo công thức:

$$\% I = \frac{A_c - A_t}{A_c - A_o} \times 100$$

Trong đó: I% : phần trăm hoạt tính PTP-1B bị ức chế

A_c : độ hấp thu của mẫu chứng (không chứa 10 µL dung dịch thử)

A_t : độ hấp thu của mẫu thử

A_o : độ hấp thu của mẫu trắng

Giá trị ức chế enzym PTP-1B IC_{50} của các mẫu thử được tính dựa vào đồ thị liều dùng với % ức chế.

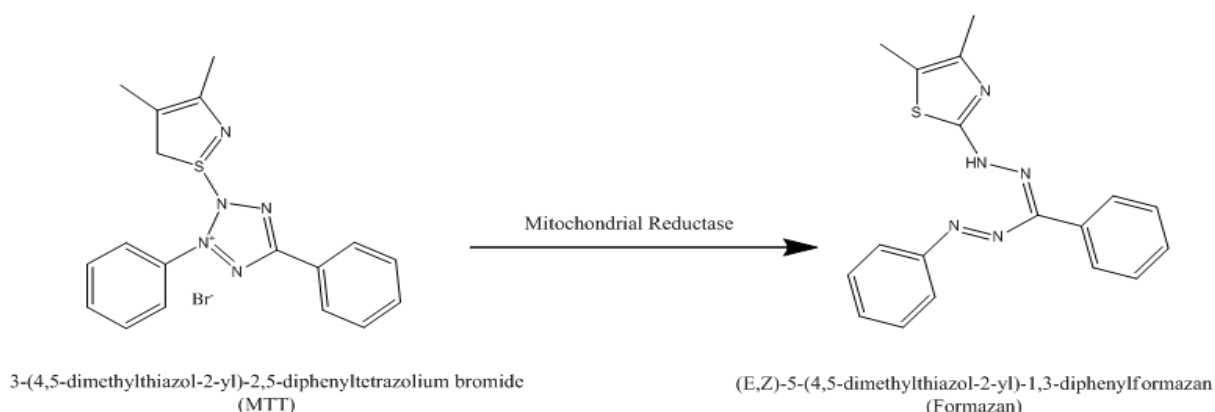
2.3.5. Tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với độc tính glucose trên dòng tế bào HUVECs

Thử nghiệm HUVECs-glucotoxicity do MGO (phép thử độc tính glucose của HUVECs thông qua MGO) là một phương pháp được sử dụng để đánh giá tác động độc hại của methylglyoxal (MGO) lên tế bào HUVECs trong điều kiện glucose tăng cao. Trong phép thử này, tế bào HUVECs được đặt trong môi

trường có nồng độ glucose tăng cao và sau đó tiếp xúc với MGO. MGO là một hợp chất có khả năng gây độc và có thể tác động tiêu cực lên tế bào, đặc biệt là tác động đến việc hoạt động của tế bào và sự sống còn của chúng. Bằng cách thực hiện phép thử này, có thể đo lường sự ảnh hưởng của MGO lên khả năng sống và chức năng của tế bào HUVECs, từ đó đánh giá tác động của nồng độ glucose tăng cao và quá trình hình thành sản phẩm cuối của quá trình glycation (AGEs) đối với các tế bào này.

Nguyên lý

Phương pháp MTT được dựa trên nguyên tắc là MTT [3- (4,5-dimethylthiazol - 2-yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromid] tham gia phản ứng oxy hoá khử với ty thể của tế bào và tạo thành các formazan dạng tinh thể (Hình 2.4). Sau đó dùng một số dung dịch khác nhau để phá huỷ màng tế bào đồng thời hoà tan các tinh thể formazan và đo độ hấp thu quang học của các dung dịch này [122].



Hình 2.4. Nguyên lý của phương pháp MTT

Thí nghiệm đánh giá khả năng sống sót của tế bào với độc tính do MGO (methylglyoxal) sau khi xử lý với phân đoạn EtOAc và hai hợp chất được thực hiện tại Khoa Dược, Đại học Gachon, Hàn Quốc.

Cách tiến hành

Thí nghiệm được thực hiện dựa trên những thông số về nồng độ của AG (aminoguanidin) và MGO (mô tả trong công bố của Sin Hee Park và cộng sự một số thay đổi nhỏ [123], cụ thể như sau:

+ Các dòng tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng có mật độ $1,0 \times 10^4$ tế bào/ giếng, với môi trường nuôi cấy là EGM-2, 4% FBS (môi trường tăng trưởng tế bào nội mô, chứa 4% huyết thanh bào thai bò), ủ ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 .

+ Sau 24 giờ nuôi cấy, các tế bào sẽ được xử lý trước với AG (1mM) và mẫu thử ở các nồng độ 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ trong 1 giờ.

+ Các tế bào tiếp tục được xử lý với MGO (400 μM) trong 24 giờ.

+ Dung dịch MTT được bổ sung vào các giếng với nồng độ 0,1mg/mL và tiếp tục ủ trong 2 giờ.

+ Loại bỏ môi trường và DMSO được thêm vào các giếng với nồng độ 100 μL /giếng và đo độ hấp thu quang ở bước sóng 570nm trên thiết bị Microplate Reader.

Cách đánh giá kết quả

Tác dụng bảo vệ tế bào được đánh giá thông qua phần trăm của tế bào sống sót được xác định bằng cách so độ hấp thu ở giếng thử nghiệm với độ hấp thu của giếng đối chứng. Mỗi thử nghiệm có độ lặp lại 3 lần.

$$\% \text{ tế bào sống sót} = (A_t/A_c) \times 100$$

Trong đó A_t : Độ hấp thu của mẫu thử

A_c : Độ hấp thu của mẫu trắng (chỉ có tế bào trong môi trường nuôi cấy)

Tác dụng bảo vệ tế bào của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất được so sánh với chất chuẩn dương AG (1 mM).

2.3.6. Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs do MGO gây ra

Thử nghiệm hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) do MGO gây ra (MGO-induced AGEs formation assay) là một phương pháp được sử dụng để đo lường quá trình hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) do tác động của methylglyoxal (MGO). MGO, một hợp chất có khả

năng gây độc, được sử dụng để tác động lên các protein, như Bovine Serum Albumin (BSA), trong điều kiện được tạo ra để tương tác không enzym hóa giữa đường và protein. Quá trình này dẫn đến hình thành AGEs, các sản phẩm cuối của quá trình glycation. Thử nghiệm hình thành AGEs do MGO gây ra sử dụng để đo lường mức độ hình thành AGEs dưới tác động của MGO, và thông qua việc xem xét sự thay đổi trong các đặc điểm của protein, chẳng hạn như cấu trúc, hoạt tính, và tính chất sinh hóa. Kết quả của phép thử này có thể cung cấp thông tin về khả năng của mẫu thử trong việc ức chế hoặc giảm thiểu sự hình thành AGEs gây hại.

Thí nghiệm đánh giá tác dụng ức chế sự hình thành AGEs của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất được thực hiện như sau:

Cách tiến hành

Hoạt tính ức chế sự hình thành AGEs được đánh giá theo phương pháp của Sin Hee Park và cộng sự [123] bao gồm các bước:

- + MGO (2 mM) được thêm vào các ống chứa BSA (5 mg/mL) trong dung dịch đệm PBS, pH 7.4 chứa 0.02% sodium azid.

- + Thêm vào mỗi ống mẫu thử với các nồng độ là 25 và 50 µg/mL và ủ trong 7 ngày ở 37°C và tránh ánh sáng.

- + Sự hình thành AGEs được xác định bằng phân tích huỳnh quang ở bước sóng kích thích/phát ra là 370 nm/440 nm trên máy Multilabel Plate Reader.

Cách đánh giá kết quả

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả biểu thị thông qua phần trăm ức chế được tính bằng công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

Trong đó: A_t : Kết quả đo của mẫu thử

A_c : Kết quả đo của mẫu đối chứng âm (chỉ chứa MGO)

Khả năng ức chế của mẫu thử được đối chứng với aminoguanidin (AG) ở nồng độ 1 mM.

2.3.7. Phương pháp đánh giá tác dụng của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất đối với thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs)

Thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs) là một phương pháp được sử dụng để đánh giá khả năng của mẫu thử trong việc phá vỡ liên kết giữa Advanced Glycation End Products (AGEs) được hình thành từ methylglyoxal (MGO) và các phân tử protein. AGEs là các sản phẩm cuối của quá trình glycation không enzym hóa, trong đó các phân tử đường và protein tương tác trong điều kiện đường huyết cao. MGO, một hợp chất gây độc, thường là một tác nhân chính góp phần vào quá trình hình thành AGEs. Việc ngăn chặn hoặc phá vỡ liên kết giữa MGO và protein có thể có tác dụng giảm thiểu sự hình thành AGEs và ngăn chặn tác động xấu của chúng đối với cơ thể. Phép thử MGO-AGEs breaker là một cách để đánh giá khả năng của các mẫu thử trong việc giảm thiểu hoặc loại bỏ các liên kết MGO-AGEs đã hình thành. Điều này có thể thể hiện khả năng ức chế hoặc đảo ngược tình trạng tương tác không mong muốn giữa MGO và protein, từ đó có thể giúp bảo vệ các cơ quan và mô từ tác động tiêu cực của AGEs.

Tác dụng phá vỡ sự liên kết MGO-AGEs của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp trinitrobenzen sulfonat acid (TNBSA) theo quy trình được sửa đổi một chút so với phương pháp của Sin Hee Park và cộng sự [123]. Dung dịch MGO-BSA (1 mg/mL) được trộn với mẫu thử (25 và 50 µg/ml), AG (1.0 mM), sau đó ủ trong vòng 24 h, tại 37 °C. Sau khi ủ xong, thêm 4% NaHCO₃ (pH 8.5) và 0.1% TNBSA và ủ tiếp 2 h tại 37 °C. Sau đó, thêm 10% sodium dodecyl sulfat (SDS) và 1 N HCl. Tiếp theo, khả năng phá vỡ liên kết MGO-AGE của mẫu thử được đo trên máy đọc đĩa tại bước sóng 340 nm (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Tác dụng của mẫu thử được so sánh với chất chuẩn dương AG (1mM).

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý và thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0

Đối với các số liệu thuộc phân phối chuẩn, kết quả được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$ (X: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn). Dùng T-test để so sánh kết quả giữa các lô thử và lô chứng.

Phân tích kết quả bằng phần mềm SPSS 20.0, sự khác biệt giữa các lô được cho là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đánh giá tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm.

3.1.1. Kết quả đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao toàn phần (MP) và các cao phân đoạn theo phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) trên chuột bình thường

3.1.1.1. Nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống với của cao toàn phần (MP) và các cao phân đoạn lá cây Xấu hổ

Kết quả nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống với cao toàn phần và phân đoạn của lá cây Xấu hổ được thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả thử nghiệm dung nạp glucose đường uống với cao toàn phần và các phân đoạn cao chiết lá cây Xấu hổ

Lô chuột	Nồng độ glucose máu (mmol/L)		
	0 phút	60 phút	120 phút
Chứng trắng	7,78 ± 0,95	8,98 ± 0,95	9,04 ± 0,56
Gliclazid 5mg/kg	7,77 ± 0,59	10,36 ± 0,93	7,76 ± 0,45 **
Cao Ethanol 100mg/kg	7,54 ± 2,12	11,46 ± 1,64	7,50 ± 1,16 **
Cao n-hexan 100mg/kg	7,50 ± 2,87	11,76 ± 1,23	8,70 ± 1,73
Cao EtOAc 100mg/kg	7,43 ± 0,97	11,21 ± 1,71	6,90 ± 0,97 **
Cao BuOH 100mg/kg	7,96 ± 3,11	11,54 ± 1,42	7,70 ± 1,64

*Ghi chú: nồng độ glucose máu được biểu thị dưới dạng TB±SD, n=10,

*: p<0,05, **: p<0,001 khi so với nhóm chứng trắng tại cùng thời điểm.

Nhận xét: Từ bảng 3.1, ở thời điểm 120 phút, gliclazid, cao toàn phần ethanol và cao EtOAc của lá cây Xấu hổ với liều 100mg/kg làm giảm đáng kể nồng độ glucose máu khi so sánh với nhóm chứng trắng, tương ứng 14,51%, 17,04% và 23,67% (p<0,001). Các phân đoạn n-hexan và BuOH không làm thay đổi nồng độ glucose máu đáng kể sau 120 phút so với nhóm chứng trắng. Kết quả cho thấy phân đoạn EtOAc có tiềm năng hạ glucose máu tốt hơn so với các phân đoạn khác, nên được lựa chọn để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

3.1.1.2. Nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống với phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ:

Ở thử nghiệm này, chuột được chia thành các lô (n=8), và tiến hành thử nghiệm OGTT với phân đoạn EtOAc liều lần lượt là 50 mg/kg, 100 mg/kg.

Bảng 3.2. Kết quả thử nghiệm dung nạp glucose đường uống đối với phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ

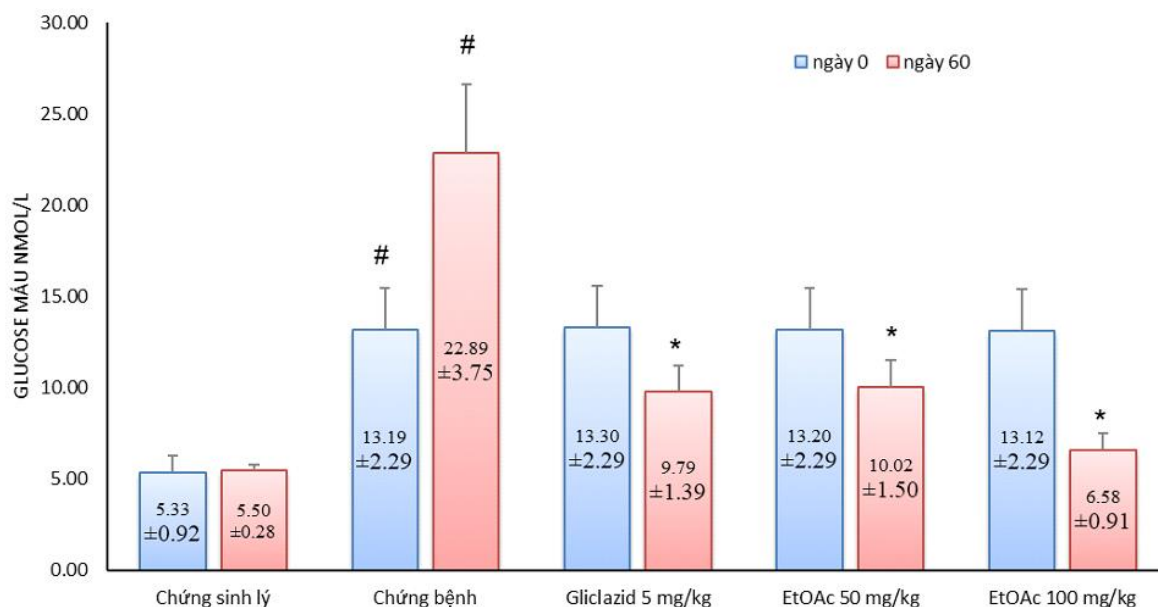
Lô chuột	Nồng độ glucose máu (mmol/L)		
	0 phút	60 phút	120 phút
Chứng trắng	7,84 ± 0,88	10,88 ± 0,88	9,17 ± 0,57
Gliclazid 5mg/kg	7,74 ± 0,49	10,45 ± 1,01	8,40 ± 0,68*
Cao EtOAc 50 mg/kg	8,72 ± 3,01	10,67 ± 1,66	7,30 ± 1,34**
Cao EtOAc 100mg/kg	7,43 ± 0,97	11,20 ± 1,71	6,90 ± 0,97**

*Ghi chú: nồng độ glucose máu được biểu thị dưới dạng TB±SD, n=8, *: p<0,05; **: p<0,001 khi so sánh với nhóm chứng trắng ở cùng thời điểm.

Nhận xét: Từ bảng 3.2 cho thấy, tại thời điểm 120 phút sau khi tiến hành thí nghiệm OGTT, phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ với hai liều 50 mg/kg và 100 mg/kg đều làm giảm đáng kể nồng độ glucose máu chuột khi so sánh với nhóm chứng trắng, tương ứng 20,39% và 24,75% (p<0,001). Do đó hai mức liều 50 mg/kg và 100 mg/kg sẽ được lựa chọn để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Kết quả đánh giá tác dụng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do chế độ ăn giàu chất béo và streptozotocin.

3.1.2.1. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ glucose máu



Hình 3.1. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ glucose máu ở chuột

*Ghi chú: nồng độ glucose máu được biểu thị dưới dạng TB±SD, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm chứng sinh lý ($p < 0.05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhóm chứng bệnh ($p < 0.05$).

Nhận xét: Tại thời điểm ban đầu, chuột được gây ĐTĐ típ 2 do STZ có nồng độ glucose máu cao hơn đáng kể so với nhóm chứng sinh lý, với tỉ lệ 147,5% ($p < 0.05$).

Sau 60 ngày, nồng độ glucose máu lúc đói của chuột ở nhóm bệnh lý cao hơn đáng kể so với nhóm chứng sinh lý, với tỉ lệ 316,2% ($p < 0.05$). Chuột được điều trị với gliclazid giảm đáng kể nồng độ glucose máu so với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ giảm 57,2% ($p < 0.05$).

Nồng độ glucose máu của nhóm chuột được điều trị với phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày thấp hơn

đáng kể với tỉ lệ lần lượt là 56,3% và 71,3% ($p < 0,05$) so với nhóm chứng bệnh lý.

3.1.2.2. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ lipid máu

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ lipid máu ngày thứ 60

Lô chuột	Cholesterol TP (mmol/ L)	TG (mmol/ L)	HDL – C (mmol/ L)	LDL –C (mmol/ L)
Chứng sinh lý	3,90 ± 0,26	1,21 ± 0,30	3,05 ± 0,34	1,10 ± 0,23
Chứng bệnh	4,65 ± 0,72#	1,55 ± 0,29#	2,20 ± 0,35#	1,38 ± 0,87#
Gliclazid 5mg/kg	4,42 ± 1,01*	1,36 ± 0,56*	2,70 ± 0,59*	0,96 ± 0,21*
Cao EtOAc 50mg/kg	4,63 ± 0,56	1,53 ± 0,39	2,43 ± 0,53*	1,33 ± 0,19
Cao EtOAc 100mg/kg	4,36 ± 1,51*	1,40 ± 0,84*	2,67 ± 0,29*	0,89 ± 0,15*

*Ghi chú: Các nồng độ được biểu thị dưới dạng TB±SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p < 0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p < 0,05$).

Nhận xét: Kết quả từ bảng 3.3 cho thấy chuột được gây ĐTĐ típ 2 bằng STZ (chứng bệnh) có nồng độ cholesterol máu toàn phần, triglycerid máu, LDL –C cao hơn và nồng độ HDL – C thấp hơn so với nhóm chuột sinh lý ($p < 0,05$).

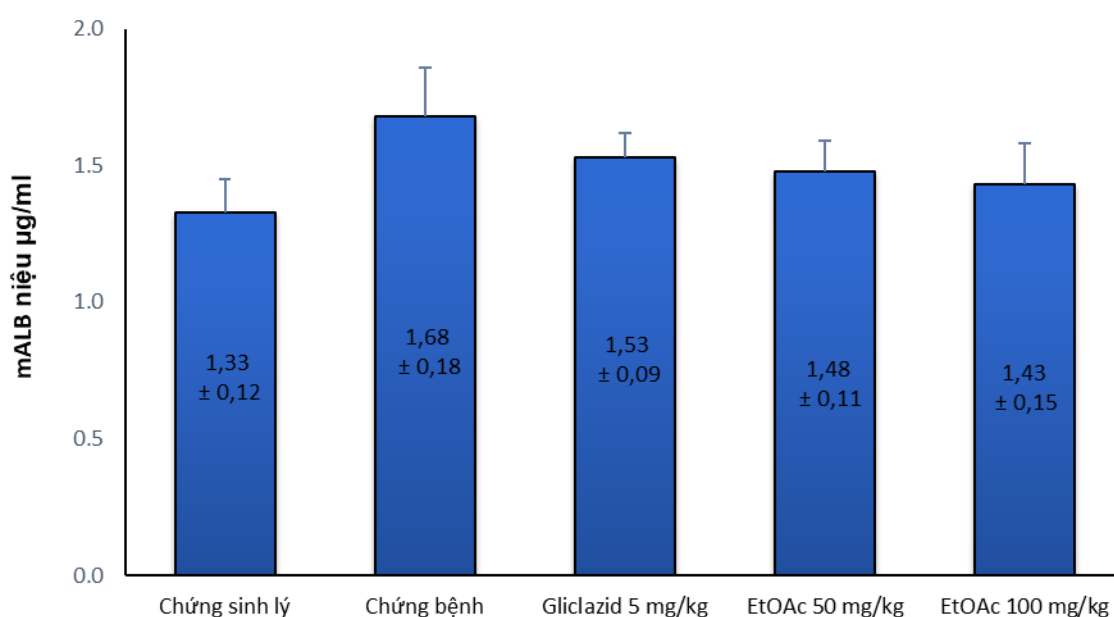
Chuột được điều trị với gliclazid cải thiện đáng kể các chỉ số lipid máu với khả năng làm giảm 4,9% cholesterol toàn phần, 12,3% triglycerid, 30,4% LDL –C và tăng 22,7% HDL –C khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,05$).

Phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50mg/kg làm tăng đáng kể nồng độ HDL-C khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ tăng là 10,5% ($p < 0,05$). Các chỉ số cholesterol toàn phần, triglycerid máu và LDL-C cũng giảm lần lượt 0,43%, 1,3% và 3,6% khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, tuy nhiên, những khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với mức liều 100mg/kg giảm cholesterol toàn phần giảm 6,2%, triglycerid máu 9,7% và LDL-C 35,5% và tăng HDL-C 21,4% khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,05$).

Như vậy, kết quả chỉ ra phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ với liều 100mg/kg/ ngày có tác dụng làm giảm nồng độ cholesterol máu toàn phần, triglycerid máu, LDL –C và tăng nồng độ HDL –C trên chuột nhất trắng được gây ĐTĐ típ 2 do STZ. Đối với liều 50 mg/kg, phân đoạn EtOAc có khả năng cải thiện chỉ số HDL –C trên chuột.

3.1.2.3. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên microalbumin niệu ngày thứ 60



Hình 3.2 Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên microalbumin niệu ngày thứ 60

Nhận xét: Nhóm chuột được gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) cho thấy microalbumin trong nước tiểu cao hơn so với nhóm chứng sinh lý với tỉ lệ tăng là 26,3%. Như vậy, gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ làm tăng nồng độ microalbumin trong nước tiểu của chuột thực nghiệm.

Gliclazid với mức liều 5 mg/kg và phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có xu hướng giảm microalbumin niệu ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm bệnh lý, tỉ lệ giảm là 8,9%; 11,9% và 14,9%.

Như vậy kết quả chỉ ra phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có xu hướng làm giảm nồng độ albumin niệu trên chuột nhất trắng bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

3.1.2.4. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ creatinin máu, creatinin niệu và hệ số thanh thải creatinin ngày thứ 60

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ creatinin máu, creatinin niệu và hệ số thanh thải creatinin ngày thứ 60

Lô chuột	Creatinin máu ($\mu\text{mol/ L}$)	Creatinin niệu ($\mu\text{mol/ L}$)	Hệ số thanh thải creatinin (ml/phút)
Chứng sinh lý	30,71 $\pm$ 2,55	827,50 $\pm$ 34,80	87,25 $\pm$ 5,70
Chứng bệnh	38,83 $\pm$ 4,54 #	486,40 $\pm$ 41,70 #	31,14 $\pm$ 4,60 #
Gliclazid 5mg/kg	33,61 $\pm$ 3,29 *	786,80 $\pm$ 54,60 *	57,38 $\pm$ 5,20 *
Cao EtOAc 50mg/kg	31,00 $\pm$ 1,42 *	537,80 $\pm$ 46,20 *	46,90 $\pm$ 4,20 *
Cao EtOAc 100mg/kg	31,69 $\pm$ 2,76 *	601,70 $\pm$ 38,80 *	53,60 $\pm$ 3,80 *

*Ghi chú: Kết quả được trình bày dưới dạng TB $\pm$ SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý (p<0,05), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh (p<0,05).

Nhận xét:

***Về kết quả Creatinin máu**

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ creatinin máu cao hơn nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 26,4% (

với $p<0,05$). Như vậy gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ cho chuột làm tăng nồng độ creatinin trong máu so với nhóm chuột sinh lý.

Gliclazid làm giảm đáng kể nồng độ creatinin máu ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm bệnh lý, tỉ lệ thấp hơn là 13,4% ($p<0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100mg/kg/ngày, nồng độ creatinin máu của chuột đã giảm đáng kể so với nhóm chuột bệnh lý, với tỉ lệ giảm lần lượt là 20,2% và 18,4% ($p<0,05$).

Như vậy, kết quả chỉ ra phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ ngày và 100 mg/kg/ ngày có tác dụng làm giảm nồng độ creatinin máu trên chuột nhất trắng được gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

****Về kết quả creatin niệu***

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ creatin niệu thấp hơn nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 41,2%, (với $p<0,05$).

Gliclazid làm tăng đáng kể nồng độ creatinin niệu ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm bệnh lý, với tỉ lệ là 61,8% ($p<0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ creatinin niệu của chuột đã tăng đáng kể so với nhóm chuột bệnh lý, với tỉ lệ tăng lần lượt là 10,6% và 23,7%.

Như vậy phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng tăng nồng độ creatinin niệu ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

****Về kết quả hệ số thanh thải creatinin***

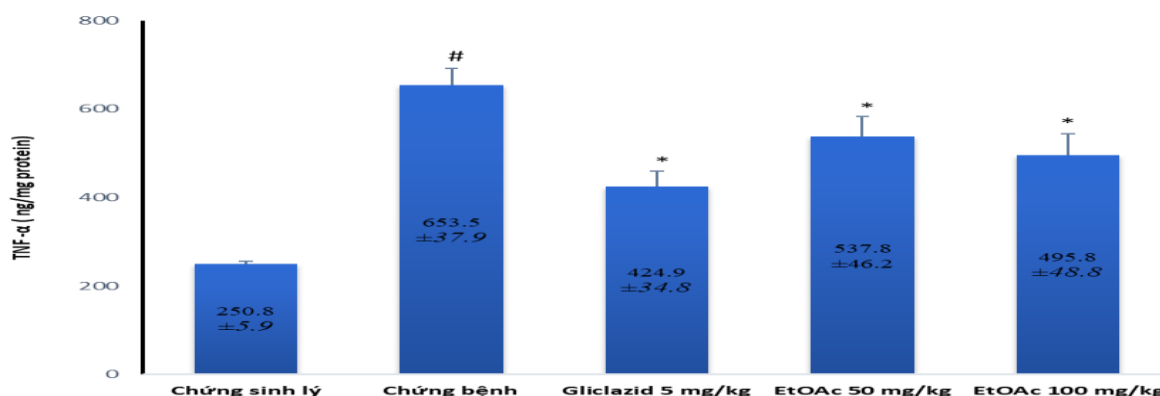
Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) có hệ số thanh thải creatin thấp hơn nhóm chuột chứng sinh lý với tỉ lệ là 64,3%, (với $p < 0,05$).

Gliclazid làm tăng đáng kể hệ số thanh thải creatinin ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, tỉ lệ thấp hơn là 84,3% ($p < 0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, hệ số thanh thải creatinin ở chuột đã tăng đáng kể với tỉ lệ tăng lần lượt là 50,6% và 72,1% khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,05$).

Như vậy phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng tăng hệ số thanh thải creatinin ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

3.1.2.5. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên tình trạng viêm ở mô thận chuột ngày thứ 60



Hình 3.3. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ TNF – α trên mô thận chuột ngày thứ 60

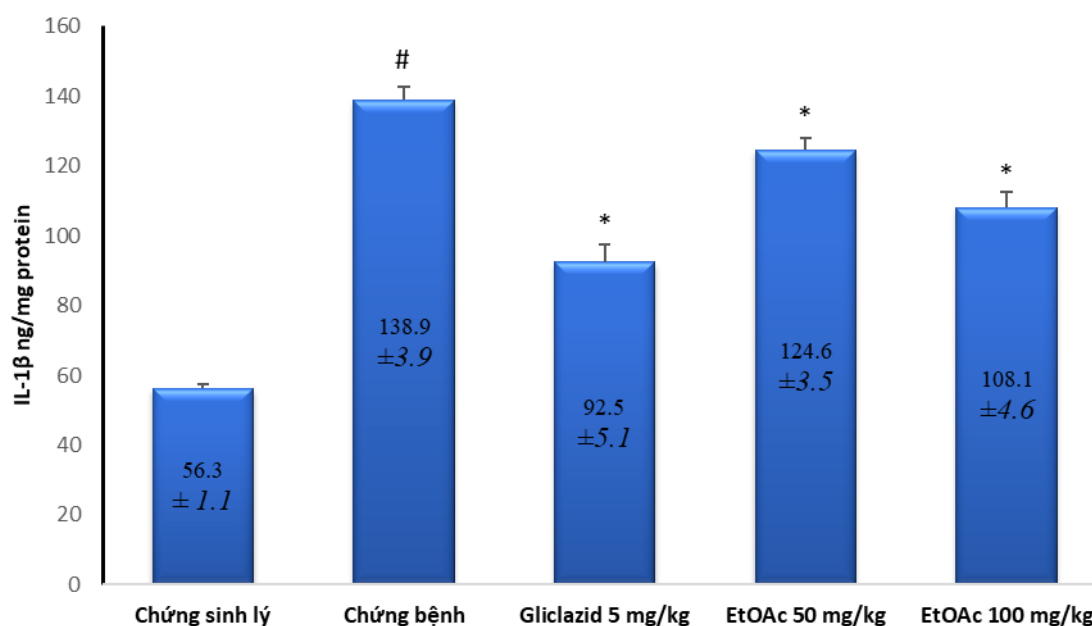
**Ghi chú:* Kết quả được trình bày dưới dạng TB $\pm$ SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p < 0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p < 0,05$).

Nhận xét: Kết quả ở hình 3.3 cho thấy, chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ TNF- α trên mô thận chuột cao hơn đáng kể so với nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 160,6%, ($p<0,05$).

Gliclazid làm giảm đáng kể nồng độ TNF- α trên mô thận ở chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ là 35% ($p<0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ TNF- α trên mô thận ở chuột đã giảm đáng kể với tỉ lệ giảm lần lượt là 17,7% và 24,1% khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,05$).

Như vậy phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng giảm nồng độ TNF- α ở mô thận chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ IL-1 β trên mô thận chuột ngày thứ 60

**Ghi chú:* Kết quả được trình bày dưới dạng TB $\pm$ SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p<0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p<0,05$).

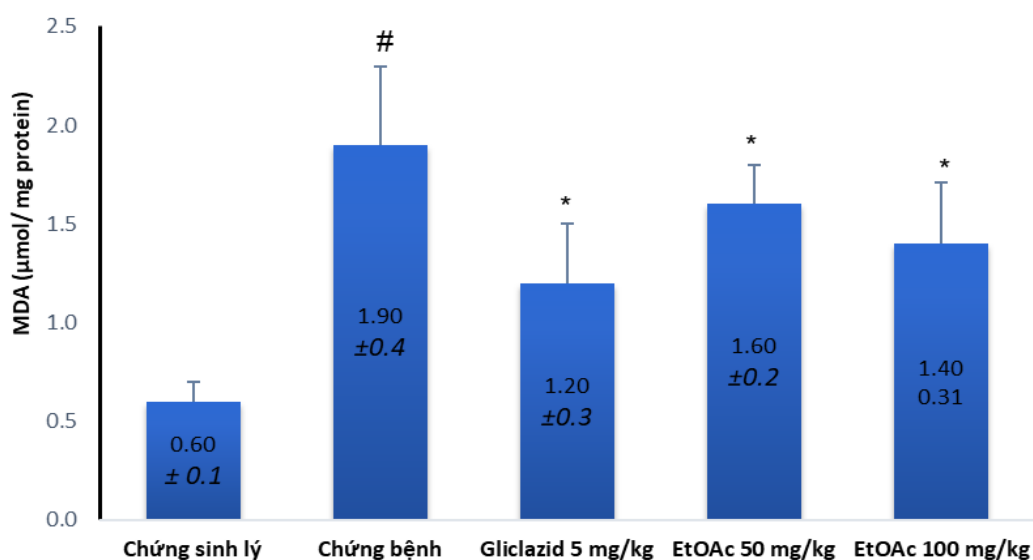
Nhận xét: Kết quả ở hình 3.4 cho thấy, chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ IL-1 β trên mô thận chuột cao hơn đáng kể so với nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 146,7%, (với $p<0,05$).

Gliclazid làm giảm đáng kể nồng độ IL-1 β trên mô thận ở chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ là 33,4% ($p<0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày nồng độ IL-1 β trên mô thận ở chuột đã giảm đáng kể với tỉ lệ giảm lần lượt là 10,3% và 22,2% khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,05$).

Như vậy phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng giảm nồng độ IL-1 β ở mô thận chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ.

3.1.2.6. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên quá trình stress oxy hóa ở chuột ngày thứ 60

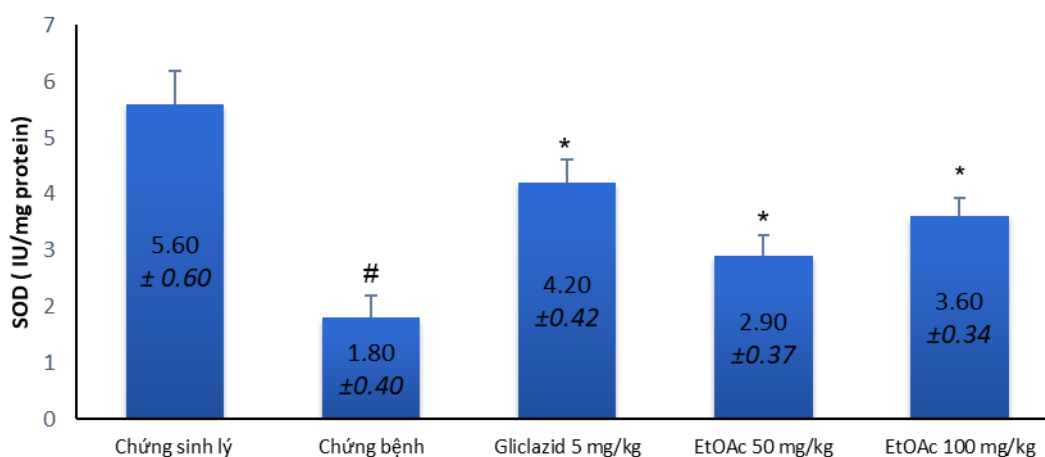


Hình 3.5. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên quá trình peroxy hóa lipid ngày thứ 60

**Ghi chú:* Kết quả được trình bày dưới dạng TB $\pm$ SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p<0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p<0,05$).

Nhận xét: Kết quả ở hình 3.5 cho thấy, chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ MDA trên mô thận cao hơn đáng kể so với nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 216,7%, ($p<0,05$). Gliclazid làm giảm đáng kể nồng độ MDA trên mô thận ở chuột bị gây ĐTD típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ là 36,8% ($p<0,05$). Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ MDA trên mô thận ở chuột đã giảm đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý với tỉ lệ giảm lần lượt là 15,8% và 26,3% ($p<0,05$).

Như vậy phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng giảm nồng độ MDA trên mô thận ở chuột bị gây ĐTD típ 2 bởi STZ. Và sau 60 ngày điều trị với cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc nồng độ các enzym chống oxy hóa tìm thấy trong mô thận chuột: SOD; CAT và GPx đã tăng đáng kể khi so sánh với nhóm chuột bệnh lý. Được thể hiện ở hình 3.6; 3.7 và 3.8.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ SOD ngày thứ 60

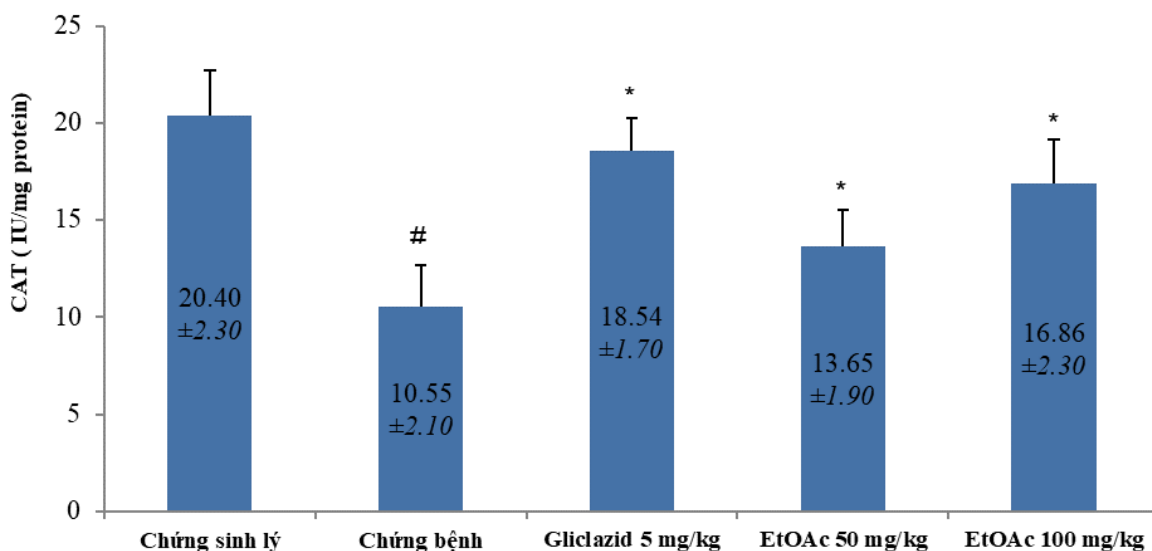
**Ghi chú:* Kết quả được trình bày dưới dạng TB±SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p<0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p<0,05$).

Nhận xét: Kết quả ở hình 3.6 cho thấy, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ SOD trên mô thận thấp hơn đáng kể so với nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 67,9% (với $p<0,05$).

Gliclazid làm tăng đáng kể nồng độ SOD trên mô thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ là 133,3% ($p<0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ SOD trên mô thận ở chuột đã cao hơn đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý với tỉ lệ lần lượt là 61,1% và 100% ($p<0,05$).

Như vậy phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng tăng nồng độ SOD trên mô thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ CAT ngày thứ 60

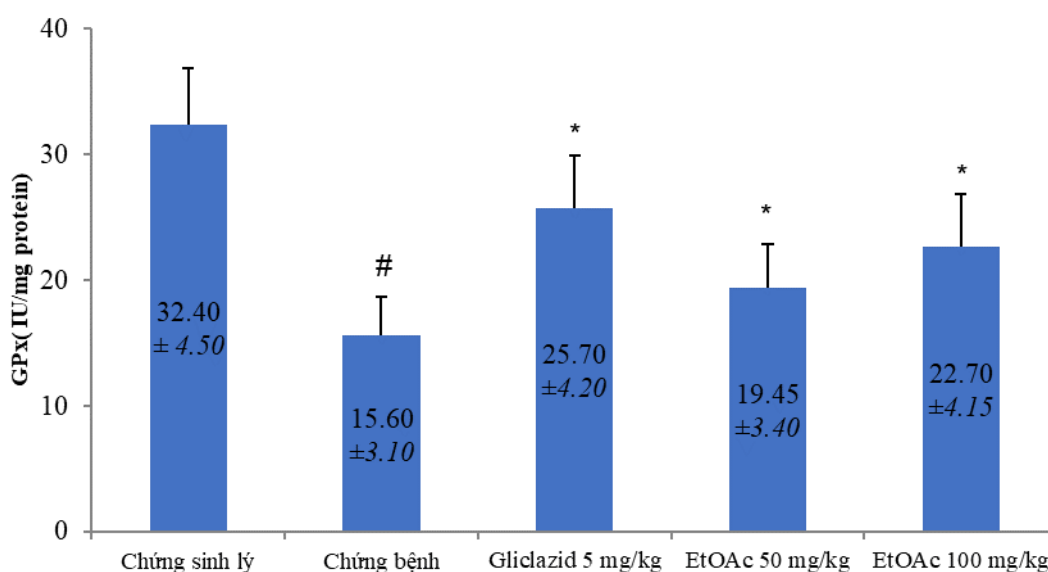
**Ghi chú:* Kết quả được trình bày dưới dạng TB±SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p<0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p<0,05$).

Nhận xét: Kết quả ở hình 3.7 cho thấy, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ CAT trên mô thận thấp hơn đáng kể so với nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 48,3%, (với $p < 0,05$).

Gliclazid làm tăng đáng kể nồng độ CAT trên mô thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ là 75,7% ($p < 0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ CAT trên mô thận ở chuột đã cao hơn đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý với tỉ lệ lần lượt là 29,4% và 59,8% ($p < 0,05$).

Như vậy phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng tăng nồng độ CAT trên mô thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ lên nồng độ GPx ngày thứ 60

**Ghi chú:* Kết quả được trình bày dưới dạng TB±SD, n=10, #: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng sinh lý ($p < 0,05$), *: khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chứng bệnh ($p < 0,05$).

Nhận xét: Kết quả ở hình 3.8 cho thấy, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ (chứng bệnh) có nồng độ GPx trên mô thận thấp hơn đáng kể so với nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 58,3%, (với $p < 0,05$).

Gliclazid làm tăng đáng kể nồng độ GPx trên mô thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ sau 60 ngày điều trị khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý, với tỉ lệ là 64,7% ($p < 0,05$).

Sau 60 ngày điều trị với phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ GPx trên mô thận ở chuột đã cao hơn đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý với tỉ lệ lần lượt là 24,7% và 45,6% ($p < 0,05$).

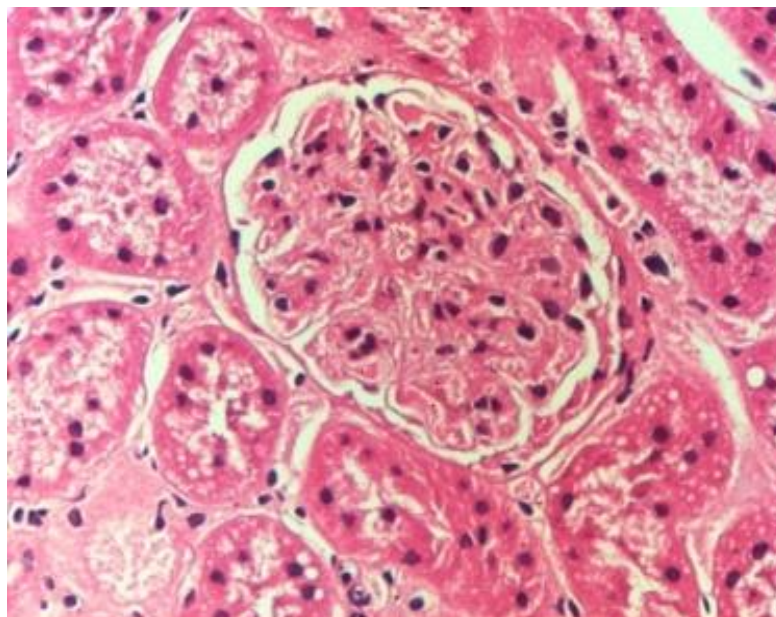
Như vậy phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng tăng nồng độ GPx trên mô thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

3.1.2.7. Ảnh hưởng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên mô bệnh học thận của chuột ngày thứ 60

Những thay đổi mô học của thận được quan sát dưới kính hiển vi. Quan sát mô học thận của chuột chứng sinh lý bằng cách nhuộm hematoxylin-eosin (HE) cho thấy độ dày và kết cấu thành mao mạch cầu thận bình thường. Ngoài ra, không quan sát thấy hiện tượng giãn nở trung bì, tăng tế bào trung mô, thoái hóa kính hoặc xuất hiện các tế bào viêm.

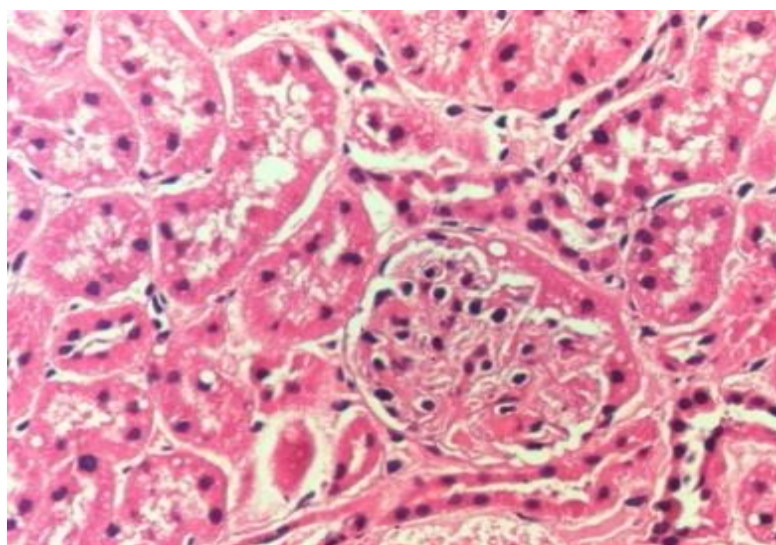
So với nhóm đối chứng sinh lý, các mô thận của chuột bị bệnh thận do đái tháo đường cho thấy tổn thương thận đáng kể, bao gồm thoái hóa kính ở cầu thận, màng đáy dày, thoái hóa mỡ ở ống thận, suy giảm các tế bào nội mô và thâm nhiễm tế bào viêm. Tuy nhiên, các nhóm chuột được điều trị bằng phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày đã cải thiện các tổn thương mô bệnh học thận: các tế bào nội mô phát triển gần bình thường, các thâm nhiễm tế bào viêm ít hơn, cầu thận giảm thoái hóa kính, ống thận ít thoái hóa mỡ hơn. Những kết quả trên chỉ ra rằng phân đoạn cao chiết

EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày đã ngăn ngừa tổn thương thận một cách hiệu quả và cải thiện chức năng thận.



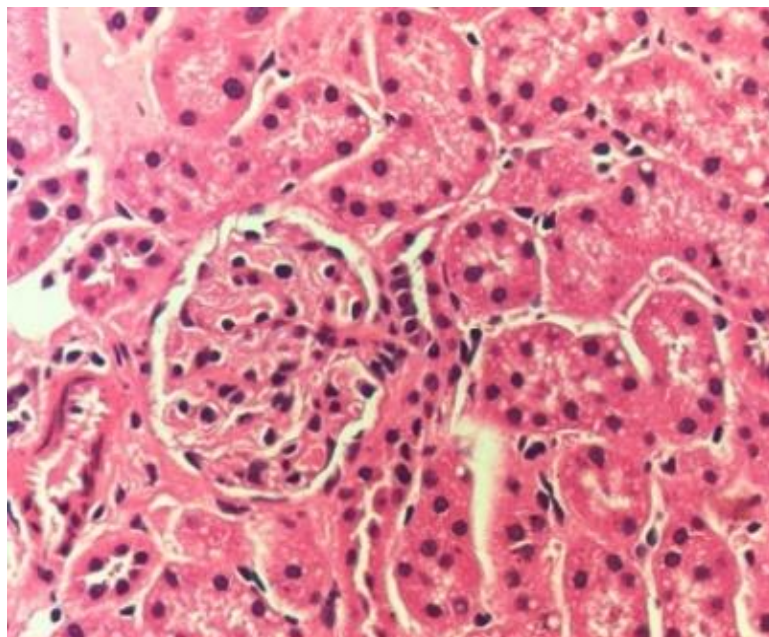
Cấu trúc thận bình thường. Cầu thận, ống thận, khoảng kẽ bình thường.

Hình 3.9. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm thường (HE x 400)



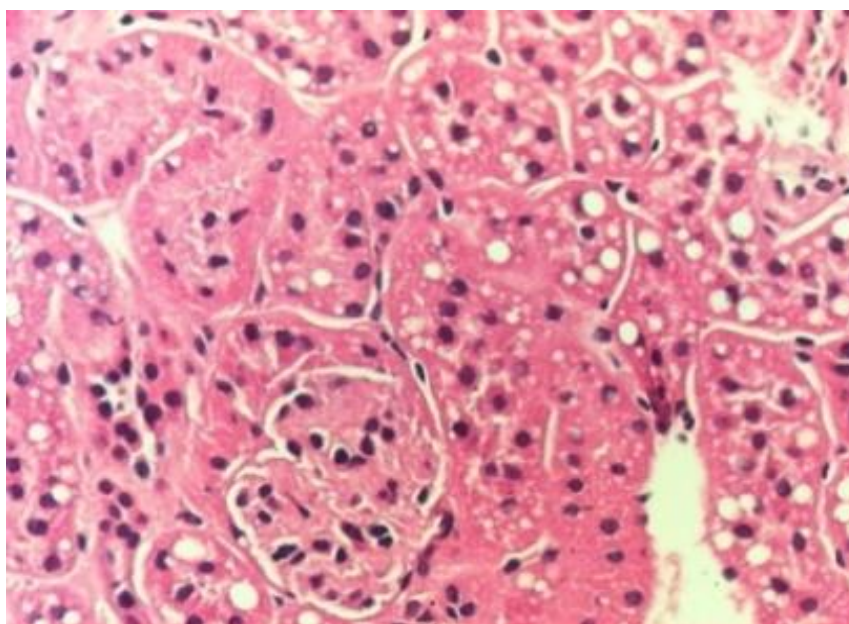
Cầu thận có vùng bị thoái hóa kính, màng đáy dày. Các tế bào nội mô trong cầu thận giả. Ống thận có nhiều vùng thoái hóa mỡ. Tổ chức kẽ xâm nhập nhiều tế bào viêm.

Hình 3.10. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm chứng bệnh (HEx400)



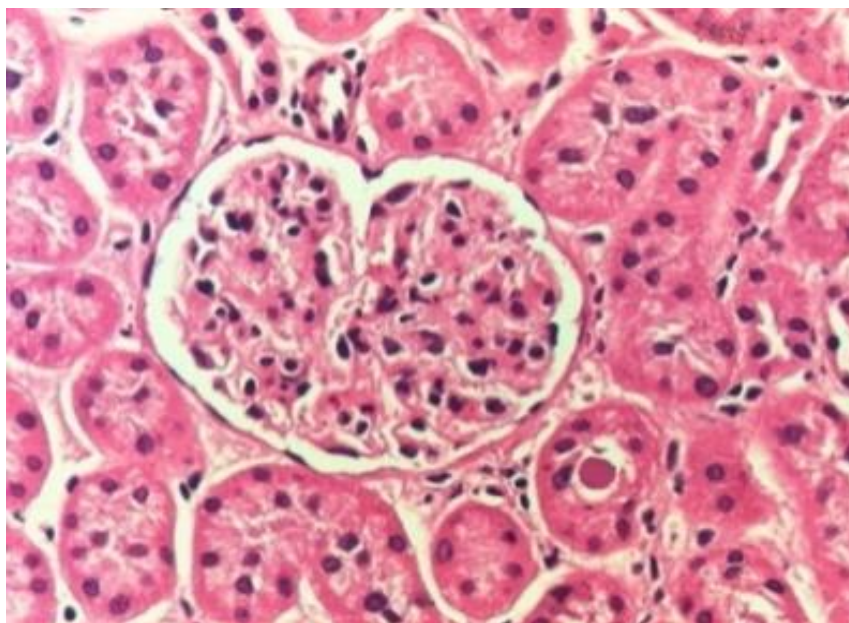
Cầu thận: Có ít cầu thận thoái hóa kính. Nhiều cầu thận có tăng sinh tế bào nội mô. Ống thận có rất ít các hạt mỡ. Tổ chức kẽ có ít tế bào viêm.

Hình 3.11. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm được điều trị với glyclazid 5 mg/kg (HEx400) ngày thứ 60



Cầu thận: Rải rác có cầu thận thoái hóa kính. Ít tế bào nội mô trong cầu thận. Ống thận: có vùng bị thoái hóa mỡ. Tổ chức kẽ có ít tế bào viêm.

Hình 3.12. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm được điều trị với cao chiết MP- E liều 50 mg/kg (HEx400) ngày thứ 60



*Cầu thận: Có nhiều vùng tế bào nội mô phát triển tốt. Có cái gần bình thường.
Ống thận không thoái hóa. Tổ chức kẽ có tế bào viêm.*

Hình 3.13. Hình ảnh đại diện vi thể thận chuột nhóm được điều trị với cao chiết MP- E liều 100 mg/kg (HEx400) ngày thứ 60

3.2. Kết quả đánh giá cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ in vitro và in silico.

3.2.1. Kết quả in vitro thử tác dụng ức chế α -glucosidase và PTP-1B của các hợp chất phân lập được.

Kết quả hai hợp chất ức chế enzyme α -glucosidase và PTP-1B được trình bày trong bảng 3.5. Theo kết quả bảng 3.5, hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic có tác dụng ức chế đáng kể enzyme α -glucosidase enzyme với giá trị IC_{50} lần lượt là $416,17 \pm 9,41 \mu M$ và $490,78 \pm 9,28 \mu M$, so với chứng dương acarbose có giá trị IC_{50} là $241,76 \pm 2,66 \mu M$. Chất đối chứng dương acarbose hoạt động ổn định trong thí nghiệm. Tác dụng ức chế α -glucosidase của hai hợp chất tăng dần theo nồng độ. Ngoài ra, acid protocatechuic và acid syringic cũng cho thấy tác dụng ức chế enzyme PTP-1B đáng kể với giá trị IC_{50} lần lượt là $248,83 \pm 7,66 \mu M$ và $450,31 \pm 7,77 \mu M$, so với chứng dương acid ursolic có giá trị IC_{50} là $46,97 \pm 2,89 \mu M$. Một số nghiên cứu cũng sử dụng acid ursolic làm chuẩn dương để đánh giá khả năng ức chế PTP-1B. Một số các nghiên cứu trước

đây cũng cho thấy acid ursolic có thể ức chế PTP-1B [124]. Giá trị này gần tương đồng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Bệnh đái tháo đường là bệnh rối loạn chuyển hóa liên quan đến nhiều đích tác dụng. Acid protocatechuic và acid syringic thể hiện tác dụng ức chế cả hai đích khác nhau bao gồm PTP-1B và α -glucosidase, hứa hẹn sẽ trở thành các hợp chất tiềm năng trong điều trị bệnh đái tháo đường.

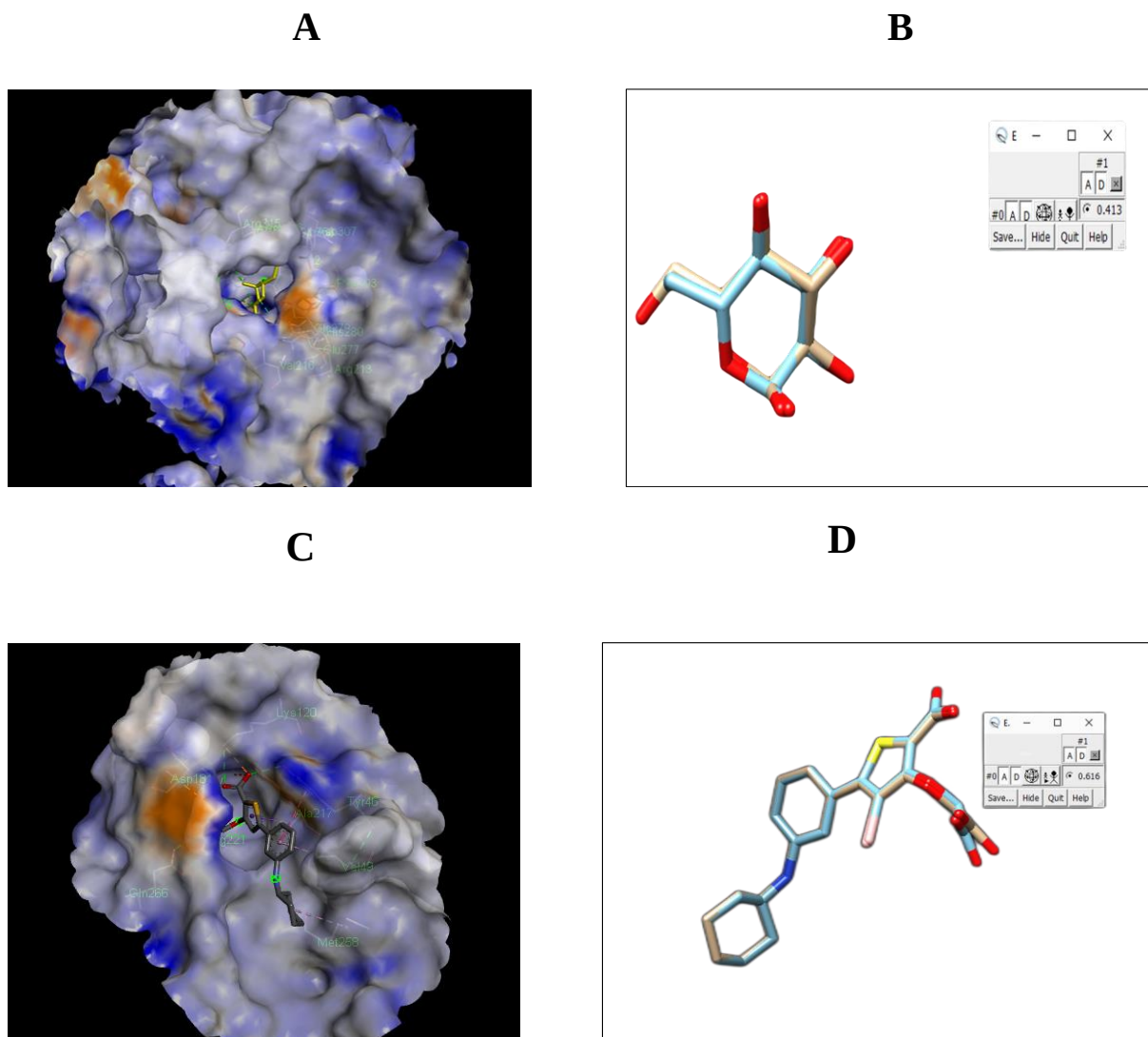
Bảng 3.5. Tác dụng ức chế enzym α -glucosidase và PTP-1B của các hợp chất phân lập được

Hợp chất	α -Glucosidase	PTP-1B
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
Acid protocatechuic	416,17 $\pm$ 9,41	248,83 $\pm$ 7,66
Acid syringic	490,78 $\pm$ 9,28	450,31 $\pm$ 7,77
Acarbose	241,76 $\pm$ 2,66	-
Acid ursolic	-	46,97 $\pm$ 2,89

3.2.2. Kết quả *in silico* thử tác dụng ức chế α -glucosidase và PTP-1B của các hợp chất phân lập được.

3.2.2.1. Đánh giá mô hình docking

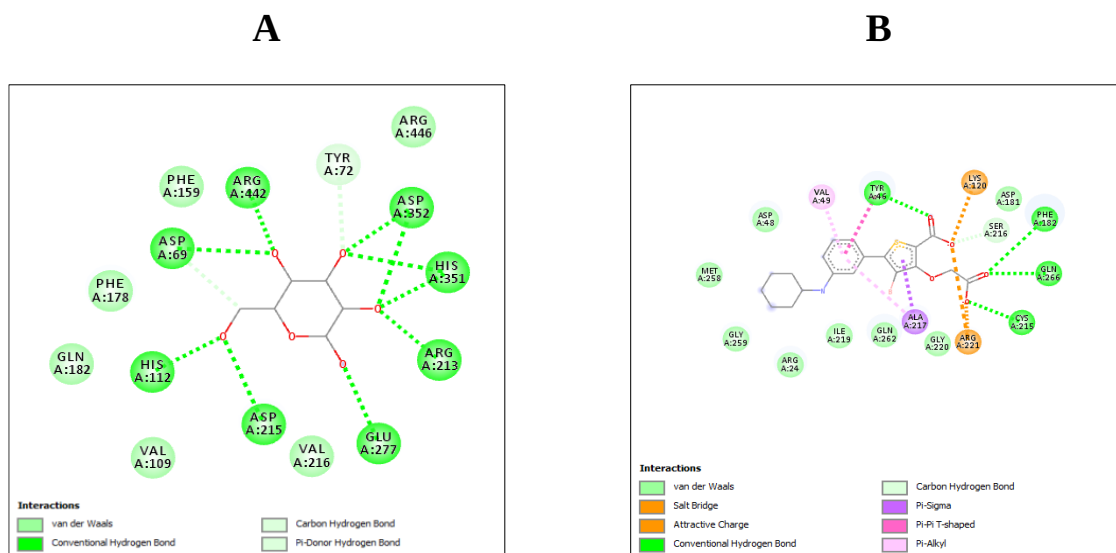
Trước khi thực hiện docking, chúng tôi tiến hành đánh giá mô hình docking của các hợp chất. Phôi tử đồng tinh thể của 2 protein được gắn lại vào vị trí hoạt động của mục tiêu để xác định độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) và đánh giá sự tương đồng về cấu trúc bằng phần mềm Chimera 1.14. Kết quả thu được sự chồng khít về cấu trúc của phôi tử đồng tinh thể của isomaltase và enzym PTP-1B lần lượt là 0,413 Å và 0,616 Å. Giá trị RMSD nhỏ hơn 1,5 Å chứng tỏ kết quả của việc ghép phân tử vào mục tiêu là đáng tin cậy (Hình 3.14).



Hình 3.14. Vùng hoạt động và kết quả redock của hai mục tiêu

**Ghi chú:* A) Vùng hoạt động của isomaltase; B) Kết quả redock của phối tử đồng kết tinh isomaltase; C) Vị trí hoạt động của PTP-1B; D) Kết quả redock của phối tử đồng kết tinh PTP-1B.

Liên kết hydro là liên kết chiếm ưu thế giữa tương tác α -D-glucopyranose và isomaltase với các acid amin bao gồm ARG 442, ASP 69, HIS 112, ASP 215, GLU 277, ARG 213, HIS 351, ASP 352 (Hình 3.15). Sự tương tác giữa phối tử đồng kết tinh và PTP-1B được chỉ ra trong hình 3.18B, cho thấy sự tương tác giữa phối tử đồng kết tinh và protein gắn liền với một số loại liên kết gồm π -alkyl, π - σ với ALA217; liên kết hydro thông thường với TYR46, ASP181, GLN266; π - π với TYR46 và một số acid amin khác như MET258, ARG221, LYS120.



Hình 3.15. Minh họa 2D tương tác giữa hai phối tử đồng tinh thể và protein của chúng

**Ghi chú:* A) Minh họa 2D về tương tác giữa alpha-D-glucopyranose và isomaltase; B) Minh họa 2D về sự tương tác giữa acid 4-brom-3-(carboxymethoxy)-5-[3-(cyclohexylamin)phenyl] thiophen-2-carboxylic và PTP-1B.

3.2.2.2. Kết quả docking

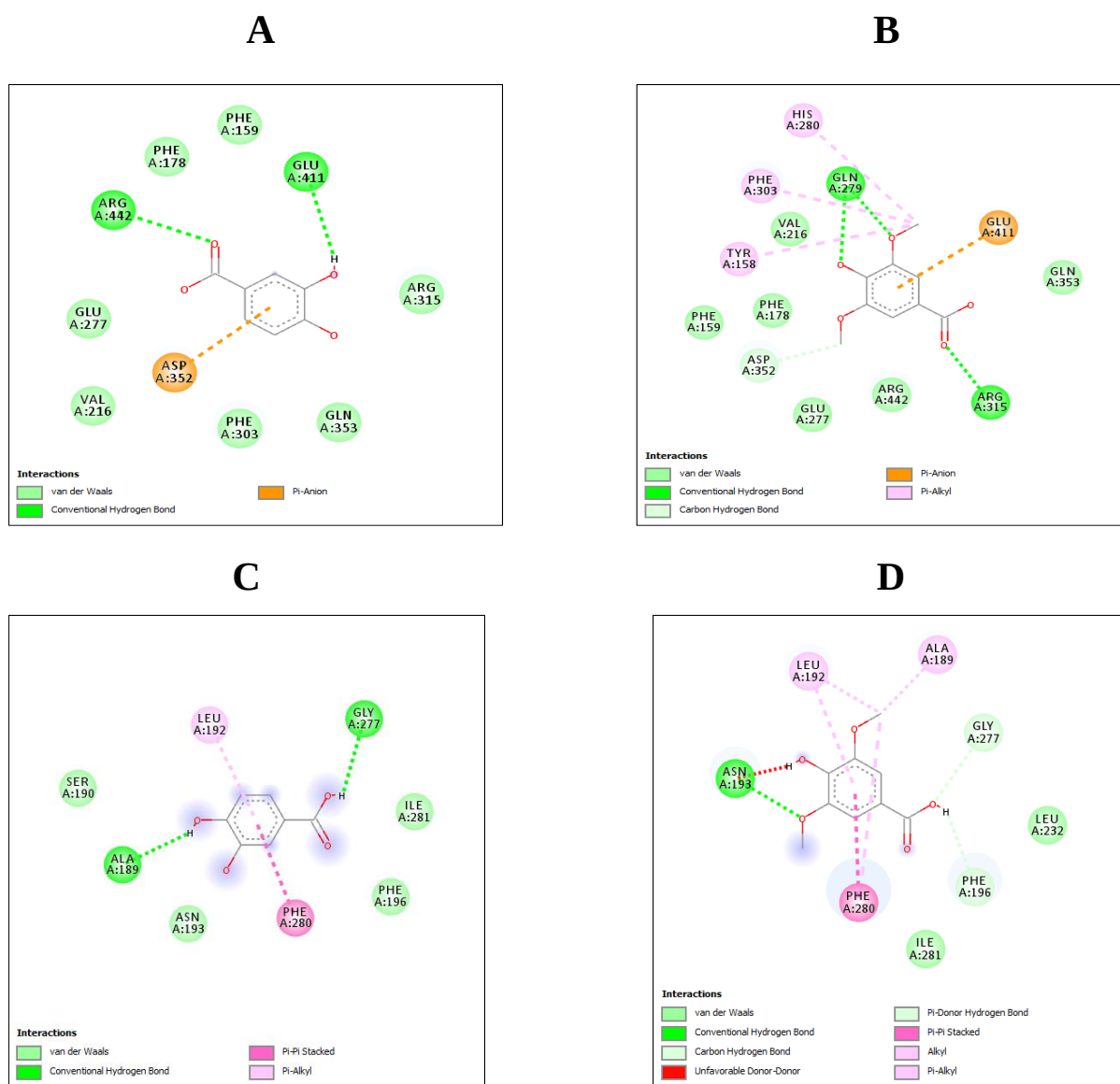
Acarbose là một trong những loại thuốc phổ biến nhất được sử dụng để điều trị bệnh đái tháo đường dựa trên cơ chế ức chế hoạt động của enzym α -glucosidase. Do đó, chúng tôi đã sử dụng acarbose làm chất đối chứng dương để so sánh với 2 hợp chất trong hoạt động ức chế α -glucosidase. Đối với mục tiêu PTP-1B, acid ursolic được sử dụng làm chất đối chứng dương tính [125].

Bảng 3.6. Kết quả docking các hợp chất

Tên hợp chất	Năng lượng liên kết của isomaltase (kcal/mol)	Năng lượng liên kết của PTP-1B (kcal/mol)
Acid protocatechuic	-5,9	-5,7
Acid syringic	-5,9	-5,6
Acarbose	-8,3	-
Acid ursolic	-	-7,5

Kết quả bảng 3.6 cho thấy cả acid protocatechuic và acid syringic đều có năng lượng liên kết với hai protein mục tiêu cao hơn so với các hợp chất đối

chứng dương. Xét về enzym α -glucosidase, hai hợp chất phân lập được có cùng năng lượng tương tác -5,9 kcal/mol, cao hơn năng lượng liên kết của acarbose (-8,3 kcal/mol). Trong khi acid protocatechuic và acid syringic liên kết với enzym PTP-1B với các giá trị năng lượng liên kết lần lượt là -5,7 kcal/mol, -5,6 kcal/mol. Giá trị này cũng cao hơn năng lượng liên kết của acid ursolic (-7,5 kcal/mol).



Hình 3.16. Minh họa 2D tương tác giữa hai hợp chất và mục tiêu

**Ghi chú:* A) Tương tác giữa acid protocatechuic và isomaltase; B) Tương tác giữa acid syringic và isomaltase; C) Tương tác giữa acid protocatechuic và PTP-1B; D) Tương tác giữa acid syringic và PTP-1B.

Với protein isomaltase, acid protocatechuic tương tác với một số acid amin tại vị trí hoạt động thể hiện qua liên kết hydro với các acid amin: ARG 442, π -anion với ASP 352 (Hình 3.16). Bên cạnh đó, acid syringic tạo liên kết hydro với acid amin GLN 197, ARG 315; π -alkyl với TYR 158, PHE 303, HIS 280.

Với protein PTP-1B, acid protocatechuic tạo liên kết với một số acid amin trong vị trí hoạt động thông qua các liên kết hydro với GLY 277, ALA 189 và π -alkyl với LEU 192 (Hình 3.16). Ngoài ra, acid syringic là đã chứng minh sự tương tác với liên kết hydro với các acid amin ASN 193, π -alkyl với LEU 192, ALA 189 và một số acid amin khác như GLY 277, PHE 196.

3.2.2.3. Đánh giá khả năng giống thuốc theo quy tắc Lipinski

Bảng 3.7. Kết quả phân tích quy tắc Lipinski 5 của 2 hợp chất

Tên hợp chất	Phân tử khối (MW)	Số nhóm cho liên kết hydrogen (HBD)	Số nhóm nhận liên kết hydrogen (HBA)	LogP	Độ khúc xạ mol (MR)	Tính giống thuốc
Acid protocatechuic	154	3	4	0,7960	36,73	Có
Acid Syringic	198	2	5	1,1076	48,17	Có

Kết quả bảng 3.7 cho thấy cả hai hợp chất đều có đặc tính giống thuốc khi thỏa mãn nhiều hơn 2 trong 5 tiêu chí của quy tắc Lipinski 5. Sau đó, chúng tôi tiếp tục tiến hành phân tích các đặc tính dược động học và độc tính của các hợp chất này thông qua các quá trình hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính.

3.2.2.4. Phân tích các thông số dược động học (ADMET) của hai hợp chất

Để phân tích đặc tính hóa lý của các hợp chất, chúng tôi đã sử dụng công cụ trực tuyến pkCSM để dự đoán các thông số dược động học và độc tính (ADMET). Đây là cơ sở để chứng minh khả năng thành công của một thuốc. Các dự đoán ADMET được trình bày trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả dự đoán ADMET

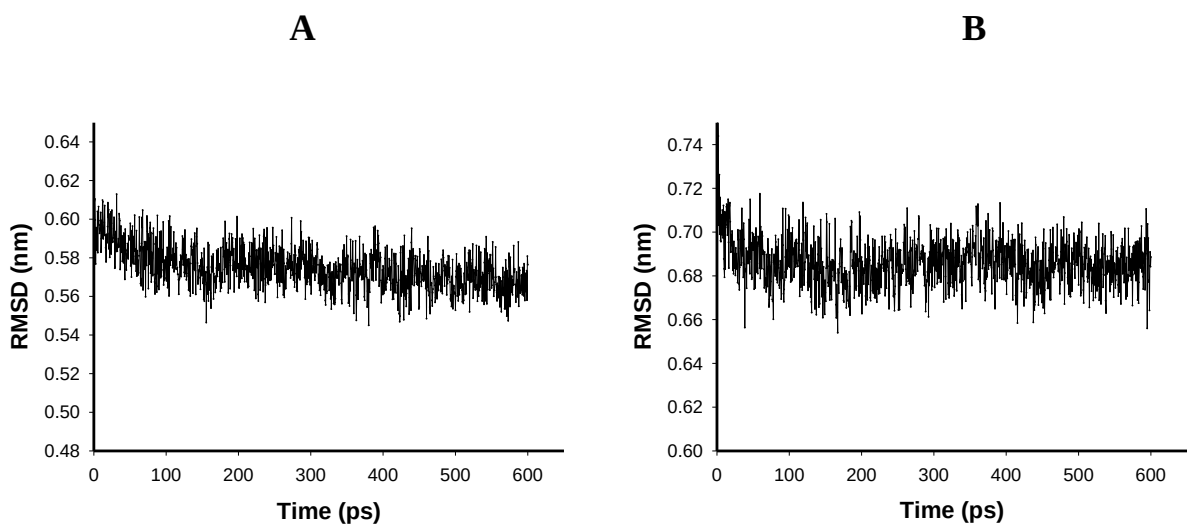
Thông số	acid protocatechuic	acid syringic
Hấp thu		
Độ tan trong nước (log mol/L)	-2,069	-2,223
Tính thấm màng Caco-2 (log P _{app} trong 10 ⁻⁶ cm/s)	0,490	0,495
Hấp thu ở ruột (người) (%)	71,174	73,076
Phân bố		
Thể tích phân bố VDss (người) (log L/kg)	-1,298	-1,443
Tính thấm hàng rào máu não (log BB)	-0,683	-0,191
Chuyển hóa		
Cơ chất CYP2D6	Không	Không
Cơ chất CYP3A4	Không	Không
Ức chế CYP2D6	Không	Không
Ức chế CYP3A4	Không	Không
Thải trừ		
Độ thanh thải toàn phần (log mL/min/kg)	0,551	0,646
Độc tính		
Độc tính AMES	Không	Không
Độc tính gan	Không	Không
Kích ứng da	Không	Không

Về quá trình hấp thu, tính thấm của dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến-2 ở ruột kết (Caco-2) ở người và khả năng hấp thu ở ruột người (HIA) là những tiêu chuẩn quan trọng để xác định toàn bộ sinh khả dụng của thuốc [126, 127]. Các hợp chất được cho là hấp thu kém hoặc hấp thu vừa hoặc hấp thu tốt nếu HIA của chúng lần lượt ở trong khoảng 0 đến 20%, 20% đến 70%, và 70% đến 100%. Tính thấm của màng Caco-2 (log P_{app} trong 10⁻⁶ cm/s) có giá trị cao hơn 0,9 được cho là có tính thấm tốt. Bảng 3.6 cho thấy cả acid protocatechuic và acid syringic đều có khả năng thấm một phần qua màng tế bào Caco-2, tương

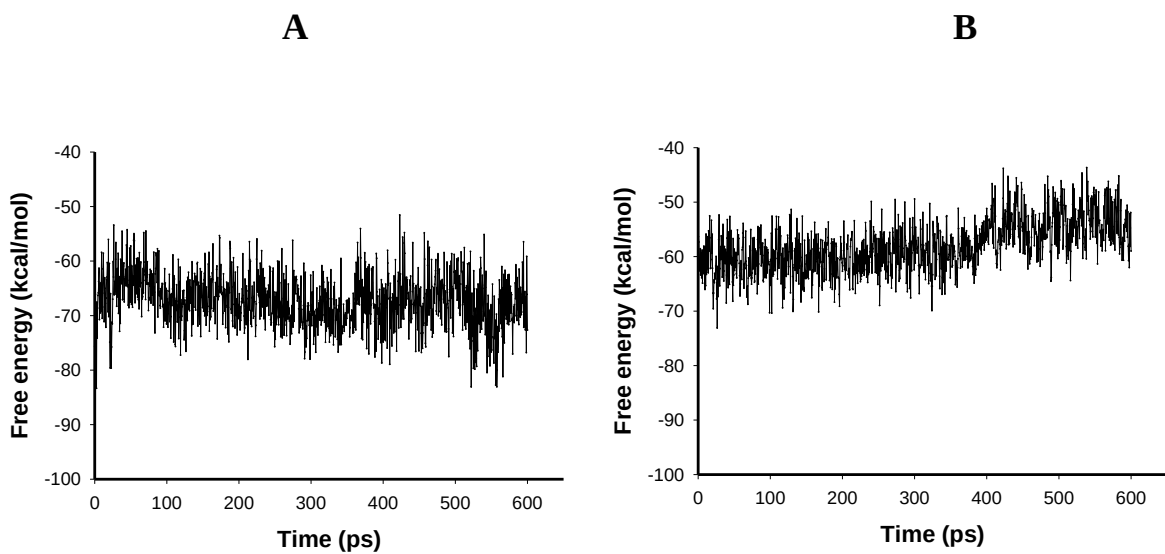
ứng với giá trị 0,49 và 0,495 ($\log P_{app}$ trong 10^{-6} cm/s). Cả hai hợp chất cũng cho thấy sự hấp thu tốt qua ruột người với tỷ lệ hấp thu lần lượt là 71,174% và 73,076%. Mặt khác, trong quá trình phân bố, giá trị $\log P_{app}$ lớn hơn 0,3 được cho là được hấp thu tốt qua hàng rào máu não và nhỏ hơn -1 được coi là không vượt qua hàng rào máu não. Kết quả cho thấy cả hai hợp chất đều có ít tính thấm qua hàng rào máu não. Về chuyển hóa, hệ thống cytochrom P450 là hệ thống enzym quan trọng trong chuyển hóa thuốc ở gan, với 2 CYP quan trọng là CYP3A4 và CYP2D6. Do đó, cả hai hợp chất đều không phải là cơ chất và không ức chế hai enzym quan trọng này nên có thể không được chuyển hóa ở gan. Các dự đoán về độc tính cho thấy rằng tất cả các hợp chất đều không có khả năng gây độc cho gan, không có độc tính AMES và không gây mẫn cảm cho da.

3.2.3. Kết quả động lực học phân tử

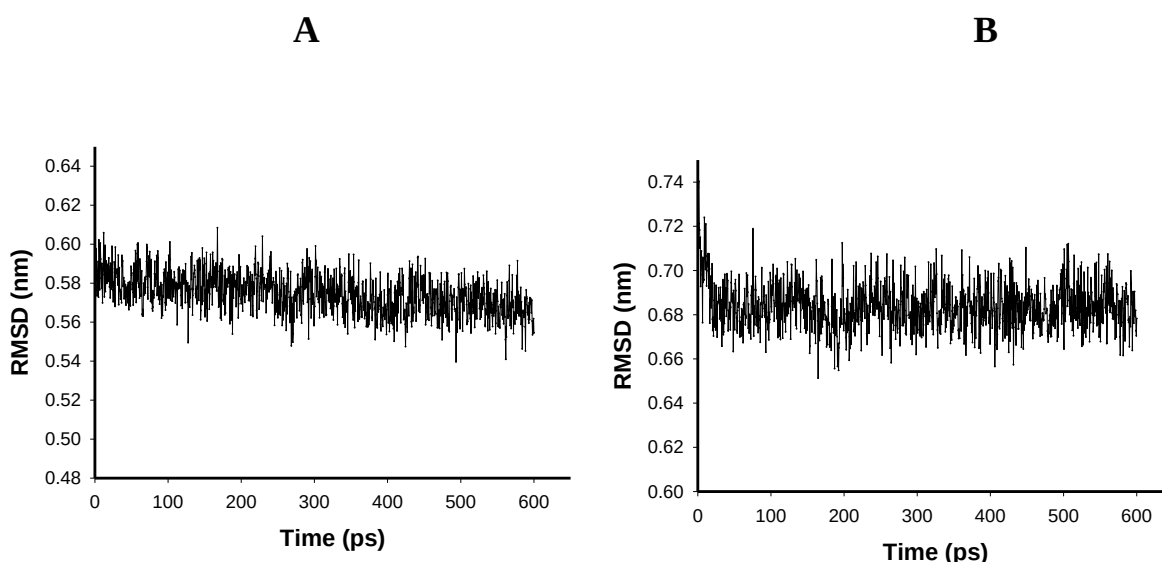
Để nghiên cứu tính ổn định về tư thế lắp ghép của hai hợp chất, chúng tôi đã thực hiện mô phỏng động lực học phân tử của các phức hợp enzym và phối tử. Kết quả được trình bày hình 3.17; 3.18; 3.19 và 3.20.



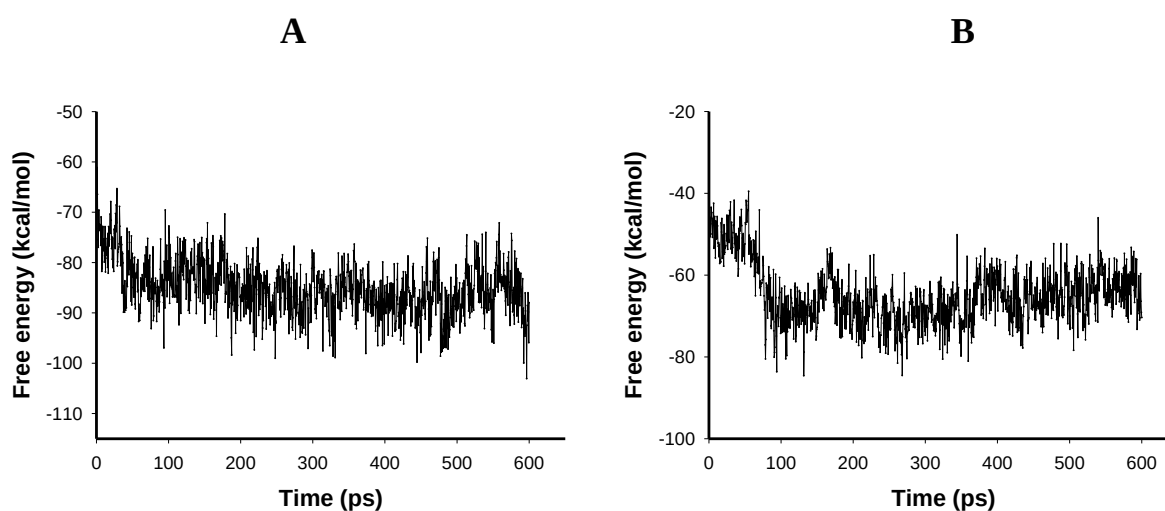
Hình 3.17. RMSD của phức hợp isomaltase- acid protocatechuic (A) phức hợp PTP-1B- acid protocatechuic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử



Hình 3.18. Năng lượng tự do của phức hợp isomaltase- acid protocatechuic (A) phức hợp PTP-1B- acid protocatechuic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử



Hình 3.19. RMSD của phức hợp isomaltase- acid syringic (A) phức hợp PTP-1B- acid syringic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử



Hình 3.20. Năng lượng tự do của phức hợp isomaltase- acid syringic (A) phức hợp PTP-1B- acid syringic (B) trong 600ps mô phỏng động lực học phân tử

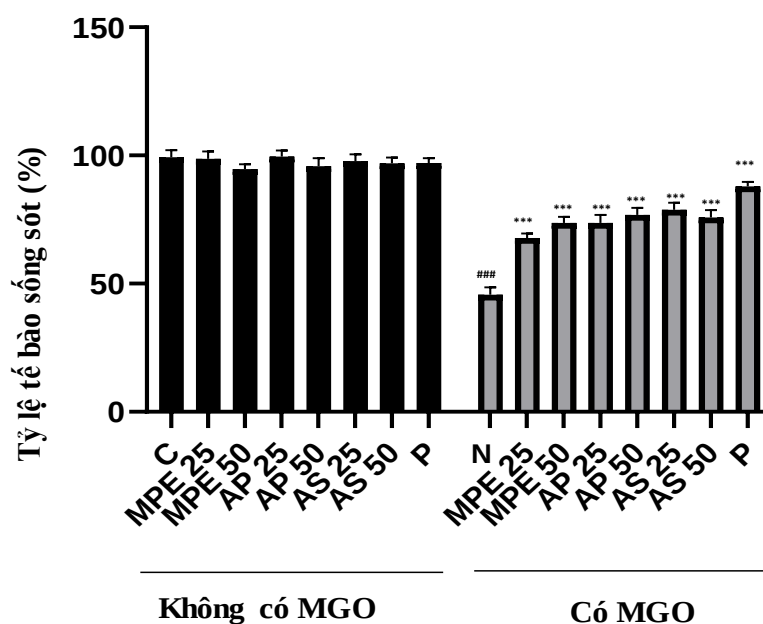
Dựa trên hình 3.17; 3.18; 3.19 và 3.20, kết quả động lực học phân tử của tất cả các phức chất cho thấy mô hình ổn định với năng lượng tự do đạt đến trạng thái cân bằng sau khoảng 100 ps. Tuy nhiên, có một dao động nhỏ giữa 100-300 ps đối với phức hợp PTP-1B- acid syringic. Ngoài ra, kết quả đã chỉ ra rằng năng lượng tự do của phức hợp PTP-1B- acid protocatechuic có xu hướng âm hơn ở khoảng 400-600 ps. Nhìn chung, năng lượng tự do của phức hợp acid protocatechuic-protein ổn định hơn so với phức hợp acid syringic-protein. Các

giá trị RMSD thu được của tất cả các phức chất đều nhỏ và tương đối ổn định, cho thấy hầu như không có sự khác biệt đáng kể về vị trí nguyên tử của phức hợp sau 600ps mô phỏng động lực học phân tử. Tuy nhiên, cần phải nghiên cứu tính ổn định của phức hợp enzyme-phôi tử trong một khoảng thời gian dài hơn.

3.2.4. Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với độc tính methylglyoxal (MGO)

Thử nghiệm HUVECs-glucotoxicity do MGO (phép thử độc tính glucose của HUVECs thông qua MGO) là một phương pháp được sử dụng để đánh giá tác động độc hại của methylglyoxal (MGO) lên tế bào HUVECs trong điều kiện nồng độ glucose tăng cao. Trong phép thử này, tế bào HUVECs được đặt trong môi trường có nồng độ glucose tăng cao và sau đó tiếp xúc với MGO. MGO là một hợp chất có khả năng gây độc và có thể tác động tiêu cực lên tế bào, đặc biệt là tác động đến việc hoạt động của tế bào và sự sống còn của chúng. Bằng cách thực hiện phép thử này, có thể đo lường sự ảnh hưởng của MGO lên khả năng sống và chức năng của tế bào HUVECs, từ đó đánh giá tác động của glucose tăng cao và quá trình hình thành sản phẩm cuối của quá trình glycation (AGEs) đối với các tế bào này.

Để nghiên cứu tác dụng bảo vệ của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic đối với nhiễm độc glucose do MGO gây ra, thí nghiệm MTT đã được thực hiện để đánh giá về kết quả về khả năng sống của tế bào. Như được hiển thị trong hình 3.21, các tế bào HUVEC thể hiện bị ức chế đáng kể về khả năng sống của tế bào sau khi xử lý MGO (400 μ M). Trong khi đó, sự ức chế tác dụng gây độc tế bào của MGO đã được quan sát thấy trong các tế bào khi được điều trị trước bằng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic thông qua tỷ lệ tăng số lượng tế bào sống sót. Tuy nhiên, tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic thấp hơn so với nhóm đối chứng dương được điều trị bằng AG với liều lượng 1mM.



Hình 3.21. Tỷ lệ sống sót của tế bào HUVECs sau khi được điều trị với phân đoạn EtOAc và hai hợp chất và aminoguanidin trong hai trường hợp có và không có MGO

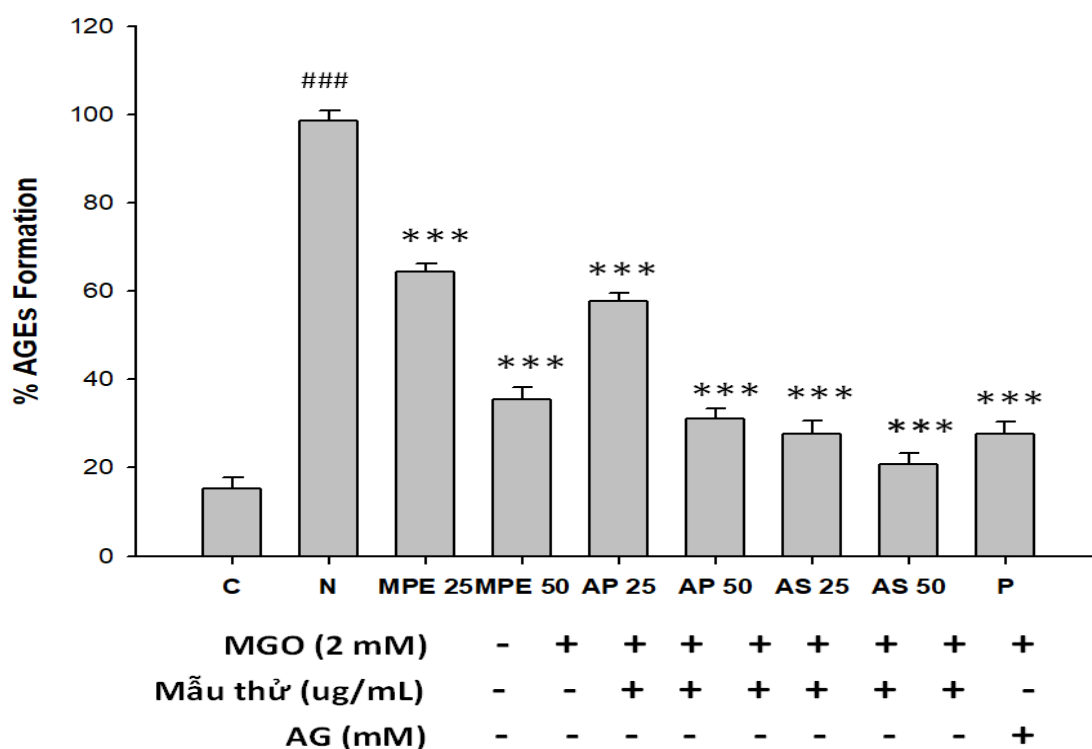
Ghi chú: (C) Đối chứng sinh lý; (MPE 25) Phân đoạn EtOAc (25 µg/mL); (MPE 50) Phân đoạn EtOAc (50 µg/mL); (AP 25) Hợp chất acid protocatechuic (25 µg/mL); (AP 50) Hợp chất acid protocatechuic (50 µg/mL); (AS 25) Hợp chất acid syringic (25 µg/mL); (AS 50) Hợp chất acid syringic (50 µg/mL); (P) Aminoguanidin (1mM); (N) MGO (400µM); Kết quả tỷ lệ phần trăm sống sót của tế bào được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD của ba thí nghiệm độc lập. (### $p < .001$ so với nhóm C, *** $p < .001$ so với nhóm N).

Tác dụng ức chế của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với sự hình thành AGEs

Thử nghiệm hình thành AGEs do MGO gây ra (MGO-induced AGEs formation assay) là một phương pháp được sử dụng để đo lường quá trình hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) do tác động của methylglyoxal (MGO). MGO, một hợp chất có khả năng gây độc, được sử dụng để tác động lên các protein, như Bovine Serum Albumin (BSA), trong điều kiện được tạo ra để tương tác không enzym hóa giữa đường và protein. Quá trình này dẫn đến hình

thành AGEs, các sản phẩm cuối của quá trình glycation. Thử nghiệm hình thành AGEs do MGO gây ra sử dụng để đo lường mức độ hình thành AGEs dưới tác động của MGO, và thông qua việc xem xét sự thay đổi trong các đặc điểm của protein, chẳng hạn như cấu trúc, hoạt tính, và tính chất sinh hóa. Kết quả của phép thử này có thể cung cấp thông tin về khả năng của mẫu thử trong việc ức chế hoặc giảm thiểu sự hình thành AGEs gây hại.

Chúng tôi giả thiết rằng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic có khả năng ức chế hình thành AGE và thử nghiệm giả thiết này bằng cách thực hiện phép thử hình thành AGE. BSA được ủ với MGO trong sự có mặt hoặc không có phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic và aminoguanidin (AG) là chứng dương. Như trình bày trong hình 3.22, sự hình thành AGEs do MGO đã giảm đáng kể do tác dụng của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất mẫu thử theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Hợp chất acid syringic thể hiện tác dụng ức chế hình thành AGEs tương đương với chứng dương AG.



Hình 3.22. Khả năng ức chế hình thành AGEs do MGO gây ra sau khi điều trị bằng của các mẫu thử

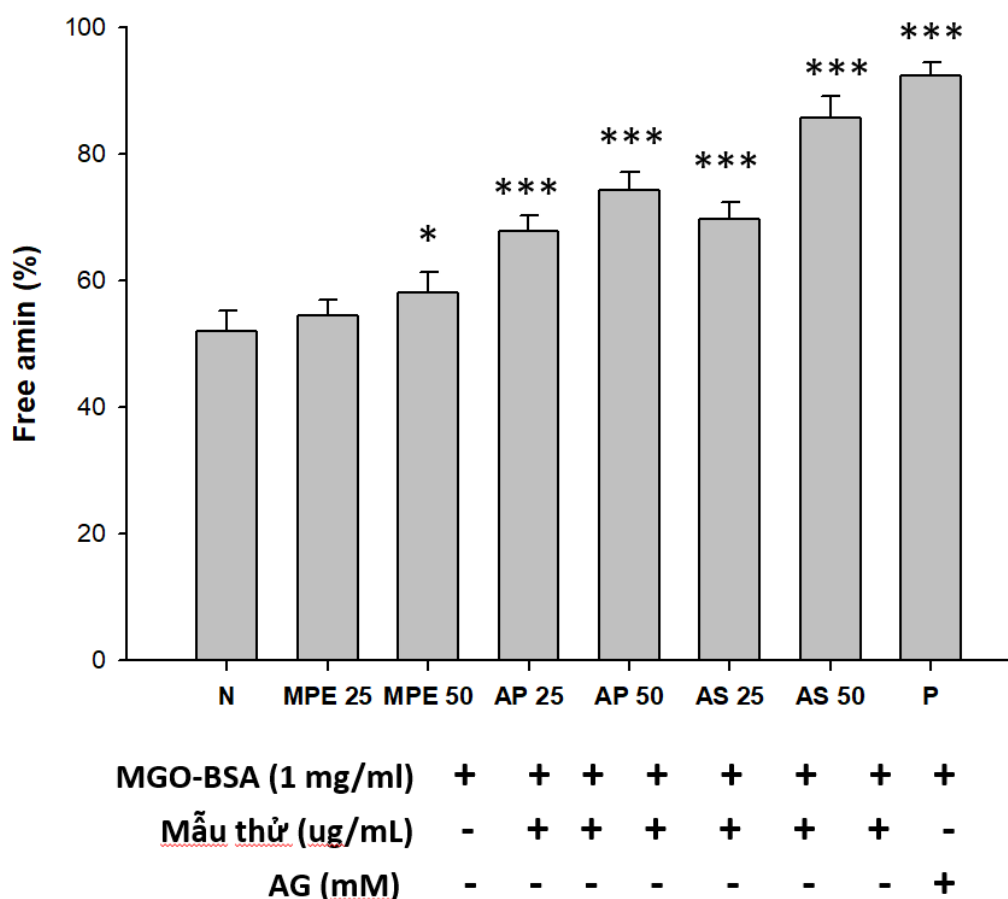
Ghi chú: (C) control; (N) MGO (2 mM); (MPE 25) Phân đoạn EtOAc (25 µg/mL); (MPE 50) Phân đoạn EtOAc (50 µg/mL); (AP 25) Hợp chất acid protocatechuic (25 µg/mL); (AP 50) Hợp chất acid protocatechuic (50 µg/mL); (AS 25) Hợp chất acid syringic (25 µg/mL); (AS 50) Hợp chất acid syringic (50 µg/mL); (P) Aminoguanidin (1 mM). Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD của ba thử nghiệm độc lập. (***) $p < 0,001$ so với nhóm N chỉ có MGO và ### $p < 0,001$ so với nhóm chứng sinh lý C).

Kết quả tác dụng của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất đối với thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs)

Thử nghiệm MGO-AGEs breaker (phá vỡ MGO-AGEs) là một phương pháp được sử dụng để đánh giá khả năng của mẫu thử trong việc phá vỡ liên kết giữa Advanced Glycation End Products (AGEs) được hình thành từ methylglyoxal (MGO) và các phân tử protein. AGEs là các sản phẩm cuối của quá trình glycation không enzym hóa, trong đó các phân tử đường và protein tương tác trong điều kiện đường huyết cao. MGO, một hợp chất gây độc, thường là một tác nhân chính góp phần vào quá trình hình thành AGEs. Việc ngăn chặn hoặc phá vỡ liên kết giữa MGO và protein có thể có tác dụng giảm thiểu sự hình thành AGEs và ngăn chặn tác động xấu của chúng đối với cơ thể. Phép thử MGO-AGEs breaker là một cách để đánh giá khả năng của các mẫu thử trong việc giảm thiểu hoặc loại bỏ các liên kết MGO-AGEs đã hình thành. Điều này có thể thể hiện khả năng ức chế hoặc đảo ngược tình trạng tương tác không mong muốn giữa MGO và protein, từ đó có thể giúp bảo vệ các cơ quan và mô từ tác động tiêu cực của AGEs.

Trong bệnh đái tháo đường và các biến chứng, sự ly giải của AGEs có vai trò quan trọng trong quá trình điều trị. Phép thử TNBSA được sử dụng để kiểm tra khả năng phá vỡ liên kết của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic đối với các AGEs đã hình thành thông qua việc đo lường lượng glycation còn lại. Mẫu thử hoặc chứng dương được trộn với AG dung dịch MGO-BSA (1 mg/mL) và ủ trong 24 giờ. Sự giảm đáng kể của amine tự do đã được quan sát sau quá trình ủ MGO và BSA (Hình 3.23). Tuy nhiên, việc

điều trị với phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic ở liều 25 và 50 $\mu\text{g/mL}$ đã dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ amine tự do và khôi phục lại mức amine của MGO-BSA sau 24 giờ, gây ra sự phá vỡ của các AGEs. Ngoài ra, hợp chất acid syringic ở nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ đã gây ra hiệu ứng phá vỡ mạnh gần tương đương đối với AGE so với đối chứng dương AG.



Hình 3.23. Khả năng phá vỡ AGEs của các mẫu thử được nghiên cứu thông qua số lượng amine tự do sinh ra sau phản ứng MGO-BSA

Ghi chú: (N) MGO-BSA (1 mg/ml); (MPE 25) Phân đoạn EtOAc (25 $\mu\text{g/mL}$); (MPE 50) Phân đoạn EtOAc (50 $\mu\text{g/mL}$); (AP 25) Hợp chất acid protocatechuic (25 $\mu\text{g/mL}$); (AP 50) Hợp chất acid protocatechuic (50 $\mu\text{g/mL}$); (AS 25) Hợp chất acid syringic (25 $\mu\text{g/mL}$); (AS 50) Hợp chất acid syringic (50 $\mu\text{g/mL}$); (P) Aminoguanidin (1mM). Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD của ba thử nghiệm độc lập. (***) $p < 0,001$ so với nhóm N và ** $p < 0,05$ so với nhóm N).

Chương 4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của IDF dự đoán số người mắc bệnh ĐTD típ 2 sẽ tăng lên 1,31 tỷ người vào năm 2050. Bệnh ĐTD có thể sẽ là gánh nặng bệnh tật toàn cầu, và không quốc gia nào thoát khỏi đại dịch này. Các nghiên cứu mới đây cho thấy tỷ lệ đái tháo đường ở Việt Nam là 7,3%. Tần suất mắc bệnh đái tháo đường đang gia tăng rất nhanh ở nước ta nói riêng và trên thế giới nói chung. Mức độ gia tăng này vượt ra khỏi dự đoán của các tổ chức y tế. Trong đó khoảng 60% bệnh nhân chưa được chẩn đoán. So sánh giữa số liệu thống kê của năm 2002 và năm 2012 thì tỷ lệ mắc đái tháo đường ở Việt Nam tăng tới 211%. Theo kết quả điều tra quốc gia yếu tố nguy cơ bệnh không lây nhiễm tại Việt Nam năm 2015 (STEPS 2015): Tỷ lệ mắc bệnh đái tháo đường ở người trưởng thành từ 18-69 tuổi là 4,1%. Tuy nhiên, chỉ có 28,9% người mắc bệnh đái tháo đường được quản lý, có nghĩa là hầu hết người mắc căn bệnh này (hơn 70%) không được điều trị. Theo ước tính, Việt Nam có khoảng 57.200 tử vong/ 1 năm liên quan tới đái tháo đường hoặc 1.100 tử vong do đái tháo đường/1 tuần.

Tăng glucose máu mạn tính trong thời gian dài ở bệnh nhân ĐTD típ 2 gây nên những rối loạn chuyển hóa carbohydrat, protein, lipid, gây tổn thương ở nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt ở tim và mạch máu, thận, mắt, thần kinh và răng. Đặc biệt là biến chứng suy thận. Chi phí thuốc và điều trị cho người bị ĐTD và nhất là người bị ĐTD có biến chứng tăng cao- trung bình tăng gấp 2 lần/người bệnh so với điều trị bệnh nhân đái tháo đường thông thường vì các chi phí vượt trội từ việc nằm viện dài ngày, chi phí thuốc tăng, chi phí cấp cứu tăng. Phần lớn ngân sách cho điều trị đái tháo đường hiện được dùng để điều trị các biến chứng liên quan. Đặc biệt chi phí ngoài y tế cũng tạo ra gánh nặng không hề nhỏ cho xã hội (giảm năng suất lao động do biến chứng và tử vong sớm; chi phí ăn uống, đi lại, thực phẩm bổ sung, người chăm sóc...). Vì vậy, việc nghiên cứu và tìm ra những thuốc, dược liệu có tác dụng điều trị và ngăn ngừa các biến chứng ở bệnh nhân ĐTD típ 2 đặc biệt rất quan trọng và có ý nghĩa thực tiễn.

Cây Xấu hổ là một dược liệu mọc hoang ở nhiều vùng của nước ta và đã được chứng minh sơ bộ là có khả năng làm giảm đường huyết, và có tác dụng

trong điều trị bệnh đái tháo đường. Tuy nhiên, cơ chế tác dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường và thành phần hóa học của cây Xấu hổ chưa được làm sáng tỏ. Do đó, nghiên cứu này đã đánh giá tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm và nghiên cứu sơ bộ cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ *in vitro* và *in silico*.

4.1. Về tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm:

4.1.1. Về đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết toàn phần và các phân đoạn của cao chiết lá cây Xấu hổ theo phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT)

Nhằm tìm ra phân đoạn có tác dụng tốt nhất trên đường huyết chuột và tiến tới phân lập các hoạt chất có tác dụng trên dược liệu lá cây Xấu hổ, chúng tôi sử dụng phương pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) để đánh giá tác dụng hạ glucose huyết của các phân đoạn cao chiết, bao gồm cao chiết toàn phần ethanol: n- hexan, ethyl acetat, butanol. Dung môi ethanol 80⁰ được lựa chọn để chiết xuất thu được cao chiết còn toàn phần MP dùng cho các thí nghiệm. Dung môi này có khả năng hòa tan chọn lọc các hợp chất hóa học có trong lá cây Xấu hổ như: các phenol, các flavonoid, tanin... là các hợp chất có tiềm năng trong việc thể hiện tác dụng hạ glucose huyết, ngăn ngừa các biến chứng của bệnh ĐTĐ, đặc biệt là biến chứng nguy hiểm như: bệnh thận ĐTĐ. Từ cao chiết tổng MP dùng các dung môi có độ phân cực cao hơn để tách chiết chọn lọc các hoạt chất có trong lá cây Xấu hổ để được các phân đoạn cao chiết với dung môi Butanol là **MP- B**; dung môi n-Hexan là **MP-H**; dung môi EtOAc là **MP- E**, cao chiết tổng và các cao phân đoạn được dùng trong các thí nghiệm *in vitro* để khẳng định tác dụng của dược liệu.

Về động vật thí nghiệm: Động vật được sử dụng trong nghiên cứu là chuột nhắt trắng chủng Swiss, giống đực, trưởng thành, khỏe mạnh, khối lượng 20 ± 2 g do Viện vệ sinh dịch tễ trung ương cấp. Chuột được nuôi ổn định 7 ngày

trước khi tiến hành nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn do Viện vệ sinh dịch tễ trung ương cấp, uống nước theo nhu cầu. Luận án đã lựa chọn chuột nhắt do dễ thực hiện các thao tác kỹ thuật hơn, đồng thời phù hợp với các thiết kế thí nghiệm sẵn có tại Bộ môn Dược lý- Đại học Y Dược Đại học Quốc gia và phù hợp với nguyên tắc đạo đức trong sử dụng động vật thí nghiệm.

Về việc lựa chọn thử nghiệm OGTT

Nhóm nghiên cứu lựa chọn thử nghiệm OGTT để tiến hành đánh giá tác dụng hạ đường huyết của các phân đoạn cao chiết lá cây Xấu hổ. OGTT là một trong những xét nghiệm quan trọng để chẩn đoán ĐTĐ. Nhiều nghiên cứu trước đây đã sử dụng thử nghiệm OGTT để xác định tác dụng của các mẫu thử trên đường huyết của chuột [128], [129], [130], [131]. Đây là phương pháp được sử dụng để phát hiện những sự rối loạn trong quá trình chuyển hóa glucose, có thể liên quan đến đái tháo đường hoặc hội chứng chuyển hóa. Do đó nhóm nghiên cứu đã lựa chọn thử nghiệm OGTT để so sánh tác dụng hạ đường huyết trên các phân đoạn cao chiết của lá cây Xấu hổ.

Về việc lựa chọn liều thử nghiệm

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh cao chiết ethanol của cây Xấu hổ ở các liều 50 mg/kg, 100 mg/kg và 150 mg/kg có tác dụng hạ đường huyết trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ [132]. Trong nghiên cứu sàng lọc sơ bộ trước đây của nhóm nghiên cứu chúng tôi cho thấy trong các mức liều cao toàn phần MP sử dụng các mức liều từ 50 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 300 mg/kg và 500 mg/kg để tìm kiếm mức liều cho tác dụng hạ đường huyết, thì mức liều 100 mg/kg thể hiện tác dụng tốt hơn so với các mức liều khác. Do đó, ở nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thử nghiệm OGTT lần thứ nhất nhóm nghiên cứu chọn liều 100 mg/kg để tiến hành đánh giá cho cao ethanol và các phân đoạn. Ở thử nghiệm OGTT lần thứ nhất nhóm nghiên cứu chọn liều 100 mg/kg để tiến hành đánh giá cho cao ethanol và các phân đoạn. Sau khi đã chọn ra phân đoạn có tác dụng tốt nhất trên glucose máu chuột, nhóm tiến hành thử nghiệm OGTT lần hai với phân đoạn tốt nhất đó với 100 mg/kg và một liều thấp hơn là 50 mg/kg.

Về kết quả thử nghiệm OGTT

Trong thử nghiệm này, nhóm nghiên cứu sử dụng liều 100 mg/kg cho cao toàn phần và các phân đoạn của cao chiết lá cây Xấu hổ cho thử nghiệm OGTT trên chuột. Glucose huyết của chuột được lấy tại các thời điểm 0, 60 và 120 phút. Kết quả cho thấy cao ethanol toàn phần và phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ có tác dụng hạ glucose máu tốt sau 120 phút khi so sánh với nhóm chứng trắng, với tỉ lệ giảm tương ứng 17,04% và 23,67% ($p < 0,001$); trong khi đó, ở các phân đoạn còn lại thì sự thay đổi đường huyết sau 120 phút là không đáng kể khi so với nhóm chứng.

Nghiên cứu của Rita Maneju Sunday và cộng sự (2019) về tác dụng của dịch chiết ethanol và các phân đoạn của hạt cây Xấu hổ đã cho thấy, phân đoạn ethyl acetat làm giảm đường huyết lúc đói trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ tốt hơn khi so sánh với cao ethanol toàn phần và các phân đoạn khác [133]. Một nghiên cứu về tổng hàm lượng các hợp chất phenol và flavonoid trong lá cây Xấu hổ đã được tiến hành. Kết quả thu được cho thấy, phân đoạn ethylacetat có hàm lượng phenolic và flavonoid cao hơn so với các chiết xuất khác [134]. Từ kết quả của nhóm nghiên cứu và những kết quả của các tác giả trước đây, chúng tôi quyết định lựa chọn phân đoạn EtOAc để tiến hành tiếp những thí nghiệm tiếp theo.

Trong thử nghiệm OGTT lần thứ hai, nhóm nghiên cứu tiến hành xác định các mức liều phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ có tác dụng hạ glucose huyết trên chuột thí nghiệm. Hai mức liều được lựa chọn là 50 mg/kg và 100 mg/kg. Sau 120 phút thí nghiệm, đường huyết ở cả hai nhóm chuột được uống cao phân đoạn EtOAc 50 mg/kg và 100mg/kg đều đã giảm đáng kể lần lượt 20,39% và 24,75% so với nhóm chứng trắng ($p < 0,001$). Như vậy, phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg và 100 mg/kg có tác dụng tốt trên đường huyết của chuột thí nghiệm.

Từ kết quả của thử nghiệm OGTT trên chuột, nhóm nghiên cứu đã quyết định lựa chọn hai mức liều 50 mg/kg và 100 mg/kg của phân đoạn EtOAc của

cao chiết lá cây Xấu hổ để tiến hành thử nghiệm tiếp theo được tiến hành trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ và chế độ ăn giàu béo.

4.1.2. Về kết quả tác dụng và cơ chế tác dụng của phân đoạn EtOAc trên mô hình gây bệnh ĐTĐ típ 2 trên chuột

Đái tháo đường được định nghĩa là bệnh rối loạn chuyển hóa, có đặc điểm tăng glucose huyết mạn tính do khiếm khuyết về tiết insulin, về tác động của insulin, hoặc cả hai [6].

Về lựa chọn thuốc chứng dương

Thuốc chứng dương được lựa chọn thuộc nhóm sulfonyleurea, là nhóm thuốc kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin. Cơ chế tác dụng của thuốc là gắn vào receptor SUR trên màng tế bào β , làm đóng kênh K^+_{ATP} dẫn đến khử cực màng tế bào, dòng Ca^{2+} đi vào kích thích tiết insulin [6], 38, [135]. Sulfonyleurea nói chung là một thuốc tiêu chuẩn trong điều trị ĐTĐ típ 2 ở người. Nhiều nghiên cứu được thực hiện trước đây trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ đã sử dụng thuốc nhóm sulfonyleurea như một thuốc chứng dương để so sánh [136], [137, 138], [128]. Trên cơ sở sự tương tự về cơ chế tác dụng và những nghiên cứu tương tự trước đây, nhóm nghiên cứu chọn nhóm sulfonyleurea làm chứng dương cho thí nghiệm đánh giá tác dụng hạ đường huyết của phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

Gliclazid là một sulfonyleurea thế hệ 2, có tác dụng hạ đường huyết gấp 100 lần so với các sulfonyleurea thế hệ 1 [139]. Các nghiên cứu cũng đã chỉ ra không có sự khác biệt giữa tác dụng hạ glucose máu ở bệnh nhân ĐTĐ típ 2 của gliclazid và các thuốc sulfonyleurea khác như glibenclamid [140], ngoài ra, gliclazid cũng vượt trội hơn glipirid và chlorpropamid trong việc kiểm soát HbA1c [141]. Với giá thành rẻ và sẵn có, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn gliclazid (Diamicon MR 60mg) làm thuốc chứng dương trong nghiên cứu này. Về liều dùng chúng tôi sử dụng gliclazid 5 mg/kg thể trọng chuột cũng tương đồng với một số công bố trước đây. Cụ thể, tác giả Muhammad Abdurrazak và cộng sự sử dụng liều 5 mg/kg thể trọng chuột nhắt [142] và trên chuột cống, một tác giả

khác là Abdelkader N F cộng sự và sử dụng liều 10 mg/kg thể trọng [143]. Tuy nhiên, cũng có một số nghiên cứu sử dụng glyclazid ở mức liều cao hơn.

Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn mô hình dinh dưỡng giàu chất béo kết hợp với tiêm streptozotocin liều 50 mg/kg để gây ĐTĐ típ 2 ở chuột. Trên thực nghiệm, kết quả của nhóm nghiên cứu cho thấy, sau 60 ngày thí nghiệm, nồng độ glucose máu, TC, TG và LDL-C máu đều tăng đáng kể so với nhóm chứng sinh lý. Từ kết quả định lượng glucose máu cho thấy, sau 60 ngày điều trị, phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm nồng độ glucose máu so với nhóm chuột không được điều trị. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác. Trong các nghiên cứu trước đây, các cao chiết với các dung môi khác nhau của cây Xấu hổ cũng cho tác dụng tốt trên glucose máu của chuột thực nghiệm. Piyapong Ypparat và cộng sự (2017) đã kết luận rằng cao chiết ethanol của cây Xấu hổ với liều 500 mg/kg làm giảm đáng kể đường huyết sau 8 tuần điều trị trên chuột bị ĐTĐ típ 2. Nghiên cứu trên cũng cho rằng cơ chế gây hạ đường huyết của cao chiết ethanol của cây Xấu hổ là do các thành phần trong cao chiết như kaempferol và stigmasterol và flavonoid với hoạt tính chống oxy hóa cao giúp tái tạo tế bào β đảo tụy, do đó kích thích bài tiết insulin [128]. Nghiên cứu của T Amalraj và cộng sự (2002) tiến hành đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol của lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm, kết quả cho thấy rằng, với liều 250 mg/kg, cao chiết ethanol của lá cây Xấu hổ cho tác dụng hạ glucose máu đáng kể [144]. Một nghiên cứu khác của tác giả Deepa Rajendiran (2017) cũng cho kết quả tương tự với liều 300 mg/kg cao chiết ethanol lá của cây Xấu hổ. Trong nghiên cứu này, tác giả cũng chỉ ra rằng, việc điều trị bằng cao chiết ethanol của lá cây Xấu hổ cho chuột bị ĐTĐ típ 2 làm gia tăng đáng kể các enzym đường phân như hexokinase, phosphofructokinase và pyruvat kinase và giảm hoạt động của các enzym tân tạo đường như glucose-6-phosphatase và fructose 1, 6-bisphosphat, nhờ đó làm giảm nồng độ glucose huyết [145]. Nghiên cứu của Viswanathan R và cộng sự (2013) cho kết quả là cao chiết methanol của cây Xấu hổ với liều 100mg/kg và 200mg/kg có khả năng

làm giảm đường huyết trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 gây ra bởi alloxan. Nguyễn Thị Huyền và cộng sự (2019) đã tiến hành nghiên cứu đánh giá tác dụng của cao chiết nước lá cây Xấu hổ. Nghiên cứu này đã cho thấy với liều 150 mg/kg và 300 mg/kg, cao chiết nước cây Xấu hổ có khả năng làm giảm glucose đáng kể glucose máu ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ [146]. Nghiên cứu của Rita Maneju Sunday và cộng sự (2019) về tác dụng của dịch chiết ethanol và các phân đoạn của hạt cây Xấu hổ đã cho thấy, phân đoạn ethylacetat làm giảm đường huyết lúc đói trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ tốt hơn khi so sánh với cao ethanol toàn phần và các phân đoạn khác. Tác dụng làm tăng bài tiết insulin và α – amilase cũng được chỉ ra trong nghiên cứu và được kết luận là cơ chế làm giảm nồng độ glyucose máu trên chuột bị ĐTĐ típ 2 [133].

Liên quan đến kết quả lipid máu:

Insulin liên quan đến quá trình chuyển hóa lipid bằng cách điều chỉnh hoạt động của lipoprotein lipase (LPL) ở các mức độ bao gồm biểu hiện gen, tổng hợp và bài tiết protein, và LPL bị giảm trong tình trạng kháng insulin ở những người mắc bệnh ĐTĐ típ 2 từ đó dẫn đến tăng nồng độ LDL - C, TG và giảm HDL-C [147], [148]. Tỷ lệ rối loạn lipid máu rất phổ biến ở bệnh nhân ĐTĐ típ 2 [149] và những rối loạn này có khả năng thúc đẩy tình trạng xơ vữa động mạch ở các bệnh nhân này [150]. Rối loạn lipid máu là một yếu tố nguy cơ quan trọng trong việc thúc đẩy nguy cơ tim mạch ở bệnh nhân ĐTĐ [151]. Do đó, việc khảo sát tác dụng của các thuốc điều trị ĐTĐ típ 2 trên cải thiện nồng độ lipid máu là cần thiết. Trong nghiên cứu này, glyclazid được sử dụng làm chứng dương. Kết quả về glyclazid của chúng tôi có sự tương đồng với một số công bố trước đây. Cụ thể, kết quả của nhóm nghiên cứu H. Lu và cộng sự cũng cho thấy glyclazid có tác dụng hạ cholestrol toàn phần và triglycerid [152]. Ngoài ra, Luo-sheng Wan và cộng sự cũng cho thấy glyclazid làm giảm nồng độ TG, TC, LDL và tăng nồng độ HDL trên chuột nhắt bị gây đái tháo đường bằng tiêm STZ và chế độ ăn giàu chất béo [153]. Jamel El Ghoul và cộng sự cũng cho thấy glyclazid làm giảm nồng độ TG, TC, LDL, VLDL và tăng nồng độ HDL trên

chuột nhất bị gây đái tháo đường bằng tiêm STZ và chế độ ăn giàu chất béo so với nhóm chứng bệnh có ý nghĩa thống kê [154].

Kết quả của luận án này đã cho thấy, sau 60 ngày điều trị, phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày có khả năng tăng HDL-C khi so sánh với nhóm bệnh lý. Ở mức liều cao hơn 100 mg/kg/ngày, ngoài làm tăng HDL-C, phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ còn có khả năng giảm CT, TG và LDL-C khi so sánh với nhóm bệnh lý. Kết quả của nhóm nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu Piyapong Ypparat và cộng sự (2017), nồng độ glucose máu trên mô hình chuột gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ được cải thiện đáng kể: tăng HDL-C và giảm TC, TG và LDL-C khi điều trị bằng cao chiết ethanol của cây Xấu hổ liều 500 mg/kg [128]. Năm 2017, Antony P.J đã tiến hành nghiên cứu tác dụng của myoinositol phân lập từ dịch chiết methanol của cây Xấu hổ trên mô hình chuột ĐTĐ típ 2 nhờ chế độ ăn giàu chất béo và STZ và gây rối loạn lipid máu bởi Trion WR -1339. Kết quả cho thấy với liều 25 mg/kg và 50 mg/kg, myoinositol có khả năng làm giảm đáng kể TC, TG, LDL-C và tăng HDL-C [155].

Về kết quả liên quan đến các chỉ số chức năng thận, bao gồm microalbumin niệu, creatinin máu, creatinin niệu, hệ số thanh thải creatinin

Bệnh thận mạn ĐTĐ được phân loại thành các giai đoạn dựa trên giá trị albumin được bài tiết qua nước tiểu. Microalbumin niệu dự đoán sự phát triển của bệnh thận do đái tháo đường ở bệnh nhân ĐTĐ, đặc biệt rõ ràng hơn ở bệnh ĐTĐ típ 2 [156]. Microalbumin niệu cũng là một yếu tố nguy cơ đáng kể gây tử vong tim mạch ở bệnh ĐTĐ típ 2 [157]. Nó không chỉ là dấu hiệu ban đầu của bệnh thận đái tháo đường mà còn là của một loạt các biến chứng ĐTĐ khác và cần được xử lý sớm bằng cách kiểm soát chặt chẽ tình trạng tăng đường huyết và tăng huyết áp của bệnh nhân để giúp ngăn ngừa các biến chứng trong tương lai. Một số nghiên cứu khác cũng kết luận rằng, có mối liên hệ giữa việc kiểm soát đường huyết và albumin niệu vi lượng [158, 159]. Creatinin là sản phẩm phân hủy của creatin phosphat trong cơ, và thường được cơ thể sản xuất với tốc độ khá ổn định tùy thuộc vào khối lượng cơ [160], được lọc qua cầu thận, không

tái hấp thu ở ống thận và được thải ra nước tiểu. Độ thanh thải creatinin (CrCl) là thể tích huyết tương được thanh thải creatinin trên một đơn vị thời gian. Xét nghiệm CrCl được dùng để theo dõi sự tiến triển của bệnh thận [161].

Kết quả cho thấy, sau 60 ngày, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 có nồng độ microalbumin niệu cao hơn chuột sinh lý. Sau khi được điều trị bằng phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ microalbumin niệu giảm đáng kể so với nhóm chuột bệnh lý. Như vậy, có thể thấy, phân đoạn EtOAc cao chiết lá cây Xấu hổ không những chỉ có tác dụng tốt trên đường huyết mà còn có khả năng giảm microalbumin niệu trên mô hình chuột bị ĐTĐ típ 2 do STZ. Do đó, có thể góp phần vào cải thiện biến chứng thận do ĐTĐ típ 2 trên chuột cũng như cho thấy rằng chuột đang được kiểm soát đường huyết tốt. Sau 60 ngày, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ có nồng độ creatinin máu cao hơn nhóm chuột sinh lý với tỉ lệ là 26,4% (với $p < 0,05$). Tuy nhiên, nhóm chuột được điều trị với phân đoạn EtOAc với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ creatinin máu đã giảm đáng kể với tỉ lệ lần lượt là 20,2% và 18,4% ($p < 0,05$). Ngược lại, điều trị bằng phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ, nồng độ creatinin niệu và hệ số thanh thải creatinin đã tăng lên đáng kể khi so sánh với nhóm chuột bệnh lý. Cụ thể, với liều 50mg/kg /ngày, nồng độ creatinin niệu và hệ số thanh thải creatinin đã tăng lần lượt 10,6% và 50,6% so với nhóm chuột không được điều trị ($p < 0,05$). Ở liều gấp đôi là 100 mg/kg/ngày, tỉ lệ tăng các giá trị trên là 23,7 và 72,1% ($p < 0,05$). Sau khi chuột được điều trị với phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ, các chỉ số nước tiểu chuột đã được cải thiện đáng kể so với nhóm chứng bệnh lý. Điều này có thể kết luận rằng phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ có tiềm năng trong việc cải thiện chức năng thận trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ. Tuy nhiên, trong thiết kế nghiên cứu, chúng tôi sử dụng lồng tự thiết kế để có thể hứng lượng nước tiểu của chuột để đánh giá các chỉ số liên quan đến creatinin niệu, microalbumin niệu, do đó sẽ có một số sai số nhất định ảnh hưởng đến việc thu thập lượng nước tiểu, phân, lượng thức ăn tiêu thụ. Đây cũng là một trong những hạn chế của nghiên cứu này.

Về kết quả liên quan đến chống viêm và các cytokin viêm

Các cytokin gây viêm được sản xuất bởi các tế bào khác nhau và được bài tiết vào vòng tuần hoàn [162]. Các cytokin viêm như TNF- α và IL-6 có thể thay đổi độ nhạy insulin bằng cách kích hoạt các bước quan trọng khác nhau trong con đường truyền tín hiệu insulin. Những cytokin này kích thích sự phosphoryl hóa serin tồn dư thay vì tyrosin trong chất nền thụ thể insulin-1 (IRS1), do đó ngăn chặn sự kích hoạt tín hiệu insulin [163]. Tăng các dấu hiệu viêm như protein C phản ứng, IL-1, IL-6, và TNF- α ...có liên quan đến sự phát triển của bệnh thận, bệnh vông mạc và bệnh tim mạch ở bệnh nhân đái tháo đường [164]. Các cytokin viêm cũng được cho là ảnh hưởng đến các chức năng cầu thận thông qua sự thay đổi tính thấm thành mạch, cơ chế giãn mạch và co mạch, chất nền ngoại bào và sự gia tăng của trung mô, nội mô, và tế bào cơ trơn mạch máu, cũng như cảm ứng gây độc tế bào, quá trình apoptosis, và hoại tử trong cơ chế bệnh sinh và sự tiến triển của bệnh thận mạn do ĐTD [165]. Do đó tiến hành định lượng cytokin viêm ở thận có thể cho thấy chức năng thận của chuột. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành định lượng TNF- α và IL-1 β .

Để đánh giá tình trạng viêm trên mô hình chuột bị ĐTD típ 2 bởi STZ, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá nồng độ của hai cytokin viêm là TNF- α và IL-1 β . Kết quả thu được sau 60 ngày điều trị bằng phân đoạn EtOAc cây Xấu hổ cho thấy nồng độ TNF- α và nồng độ IL-1 β đã được cải thiện khi điều trị ở hai mức liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày khi so sánh với nhóm chuột bệnh lý. Trong dân gian, cây Xấu hổ được sử dụng như một dược liệu để điều trị nhiều bệnh lý khác nhau trong đó tác dụng chống viêm [166]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng chỉ ra rằng trong dịch chiết cây Xấu hổ có thành phần có tác dụng chống viêm. Năm 2012, Vikram và cộng sự đã tiến hành một nghiên cứu đánh giá tác dụng chống viêm của dịch chiết ethanol của lá cây Xấu hổ. Kết quả của nghiên cứu cho thấy với liều 250 mg/kg và 500 mg/kg, dịch chiết ethanol của lá cây Xấu hổ cho kết quả chống viêm tương đương với indomethacin [167]. Các thành phần hóa học chịu trách nhiệm cho tác dụng chống viêm của cây Xấu hổ đã được tìm ra. Patel N.K và cộng sự (2014) đã tiếp tục nghiên cứu của họ và

phân lập 14 hợp chất từ dịch chiết ethyl acetat của cây Xấu hổ trên quá trình sản xuất các chất trung gian gây viêm như NO, TNF- α và IL1- β đã chỉ ra rằng các hợp chất L-mimosin, crocetin, crocin, acid jasmonic, ethyl gallat, acidgallic, acid caffeic từ dịch chiết ethyl acetat đóng vai trò quan trọng trong tác dụng chống viêm của cây Xấu hổ trên cả *in vitro* và *in vivo* thông qua việc giảm các chất trung gian gây viêm từ lipopolysaccharid [168]. Một hoạt chất khác là 2'-hydroxy flavanon được phân lập từ cây Xấu hổ và các dẫn chất của nó có tác dụng ức chế nồng độ TNF- α và IL1- β trên chuột thực nghiệm [169].

Về kết quả liên quan đến tác động lên quá trình stress oxy hóa:

Stress oxy hóa thận được xem là một trong những yếu tố góp phần vào sự phát triển của bệnh thận ĐTĐ [170]. Sự gia tăng nồng độ glucose máu thúc đẩy stress oxy hóa trong các mô thông qua việc tăng các gốc ROS thông qua chuỗi truyền điện tử ty thể. Sau quá trình chuyển hóa, sự oxy hóa các acid béo không bão hòa tạo ra các sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxyd hóa acid là: 4-hydroxy-nonenal (HNE), 4-oxy-2-nonenal (ONE) và malonyldialdehyd (MDA). Ở chuột bị ĐTĐ, có sự gia tăng đáng kể của các chỉ số stress oxy hóa ở thận [171]. Cùng với sự gia tăng tạo ROS, sự suy giảm việc hình thành các chất chống oxy hóa nội sinh, cụ thể là superoxyd dismutase (SOD), giảm glutathion (GSH) và acid ascorbic, và giảm khả năng chống oxy hóa của acid uric và vitamin E, cũng như giảm hoạt động của glutathion peroxydase (GPx) và catalase (CAT) đã được ghi nhận trong ĐTĐ [172]. Các marker sinh học của quá trình stress oxy hóa có thể kể tới: MDA (được sử dụng để đo mức độ peroxy hóa lipid), vitamin, glutathion (glutathion peroxydase và Glutathion reductase), CAT, SOD... [107].

Theo kết quả của nhóm nghiên cứu, sau 60 ngày điều trị bằng phân đoạn EtOAc cao chiết lá của cây Xấu hổ liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày, nồng độ peroxy hóa lipid ở chuột đã giảm đáng kể so với nhóm chuột bệnh lý, nồng độ SOD nồng độ CAT và GPx đã tăng đáng kể khi so sánh với nhóm chuột bệnh lý. Nghiên cứu của Ganesh Patro và cộng sự (2016) đã cho kết quả dịch chiết ethyl acetat của cây Xấu hổ với liều 200mg/kg và 400mg/kg làm tăng đáng

kể nồng độ các chất chống oxy hóa SOD, CAT và GPx, đồng thời liều 400 mg/kg làm giảm đáng kể peroxy hóa lipid trên mô não chuột thực nghiệm [134]. Nghiên cứu của Jagdeep Kaur và cộng sự (2016) cũng cho kết quả là dịch chiết ethanol của lá cây Xấu hổ liều 400 mg/kg có tác dụng giảm peroxy hóa lipid khi giảm nmol MDA/mg protein trên chuột bị gây viêm tụy do L-arginin sau 14 ngày điều trị khi so với nhóm đối chứng [173]. Nghiên cứu của Wahjuni S và cộng sự (2021) cho thấy liều 50 mg/kg và 100mg/kg của dịch chiết ethanol của lá cây Xấu hổ có khả năng làm giảm MDA trên chuột bị ĐTĐ típ 2 do STZ [132]. Như vậy theo kết quả thu được, phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có khả năng cải thiện tình trạng stress oxy hóa ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ và chế độ ăn giàu béo.

Về kết quả liên quan đến giải phẫu mô bệnh học thận:

Để quan sát những thay đổi trên cấu trúc vi thể thận dưới tác động của cao chiết phân đoạn EtOAc Cây Xấu hổ, giải phẫu mô bệnh học thận được tiến hành. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tiêu bản vi thể của mô thận ở chuột bị ĐTĐ típ 2 có nhiều tổn thương thận như: cầu thận bị thoái hóa kính, màng đáy dày, ít tế bào nội mô; thoái hóa mỡ ở ống thận và viêm ở các tế bào tổ chức kẽ xâm nhập. Các tiêu bản vi thể thận của nhóm điều trị bằng gliclazid và phân đoạn EtOAc của lá cây Xấu hổ đều cho kết quả tương tự nhưng mức độ nhẹ hơn. Nghiên cứu của Antony P J và cộng sự (2017) đã tiến hành đánh giá mức độ tổn thương vi thể thận trên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ khi được điều trị bằng myoinositol được chiết xuất từ dịch chiết ethanol của cây Xấu hổ. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, chuột bị gây ĐTĐ típ 2 có kích thước cầu thận giảm cùng với sự mở rộng tế bào mesangial và teo ống. Điều trị bằng myoinositol cho thấy cải thiện kích thước cầu thận và các cấu trúc mạch máu [155]. Như vậy, kết quả của nhóm nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Điều này cho thấy, phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có khả năng cải thiện tổn thương thận ở chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ và chế độ ăn giàu béo.

4.2. Về cơ chế tác dụng chống đái tháo đường của cao chiết và hai hợp chất chiết xuất từ lá cây Xấu hổ *in vitro* và *in silico*

4.2.1. Về cơ chế tác dụng ức chế hai enzym α -glucosidase và PTP-1B của hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic từ phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ về khả năng hạ glucose huyết trên mô hình *in vitro* và *in vivo*. Kết quả thử nghiệm *in vitro* và trên mô hình *in silico* cho thấy cả hai hợp chất đều có hoạt tính ức chế α -glucosidase và PTP-1B. Cả hai hợp chất có thể được coi là hợp chất đầy hứa hẹn trở thành thuốc ngăn ngừa điều trị đái tháo đường típ 2. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Protein tyrosin phosphatase 1B (PTP-1B) là một phosphatase không xuyên màng, thuộc họ enzym PTP và được biểu hiện cao trong các mô đích của insulin như gan, cơ và mỡ [174]. PTP-1B xúc tác quá trình khử phospho của thụ thể insulin được kích hoạt và do đó điều chỉnh giảm tín hiệu insulin, ngoài ra, nó cũng làm giảm tín hiệu leptin và góp phần gây béo phì và rối loạn chuyển hóa [175]. Do đó, ức chế PTP-1B là một phương pháp đầy hứa hẹn để điều trị bệnh đái tháo đường loại 2 và ngăn ngừa béo phì [176]. Ngoài ra, α -glucosidase nằm trong màng tế bào ruột, tham gia vào bước cuối cùng của quá trình tiêu hóa carbohydrat. Do đó, các chất ức chế α -glucosidase sẽ làm giảm hấp thu glucose từ đường tiêu hóa vào máu [177]. Các chất ức chế α -glucosidase đã được sử dụng làm thuốc trong lâm sàng để điều trị bệnh đái tháo đường loại 2 như acarbose, miglitol, voglibose [178].

Yeon Sil Lee và cộng sự đã phân lập được acid protocatechuic từ nấm Thượng hoàng (*Phellinus linteus*) và cho thấy rằng nó có hoạt tính ức chế mạnh PTP-1B với giá trị IC_{50} là $52,9 \pm 3,6 \mu M$ [179]. Paulina Ormazabal đã chỉ ra rằng acid protocatechuic có thể làm giảm hoạt động PTP-1B trong mô mỡ nội tạng ở đối tượng béo phì và do đó ngăn ngừa tình trạng kháng insulin và giảm viêm [180]. Adefegha và cộng sự cho thấy acid protocatechuic có tác dụng chống oxy hóa và hỗ trợ điều trị đái tháo đường. Kết quả của nhóm tác giả này

cho thấy acid protocatechuic có thể ức chế mạnh α -glucosidase và α -amylase với giá trị IC_{50} lần lượt là 1,76 μ g/mL và 1,12 μ g/mL [181]. Tác dụng này có thể là do nhóm hydroxyl trên cấu trúc của acid protocatechuic. Tương tự, Abdulwali Ablat và cộng sự đã chứng minh rằng acid protocatechuic có thể ức chế enzym α -glucosidase với giá trị IC_{50} là $368,74 \pm 0,13$ μ M [182]. Tác giả Mai và cộng sự cũng báo cáo acid protocatechuic có hoạt tính ức chế mạnh enzym α -glucosidase với giá trị IC_{50} là $45,32 \pm 0,18$ μ M trong nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase của cây thuốc Việt Nam [183].

Các nghiên cứu trước đây cũng báo cáo rằng acid syringic ức chế enzym α -glucosidase [184-186]. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy acid syringic ức chế enzym α -glucosidase *in vitro*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các với báo cáo trước đó. Ganiyu Oboh đã cho thấy cao chiết giàu các hợp chất phenolic của lá và quả cây Bơ (*Persea americana*), trong đó acid syringic là hợp chất chính, ức chế mạnh α -glucosidase [187]. Young I K đã chỉ ra rằng acid protocatechuic và acid syringic cũng thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase đáng kể [188]. Ngoài ra, Jun H C đã chứng minh rằng acid syringic có thể làm giảm mức độ biểu hiện PTP-1B trong hoạt hóa tiểu cầu bằng epinephrine kết hợp với collagen *in vivo* và sau đó làm giảm sự hình thành cục máu đông và thuyên tắc huyết khối cấp tính [189]. Tuy nhiên, Mi Hee Woo đã phân lập được acid syringic từ rễ cây Dây răng ngựa (*Kadsura coccinea*) và cho thấy nó có hoạt tính ức chế PTP-1B với IC_{50} trên 100 μ M [190].

Nghiên cứu trên mô hình *in silico* đã cho thấy rằng chúng có hoạt tính ức chế mạnh α -glucosidase và PTP-1B, là các enzym mục tiêu liên quan đến bệnh đái tháo đường. Acid protocatechuic cho thấy khả năng giống thuốc điều trị ĐTDĐ cao hơn acid syringic. Ngoài ra, phương pháp docking phân tử đã dự đoán các tương tác có thể xảy ra trong các vị trí hoạt động của α -glucosidase và PTP-1B của hai hợp chất. Quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski cho thấy cả 2 hợp chất đều có đặc tính giống thuốc. Dự đoán ADMET và kết quả mô phỏng động lực học phân tử cho biết acid protocatechuic và acid syringic có khả năng trở thành thuốc với ổn định tương đối.

4.2.2. Về tác dụng và cơ chế tác dụng bảo vệ tế bào khi nồng độ đường huyết tăng cao của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất theo cơ chế giảm tác dụng độc tính của MGO

Tình trạng tăng đường huyết mạn tính trong đái tháo đường gây ra những độc tính nghiêm trọng trên tế bào, kích hoạt sự chết theo chu trình của tế bào và là nguyên nhân dẫn đến những biến chứng nguy hiểm của căn bệnh này. Kiểu hình biệt hóa của tế bào β được duy trì nhờ sự kích thích sinh lý ổn định của glucose, và độc tính với glucose (glucotoxicity) được định nghĩa là tác động độc hại lên kiểu hình của tế bào β khi tiếp xúc kéo dài hoặc liên tục với nồng độ glucose cao trong các nghiên cứu *in vitro* cũng như *in vivo*. Mức tăng đường huyết ở bệnh đái tháo đường típ 2 dẫn đến nhiễm độc đường [191]. Thông qua phương pháp MTT, việc sử dụng phân đoạn EtOAc và hai hợp chất acid syringic và acid protocatechuic ở các nồng độ khác nhau cho thấy những hiệu quả đáng kể trong cải thiện tình trạng gây độc cho tế bào của MGO, tác nhân chính xuất hiện ở các quá trình sản sinh AGEs khi glucose tăng trong một thời gian dài.

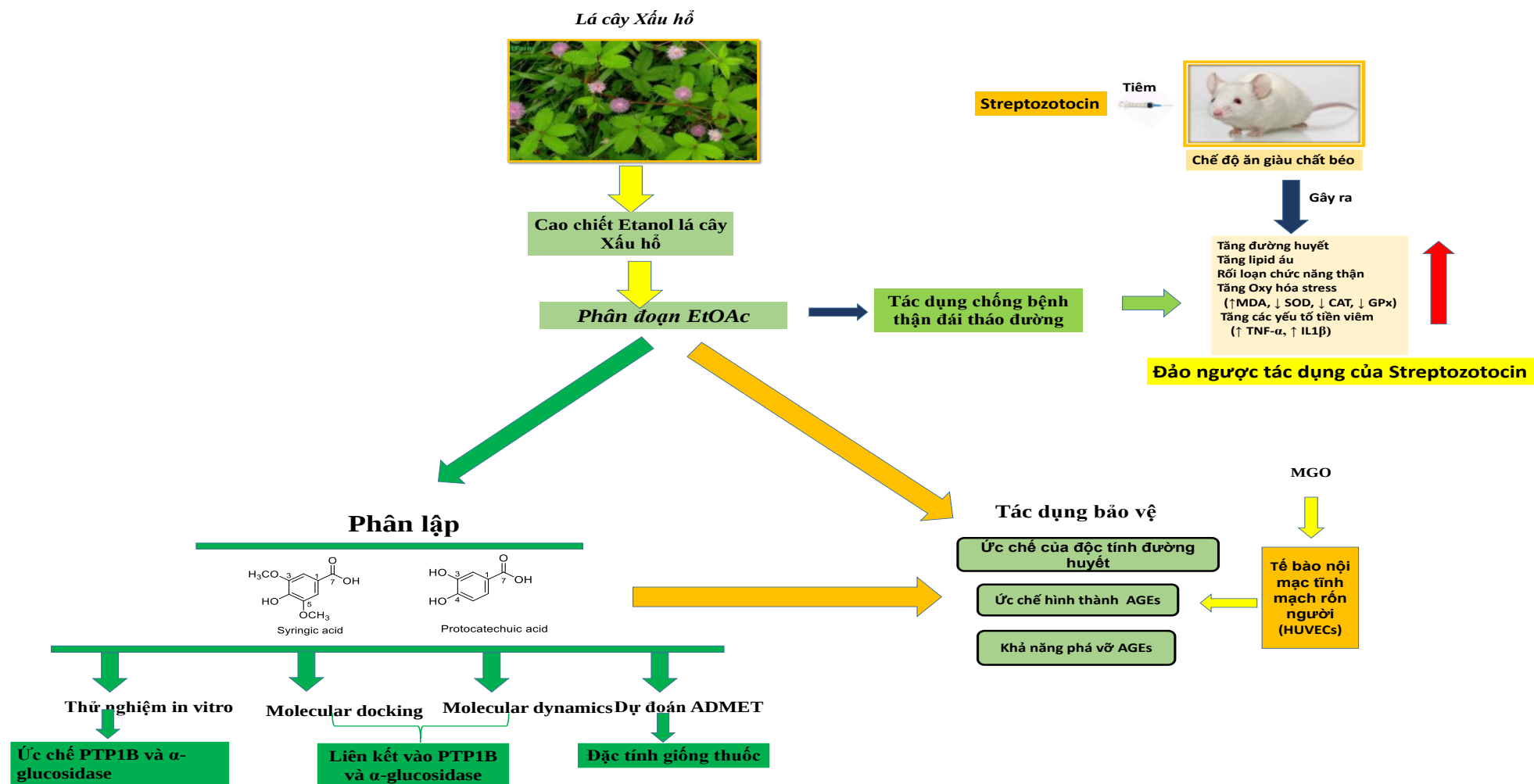
Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy cao chiết MP có tác dụng điều trị bệnh đái tháo đường trên các mô hình gây bệnh đái tháo đường típ 2 do alloxan hoặc streptozotocin, cao chiết MP làm giảm mức đường huyết, insulin và lipoprotein huyết tương [192-195]. Tiến trình sản xuất và tích lũy AGEs được quan sát thấy trong quá trình lão hóa cũng như bệnh đái tháo đường với tốc độ nhanh. Các nghiên cứu cho thấy sự tương tác giữa AGEs và thụ thể AGEs (RAGE) đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của các biến chứng mạch máu ở bệnh đái tháo đường do quá trình tạo stress oxy hóa trong các loại tế bào khác nhau liên quan đến kích thích viêm mạch máu, huyết khối và kích hoạt tiểu cầu. Ngoài ra, AGEs có thể chịu trách nhiệm đến sự ổn định fibrin và kết tập tiểu cầu, dẫn đến khuynh hướng hình thành huyết khối và do đó thúc đẩy bệnh vông mạc ở bệnh đái tháo đường. Hơn nữa, sự tích tụ AGEs như pentosidin, malonyldialdehyd, lysin và carboxymethyl lysin (CML) trong màng đáy cầu thận dày lên, chất nền trung mô mở rộng và tổn thương dạng nốt của bệnh tiến triển dẫn đến tác dụng đáng chú ý của AGEs đối với

bệnh thận đái tháo đường [196]. Kết quả nghiên cứu ở luận án này cho thấy, việc điều trị bằng phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất đã ức chế sự hình thành cũng như thể hiện khả năng phá vỡ AGE-MGO. Glycation gây ra bởi MGO dẫn đến giảm các amin tự do, nhưng phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất có thể phá vỡ AGEs và do đó, làm sự gia tăng đáng kể của các amin tự do [197]. Tác dụng vượt trội của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất đối với mục tiêu AGEs góp phần giải thích cơ chế phân tử của đặc tính chống đái tháo đường của loài thực vật này. Trong nghiên cứu sàng lọc các hợp chất tự nhiên của cây Xấu hổ, chúng tôi nhận thấy có nhiều hoạt chất tự nhiên flavonoid như acid ferulic acid, apigenin, catechin, caffeic acid, naringenin, và quercetin. Các hợp chất này có thể là các hoạt chất mang lại tác dụng chống độc glucose và hình thành và tích lũy AGE của cây Xấu hổ [198]. Catechin, apigenin và quercetin xuất hiện trong cao chiết cây Xấu hổ đều được chứng minh là có khả năng bắt giữ các MGO để tạo thành phức hợp với MGO. Acid ferulic, một dẫn xuất của acid cinnamic, nổi tiếng với tác dụng chống viêm và khả năng hoạt động như chất ức chế AGEs. Acid ferulic làm giảm AGEs và làm giảm hàm lượng protein carbonyl, cấu trúc β amyloid (amyloid cross β -structure,) và fructosamin. Do đó, acid ferulic được coi là một tác nhân hiệu quả chống lại stress oxy hóa và glycation protein liên quan đến việc ngăn ngừa các bệnh lý qua trung gian AGEs trong các biến chứng đái tháo đường [199, 200]. Người ta phát hiện ra rằng apigenin có khả năng ức chế hình thành AGEs bằng cách bắt trực tiếp MGO và tạo ra phức hợp apigenin-MGO. Apigenin ức chế sự hình thành các loại gốc oxy hóa phản ứng và đẩy lùi sự biểu hiện của các phân tử bám dính và các cytokin tiền viêm, ngăn ngừa viêm và stress oxy hóa do AGEs gây ra trên tế bào HUVEC. Cơ chế bảo vệ của apigenin có thể dựa trên ức chế đường truyền tín hiệu ERK (extracellular-signal-regulated kinase) 1/2/ đường truyền yếu tố phiên mã NF- κ B, mà được kích hoạt bởi tương tác AGEs-RAGE, cũng như kích thích đường truyền ERK/chuyển đổi tác nhân (erythroid-derived 2)-like 2, dẫn đến điều chỉnh tăng biểu hiện các phân tử bảo vệ chống oxy hóa [201]. Các kết quả từ nghiên cứu của Zhu và các cộng sự cho thấy việc điều trị bằng

catechin giúp cải thiện đáng kể tình trạng rối loạn chức năng thận ở mô hình chuột mắc bệnh đái tháo đường loại 2 thông qua việc giảm sự hình thành AGEs và các cytokin tiền viêm do trung hòa các MGO. Hơn nữa, các tế bào nội mô trong điều kiện đường huyết cao được điều trị bằng catechin đã thể hiện sự ức chế tín hiệu tế bào và khả năng trung hòa MGO [202]. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã được chứng minh rằng việc điều trị bằng acid caffeic và naringenin kết hợp với các thành phần khác đã ức chế đáng kể quá trình hình thành Advanced Glycation End Products (AGEs) [197, 203]. Thêm vào đó, quercetin cũng có khả năng ức chế quá trình hình thành AGEs) thông qua việc đồng thời tạo phức với MGO. Vùng 6 và 8 của vòng A của polyphenol được cho là đảm nhiệm việc trung hòa MGO và phá vỡ các liên kết của AGEs [197, 204]. Hơn thế nữa, quercetin thể hiện khả năng ức chế hình thành AGEs trong phản ứng BSA-MGO, khi MGO gây ra quá trình glycation albumin [204].

4.3. Bàn luận chung về tác dụng dược lý theo hướng điều trị bệnh đái tháo đường của cây Xấu hổ

Cây Xấu hổ được sử dụng để hỗ trợ điều trị hoặc ngăn ngừa một số rối loạn như ung thư, viêm gan, nhiễm trùng tiết niệu, béo phì và đái tháo đường [205]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được acid syringic và acid protocatechuic từ cao chiết lá cây Xấu hổ, phân đoạn EtOAc. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy cả hai hợp chất đều có hoạt tính ức chế α -glucosidase và PTP-1B. Cả hai hợp chất có thể được coi là hợp chất đầy hứa hẹn trở thành thuốc ngăn ngừa, điều trị đái tháo đường típ 2. Các chất ức chế α -glucosidase đã được sử dụng làm thuốc trong lâm sàng để điều trị bệnh đái tháo đường típ 2 như acarbose, miglitol, voglibose [178].



Hình 4.1. Tóm tắt kết quả nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng của cây Xấu hổ trong hỗ trợ điều trị bệnh ĐTĐ

Đái tháo đường được định nghĩa là bệnh rối loạn chuyển hóa, có đặc điểm tăng glucose huyết mạn tính do khiếm khuyết về tiết insulin, về tác động của insulin, hoặc cả hai [6]. Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn mô hình dinh dưỡng giàu chất béo kết hợp với tiêm streptozotocin liều 50mg/kg để gây ĐTĐ típ 2 ở chuột. Kết quả thu được cho thấy phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ với liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày có tiềm năng trong việc cải thiện bệnh thận đái tháo đường trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 do STZ.

Nghiên cứu cơ chế tác dụng của cây Xấu hổ là một trong những điểm mới của đề tài. Nghiên cứu trên mô hình *in silico* đã cho thấy hai hợp chất Acid protocatechuic và acid syringic có khả năng ức chế hai enzym α -glucosidase và PTP-1B. Ngoài ra, phương pháp docking phân tử đã dự đoán các tương tác với các acid amin có thể xảy ra trong các vị trí hoạt động của α -glucosidase và PTP-1B của hai hợp chất. Đây cũng là điểm mà các phương pháp thực nghiệm khác khó có thể thực hiện được. Ngoài ra, tác dụng bảo vệ tế bào tránh khỏi tác động của MGO khi glucose huyết tăng cao của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất được làm sáng tỏ thông qua các thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào HUVECs. Các nghiên cứu *in vivo* cho thấy cơ chế hạ glucose huyết, cải thiện các biến chứng bệnh thận đái tháo đường của phân đoạn EtOAc cao chiết cây Xấu hổ thông qua cơ chế giảm tình trạng viêm, tăng khả năng chống oxy hóa. Kết quả nghiên cứu tác dụng và cơ chế tác dụng của cây Xấu hổ trong hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường được tóm tắt trong hình 4.1

Các thực nghiệm của luận án này là kết quả bước đầu đánh giá sơ bộ tác dụng hạ đường huyết và cơ chế bảo vệ chống lại độc tính của các chất chuyển hóa khi nồng độ đường huyết tăng cao kéo dài. Để các hoạt chất được trở thành các dược chất điều trị ĐTĐ cần đòi hỏi thêm các nghiên cứu lâm sàng và tiền lâm sàng kỹ lưỡng trước khi áp dụng trong điều trị. Cây Xấu hổ muốn thành dược liệu đưa vào sử dụng để cho ra đời các sản phẩm hỗ trợ tiểu đường típ 2 phải được trồng trong những vùng trồng đạt tiêu chuẩn; cao Xấu hổ phải được tiêu chuẩn hóa... Đây mới chỉ là những nghiên cứu bước đầu để khẳng định tác

dụng hạ glucose huyết của cây Xấu hổ - một dược liệu rất có tiềm năng trong điều trị đái tháo đường típ 2.

Mặc dù đã rất cố gắng tuy nhiên có thể kể ra một số điểm hạn chế của luận án này như chưa thực hiện các đánh giá định lượng ở mức độ tổn thương vi thể thận, tụy, gan, mới đánh giá định tính tổn thương thận, để hiểu rõ hơn về cơ chế và tác dụng của mẫu thử cao chiết phân đoạn EtOAc.

4.4. Đóng góp mới của luận án

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá tác dụng ức chế các enzym liên quan đến cơ chế bệnh đái tháo đường của các hợp chất acid protocatechuic và acid syringic từ cây Xấu hổ. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai hợp chất có hoạt tính ức chế mạnh α -glucosidase và PTP-1B, là đích quan trọng trong điều trị bệnh đái tháo đường.

Tác dụng bảo vệ tế bào tránh khỏi tác động của MGO khi glucose huyết tăng cao của phân đoạn EtOAc và hai hợp chất cũng được làm sáng tỏ thông qua các thử nghiệm *in vitro*.

Phân đoạn EtOAc (MP-E, 50 và 100 mg/kg) có tác dụng hạ glucose huyết trên mô hình OGTT.

Về tác dụng của phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ lên chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi chế độ ăn giàu chất béo và STZ. Sau 60 ngày điều trị, liều 50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ có tác dụng: làm giảm nồng độ glucose máu đáng kể, cải thiện các chỉ số lipid máu, giúp cải thiện các chỉ số liên quan chức năng thận, giảm tình trạng viêm, giảm stress oxy hóa, và cải thiện đáng kể cấu trúc mô bệnh học thận trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi STZ.

Đề xuất cơ chế tác dụng hạ glucose huyết của cao chiết lá cây Xấu hổ và phân đoạn EtOAc có thể thông qua cơ chế ức chế enzym α -glucosidase, ức chế PTP-1B; giảm stress oxy hóa: giảm nồng độ MDA và tăng nồng độ một số các marker chống oxy hóa (tại mô thận chuột thí nghiệm) như SOD; CAT; GPx; giảm biến chứng thận của chuột mắc ĐTĐ típ 2 thực nghiệm; giảm tình trạng

viêm trên mô thận chuột cũng được cải thiện và biểu hiện rõ bằng các số liệu giảm của các chất đánh dấu dấu hiệu viêm như TNF- α và IL-1 β .

KẾT LUẬN

Với những kết quả đạt được của luận án, chúng tôi đưa ra một số kết luận như sau:

1. Kết quả đánh giá tác dụng hạ đường huyết và một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường của cao chiết lá cây Xấu hổ trên thực nghiệm:

- Đã xác định được phân đoạn cao chiết EtOAc có tác dụng hạ đường huyết tốt nhất so với cao chiết toàn phần và các phân đoạn khác trên mô hình OGTT ở chuột bình thường.
- Đã nghiên cứu được tác dụng hạ glucose máu của cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc (50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày) trên mô hình chuột ĐTĐ típ 2 gây bởi chế độ ăn giàu béo và tiêm STZ liều thấp. Mức giảm glucose máu lần lượt là 56,3% và 71,3% ở mức liều 50 mg/kg/ngày; 100 mg/kg/ngày so với nhóm chứng bệnh lý với $p < 0,05$.
- Về một số tác dụng liên quan đến đái tháo đường, luận án cũng đã nghiên cứu được tác dụng của phân đoạn cao chiết EtOAc (50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày) có các tác dụng cải thiện các chỉ số lipid máu; các chỉ số liên quan đến chức năng thận; các chỉ số về mức độ stress oxy hóa; chỉ số enzym chống oxy hóa và chỉ số về tình trạng viêm cũng như cải thiện đáng kể cấu trúc mô bệnh học thận trên mô hình chuột bị gây ĐTĐ típ 2 bởi chế độ ăn giàu béo và tiêm STZ liều thấp. Cụ thể là:

+ **Về tác dụng trên các chỉ số lipid máu:** Giảm các chỉ số TC, TG và LDL-C tăng chỉ số HDL-C, với tỉ lệ tăng là 10,5% ($p < 0,05$) ở mức liều 50 mg/kg/ngày; Còn ở mức liều 100 mg/kg/ngày giảm cholesterol toàn phần 6,2%, triglycerid máu 9,7% và LDL-C 35,5% và tăng HDL-C 21,4 % khi so sánh với nhóm chuột bệnh lý ($p < 0,05$).

+ **Về tác dụng cải thiện các chỉ số liên quan đến chức năng thận:** phân đoạn cao chiết EtOAc (50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày) có tác dụng giảm nồng độ creatinin máu với tỉ lệ giảm lần lượt là 20,2% và 18,4% ($p < 0,05$) khi so với nhóm chứng bệnh lý; giảm nồng độ microalbumin niệu, tỉ lệ giảm lần lượt là 11,9% và 14,9%; ngoài ra phân đoạn cao chiết EtOAc có tác dụng tăng

creatinin niệu và tăng hệ số thanh thải creatinin với tỉ lệ tăng lần lượt 10,6 % và 23,7%; 50,6% và 72,1% khi so với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,05$).

+ **Về tác dụng cải thiện tình trạng viêm và giảm quá trình stress oxy hóa trên mô thận chuột:** Luận án cũng đã đánh giá được tác dụng trên của phân đoạn cao chiết EtOAc (50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày) có các tác dụng cải thiện các chỉ số liên quan như sau: Làm giảm nồng độ TNF- α lần lượt là 17,7% và 24,1% và nồng độ IL-1 β lần lượt là 10,3% và 22,2% khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,05$); giảm nồng độ marker peroxy hóa lipid (MDA): mức giảm lần lượt là 15,8% và 26,3%; tăng nồng độ các chất chống oxy hóa: SOD; CAT; GPx: mức tăng lần lượt là: 61,1% và 100%; 29,4% và 59,8%; 24,7% và 45,6% khi so với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,05$).

+ **Về tác dụng trên mô bệnh học thận:** phân đoạn cao chiết EtOAc (50 mg/kg/ngày và 100 mg/kg/ngày) đã giảm các biến chứng thận ở chuột thí nghiệm, cải thiện đáng kể cấu trúc mô bệnh học thận trên mô hình chuột bị gây ĐTD típ 2.

2. Kết quả đánh giá cơ chế tác dụng chống ĐTD của phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất chiết xuất từ phân đoạn EtOAc của cao chiết lá cây Xấu hổ *in vitro* và *in silico*.

- Phân đoạn cao chiết EtOAc và hai hợp chất có thể làm giảm độc tính glucose và rối loạn chức năng chuyển hóa do MGO gây ra liên quan đến các đích AGEs trên dòng tế bào HUVEC. Cơ chế tác dụng hạ đường huyết của phân đoạn EtOAc của cây Xấu hổ lên chuột bị gây ĐTD típ 2 bởi chế độ ăn giàu chất béo và STZ thông qua cơ chế giảm tình trạng viêm, tăng khả năng chống oxy hóa để có thể cải thiện các biến chứng của bệnh thận đái tháo đường.
- Hai hợp chất acid protocatechuic và acid syringic thể hiện tác dụng ức chế cả hai đích khác nhau bao gồm PTP-1B và α -glucosidase, cụ thể: acid protocatechuic và acid syringic có hoạt tính ức chế mạnh PTP-1B với giá trị IC_{50} lần lượt là $248,83 \pm 7,66 \mu M$ và $450,31 \pm 7,77 \mu M$; acid

protocatechuic và acid syringic có hoạt tính ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} lần lượt là $416,17 \pm 9,41 \mu M$ và $490,78 \pm 9,28 \mu M$.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, lá cây Xấu hổ là dược liệu tiềm năng trong điều trị bệnh ĐTĐ típ 2 và ngăn ngừa biến chứng suy thận trong bệnh ĐTĐ trên thực nghiệm. Để có thể khai thác và sử dụng nguồn dược liệu dễ kiếm, dễ trồng thành vùng trồng dược liệu đạt tiêu chuẩn và để có thể sử dụng lá cây Xấu hổ dưới dạng cao chiết phân đoạn EtOAc một cách hiệu quả, tác giả xin đề xuất:

- Nghiên cứu một số cơ chế hạ glucose huyết khác của cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc và các chất tách chiết được từ phân đoạn này.

- Nghiên cứu bào chế và tiêu chuẩn hóa cao chiết phân đoạn EtOAc lá cây Xấu hổ. Có thể lấy hai hợp chất acid protocatechuic acid và acid syringic làm chất định chuẩn cho cao chiết cây Xấu hổ.

- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc, cũng như các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng để phát triển thành chế phẩm thuốc.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN: “NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG CHỐNG
ĐÁI THÁO ĐƯỜNG CỦA LÁ CÂY XÁU HỔ (*Mimosa Pudica* L.)
TRÊN THỰC NGHIỆM ”

1- Pham Thi Lan, Nguyen Thi Thu, Vu Thi Thom, Nguyen Thi Hai Yen, Phan Hong Minh, Bui Son Nhat, Nguyen Thi Huyen, Nguyen Hong Nhung, Ta Thi Thu Hang, Pham Thi Nguyet Hang, Bui Thanh Tung. (2022), "Antidiabetic and Renoprotective Effects of Ethyl Acetate Fraction of *Mimosa pudica* L. Leaves Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice." *Current Bioactive Compounds* 18(10), p. 9-18.

2- Pham Thi Lan, Nguyen Thi Thu, Vu Thi Thom, Nguyen Thi Hai Yen, Phan Hong Minh, Bui Son Nhat, Nguyen Thi Huyen, Nguyen Hong Nhung, Ta Thi Thu Hang, Pham Thi Nguyet Hang, Bui Thanh Tung. (2023), "Bioactive Compounds from *Mimosa pudica* Leaves Extract with Their α -glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activities in vitro and in silico Approaches." *Letters in Drug Design & Discovery* 20(3), p. 353-364.

3- Pham Thi Lan, Pham Thi Nguyet Hang, Bui Thanh Tung. (2024), "The protective effect of ethyl acetate fraction and bioactive compounds of *Mimosa pudica* L. leaves in methylglyoxal-induced glucotoxicity" *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, ISSN 2588-1132.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. American Diabetes Association (2014), "Diagnosis and classification of diabetes mellitus", *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
2. International Diabetes Federation (2021), "IDF Atlas 10th Edition", *IDF Diabetes Atlas*, 4-6.
3. Pham Huy Tuan Kiet, Kieu Thi Tuyet Mai, Duong Tuan Duc et al. (2020), "Direct medical costs of diabetes and its complications in Vietnam: A national health insurance database study", *Diabetes Research and Clinical Practice*, 162, 108051.
4. Tunna T, Zaidul I, Ahmed Q, et al. (2015), "Analyses and profiling of extract and fractions of neglected weed *Mimosa pudica* Linn. traditionally used in Southeast Asia to treat diabetes", *South African Journal of Botany*, 99, 144-152.
5. Tasnuva ST, Qamar UA, Ghafoor K, et al. (2019), " α -glucosidase inhibitors isolated from *Mimosa pudica* L.", *Natural Product Research*, 33(10), 1495-1499.
6. Bộ Y tế (2020), "Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị Đái tháo đường tip 2", *Quyết định số 5481/QĐ-BYT*.
7. Nguyễn Thị Xuyên (2015), "Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh nội tiết-chuyển hoá.", *Nhà xuất bản Y học*, 174-237.
8. Wilcox G (2005), "Insulin and insulin resistance", *Clinical biochemist reviews*, 26(2), 19.
9. Świderska E, Strycharz J, Wróblewski A, et al. (2018), "Role of PI3K/AKT pathway in insulin-mediated glucose uptake", *Blood Glucose Levels*, 1, 1-18.
10. Bataille D (2002), "Molecular mechanisms of insulin secretion", *Diabetes & Metabolism*, 28(6 Suppl), 4S7-13.
11. Croze, Marine (2013). "Study of the insulin-sensitizing effect of myo-inositol in mouse: Evaluation of the nutritional interest of a myo-inositol supplementation." *PhD diss., INSA de Lyon*.
12. Cerf, Marlon E (2013), "Beta cell dysfunction and insulin resistance", *Frontiers in endocrinology*, 4, 37.
13. Mottillo EP, Desjardins EM, Fritzen AM et al. (2017), "FGF21 does not require adipocyte AMP-activated protein kinase (AMPK) or the phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC) to mediate improvements in whole-body glucose homeostasis", *Molecular metabolism*, 6.6, 471-481.
14. Rena G, Hardie DG, Pearson ER (2017), "The mechanisms of action of metformin", *Diabetologia*, 60.9, 1577-1585.
15. Dhameja, Manoj, and Preeti Gupta (2019), "Synthetic heterocyclic candidates as promising α -glucosidase inhibitors: An overview", *European journal of medicinal chemistry*, 176, 343-377.
16. Hussain H, et al. (2019), "Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as potential anti-diabetes agents: patent review (2015-2018)", *Expert opinion on therapeutic patents*, 689-702.

17. Nowotny K, Jung T, Hohn A, et al. (2015), "Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus", *Biomolecules*, 5.1, 194-222.
18. Yamamoto M and Sugimoto T (2016), "Advanced glycation end products, diabetes, and bone strength", *Current osteoporosis reports* 14.6, 320-326.
19. Yamagishi S, et al. (2011), "Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes", *Experimental gerontology* 46.4, 217-224.
20. Vlassara H, and Uribarri J. (2014), "Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both", *Current diabetes reports*, 14.1, 1-10.
21. Schalkwijk C G and Stehouwer C D A (2020), "Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases", *Physiological reviews* 100.1, 407-461.
22. Groener J B, et al (2019), "Methylglyoxal and advanced glycation end products in patients with diabetes—what we know so far and the missing links", *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127.08, 497-504.
23. Bellier J, et al. (2019), "Methylglyoxal, a potent inducer of AGEs, connects between diabetes and cancer", *Diabetes research and clinical practice*, 148, 200-211.
24. Brings S, Fleming T, Freichel M, et al. (2017), "Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention", *International journal of molecular sciences*, 18(5), 984.
25. Tuttle K R, Bakris G L, Bilous R W, et al. (2014), "Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference", *Diabetes care*, 37(10), 2864-2883.
26. American Diabetes Association (2021), "2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021", *Diabetes Care*, 44(Suppl 1), S15-s33.
27. Schena F P and Gesualdo L (2005), "Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy", *Journal of the American society of nephrology*, 16(3 suppl 1), S30-S33.
28. Kashihara N, Haruna Y, K Kondeti V, et al. (2010), "Oxidative stress in diabetic nephropathy", *Current medicinal chemistry*, 17(34), 4256-4269.
29. Gross J L, De Azevedo M J, Silveiro S P, et al. (2005), "Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment", *Diabetes care*, 28(1), 164-176.
30. Arora M K and Singh U K (2013), "Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update", *Vascular pharmacology*, 58(4), 259-271.
31. Cole J B and Florez J C (2020), "Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications", *Nature reviews nephrology*, 16(7), 377-390.
32. Yau J W, Rogers S L, Kawasaki R, et al. (2012), "Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy", *Diabetes care*, 35(3), 556-564.
33. Kaur J, Mittal D and Singla R (2022), "Diabetic Retinopathy Diagnosis Through Computer-Aided Fundus Image Analysis: A Review", *Archives of Computational Methods in Engineering*, 29(3), 1673-1711.

34. Hirai F E, Tielsch J M, Klein B E, et al. (2011), "Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy", *Ophthalmology*, 118(2), 353-358.
35. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton S E, et al. (2005), "Vascular risk factors and diabetic neuropathy", *New England Journal of Medicine*, 352(4), 341-350.
36. Abbott C A, Malik R A, Van Ross E R, et al. (2011), "Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the UK", *Diabetes care*, 34(10), 2220-2224.
37. Forbes J M and Cooper M E (2013), "Mechanisms of diabetic complications", *Physiological reviews*, 93(1), 137-188.
38. Rang H P, Dale M M, Ritter J M, et al. (2011), "Rang & Dale's pharmacology", *Elsevier Health Sciences*, S31-33.
39. Bertram G, Katzung, Susan B Masters, et al. (2018), *Basic and clinical pharmacology*, 747-771.
40. Goodman L S, Gilman A G (2017), "Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics", *The Macmillan*, 70678557.
41. Đào Văn Phan, Nguyễn Trọng Thông, Nguyễn Trần Giáng Hương (2022), "Dược lý học lâm sàng", *Nhà xuất bản y học*, 541.
42. Dunn C J and Faulds D (2000), "Nateglinide", *Drugs*, 60, 607-615.
43. Milner Z and Akhondi H (2020), "Repaglinide", *Drugs*, 65, 598-603.
44. Katzung B G (2012), "Basic and clinical pharmacology", 560027.
45. Phan Quang Khải, Trần Thị Thu Thủy, Từ Phạm Hiền Trang (2022), "Hướng dẫn điều trị ĐTĐ của ADA 2022", 6-8.
46. TS. Nguyễn Quốc Anh (2020), "Bệnh viện Bạch Mai- Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh nội khoa- Đái tháo đường", *Nhà xuất bản Y học*, 390.
47. Islam M S and Wilson R D (2012), "Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes", *Animal models in diabetes research*, 161-174.
48. Reed M, Meszaros K, Entes L, et al. (2000), "A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat", *Metabolism-Clinical and Experimental*, 49(11), 1390-1394.
49. Furman B L (2021), "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats", *Current protocols*, 1(4), e78.
50. Chen D and Wang M W (2005), "Development and application of rodent models for type 2 diabetes", *Diabetes, Obesity and metabolism*, 7(4), 307-317.
51. Schnedl WJ F S, Johnson JH, Newgard CB (1994), "STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells", *Diabetes Care*, 43, 1326 – 33.
52. Lenzen S (2008), "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes", *Diabetologia*, 51(2), 216-26.
53. Szkudelski T (2012), "Streptozotocin –nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model", *Experimental Biology and Medicine*, 237(5), 481-490.
54. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. (2000), "A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat", *Metabolism*, 49, 1390-1394.

55. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. (2005), "Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening", *Pharmacological Research*, 52, 313-320.
56. Dunn JS, Kirkpatrick J, McLetchie NG, et al. (1943), "Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally", *Lancet*, 244, 484-487.
57. Jorns A, Munday R, Tiedge M and Lenzen S (1997), "Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro", *Journal of Endocrinology*, 155, 283-293.
58. Ghasemi A, Khalifi S and Jedi S (2014), "Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review)", *Acta Physiol Hung*, 101(4), 408-20.
59. Reuter, Tanja Y (2007), "Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes", *Drug Discov Today Dis Models*, 4, 3-8.
60. Harwood Jr, James H, Listrani P and Wagner JD (2012), "Non human Primates and Other Animal Models in Diabetes Research. ", *Journal of Diabetes Science and Technology*, 6(3).
61. Joost H G. and Schürmann A (2014), "The genetic basis of obesity-associated type 2 diabetes (diabesity) in polygenic mouse models.", *Mammalian Genome*, 25, 401-412.
62. Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M et al. (2016), "Experimental diabetes mellitus in different animal models.", *Journal of diabetes research*, 2016.
63. Bibi S, Kulsoom S and Rashid H (2013), "In Silico Approach for lead identification and optimization of antidiabetic compounds", *IOSR J. Pharm. Biol. Sci*, 7(3), 36-46.
64. Badrinarayan P, Choudhury C, Sastry GN (2015), "Molecular modeling", *Systems and Synthetic Biology*, 2015, 93-128.
65. Jain, Ajay N (2006), "Scoring functions for protein-ligand docking", *Current Protein and Peptide Science*, 7(5), 407-420.
66. Zoete V, Grosdidier A and Michielin O (2009), "Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design", *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(2), 238-248.
67. Schneider G, Baringhaus KH (2008), "Molecular design: concepts and applications." *John Wiley & Sons*.
68. Vyas VK, Ukawala RD, Ghate M, Chintha C. (2012), "Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives", *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 74(1), 1.
69. Prisinzano, Thomas E (2008), "Book Review of Drug-like Properties: Concepts, Structure Design, and Methods." , *ACS Publications*, 6619-6619.
70. Lipinski, Christopher A (2004), "Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution", *Drug discovery today: Technologies*, 1(4), 337-341.
71. Kennedy, Tony (1997), "Managing the drug discovery/development interface", *Drug discovery today*, 2(10), 436-444.
72. Gardiner S J and Begg E J (2006), "Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice", *Pharmacological reviews*, 58(3), 521-590.
73. Đỗ Tất Lợi (2004), "Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam", 794.

74. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương et al. (2009), "Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam", *Viện Dược liệu- Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật*, 1099.
75. Ahmad H, Sehgal S, Mishra A, et al. (2012), "Mimosa pudica L.(Laajvanti): an overview", *Pharmacognosy reviews*, 6(12), 115.
76. Zhang J, Yuan K, Zhou W-l, et al. (2011), "Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of Mimosa pudica Linn. from southern China", *Pharmacognosy magazine*, 7(25), 35.
77. Rizwan K, et al. (2022), "Phytochemistry and diverse pharmacology of genus mimosa: a review", *Biomolecules*, 83.
78. Tunna, Tasnuva S, Qamar U A, et al. (2014), " Weeds as alternative useful medicinal source: Mimosa pudica Linn. on diabetes mellitus and its complications.", *Advanced Materials Research*, 995, 49-59.
79. Pande M, Pathak A (2010), "Preliminary pharmacognostic evaluations and phytochemical Studies on roots of Mimosa pudica ", *Int J Pharm Sci Rev Res*, 1(1), 50-52.
80. Ijaz S, Khan H M S, Anwar Z, et al. (2019), "HPLC profiling of Mimosa pudica polyphenols and their non-invasive biophysical investigations for anti-dermatoheliotic and skin reinstating potential", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 865-875.
81. Van Calsteren M-R, Bissonnette M C, Cormier F, et al. (1997), "Spectroscopic characterization of crocetin derivatives from Crocus sativus and Gardenia jasminoides", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1055-1061.
82. Husain A, Ahmad A and Agrawal P K (1993), "(-)-Jasmonic acid, a phytotoxic substance from Botryodiplodia theobromae: characterization by NMR spectroscopic methods", *Journal of Natural Products*, 56(11), 2008-2011.
83. Patel, Neeraj K., and Kamlesh K. Bhutani. (2014), " Suppressive effects of Mimosa pudica (L.) constituents on the production of LPS-induced pro-inflammatory mediators", *Excli Journal* 13, 1011.
84. Tunna, Tasnuva S., Islam S. M. Zaidul, et al. (2015), "Analyses and profiling of extract and fractions of neglected weed Mimosa pudica Linn. traditionally used in Southeast Asia to treat diabetes", *South America journal of Batony*, 99, 144-152.
85. Torres-Piedra M, Ortiz-Andrade R, Villalobos-Molina R, et al. (2010), " A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition", *European journal of medicinal chemistry*, 45(6), 2606-2612.
86. Kumar, Shashank, and Abhay K. Pandey (2013), "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview", *The scientific world journal*, 2013.
87. Umamaheswari SE, Prince PS (2007), "Antihyperglycaemic effect of ėilogen-excelí, an ayurvedic herbal formulation in streptozotocin-induced diabetes mellitus", *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 64.1, 53-61.

88. Sutar NG, Sutar UN, Behera BC (2009), "Antidiabetic activity of the leaves of *Mimosa pudica* Linn. in albino rats", *Journal of herbal medicine and toxicology*, 3.1, 123-126.
89. Antony PJ, Gandhi GR, Stalin A, et al. (2017), "Myoinositol ameliorates high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 1098-1113.
90. Patro G, Bhattamisra SK, Mohanty BK (2016), "Effects of *Mimosa pudica* L. leaves extract on anxiety, depression and memory", *Avicenna journal of phytomedicine*, 6.6, 696.
91. Gandhiraja N, Sriram S, Meenaa V, et al. (2009), "Phytochemical screening and antimicrobial activity of the plant extracts of *Mimosa pudica* L. against selected microbes", *Ethnobotanical leaflets*, 5, 8.
92. Kannan S, Aravinth S, Sam E, et al. (2009), "Wound healing activity of *Mimosa pudica* Linn formulation", *Int J Chem Tech Res*, 11.4, 1554-8.
93. Paul J, Saifulla Khan SM, Asdaq B, et al. (2010), "Wound healing evaluation of chloroform and methanolic extracts of *Mimosa pudica* roots in rats", *Int J Biol Med, Res* 1.4, 223-227.
94. Mitra R, Agricola S, Mitchell B, et al. (2007), "Medicinal plants of Thailand", *Asia-Pacific Biotech News*, 11(08), 508-518.
95. Wahjuni S, Asih IR, Bili DT, et al. (2021), "Effect of the ethanol extract of *Mimosa* leaves on the bloodglucose, Malondialdehyde, and Histopathological Characteristics of Wistar Rats", *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9 (A), 1296-1301.
96. Viswanathan R, Sekar V, Velpandian V, et al. (2013), "anti-diabetic activity of thottal vadichoornam (*mimosa pudica*) in alloxan induced diabetic rats", *International Journal of Natural Product Science*, 3(5), 13-20.
97. Chaimum-aom N, Chomko S, Talubmook C. Toxicology and oral glucose tolerance test (OGTT) of Thai medicinal plant used for diabetes controls, *Phyllanthus acidus* L.(Euphorbiaceae). *Pharmacognosy Journal*. 2017;9(1).
98. Chaudhry Z Z, Morris D L, Moss D R, et al. (2013), "Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice", *Laboratory animals*, 47(4), 257-265.
99. Furman B L (2015), "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats", *Current protocols in pharmacology*, 70(1), 5.47. 1-5.47. 20.
100. Kamli-Salino S E, Brown P A, Haschler T N, et al. (2023), "Induction of experimental diabetes and diabetic nephropathy using anomer-equilibrated streptozotocin in male C57Bl/6J mice", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 650, 109-116.
101. Trần Thị Chi Mai (2007), "Nghiên cứu tác dụng của polyphenol chè xanh (*Camelliasinensis*) trên các chỉ số lipid và trạng thái chống oxy hóa trong máu chuột cống trắng đái tháo đường thực nghiệm.", *Luận án tiến sĩ y học*.
102. Lin Lv, Shao-Yu Wu, Guang-Fa Wang et al (2010), "Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin", *Phytotherapy research*, 24(2), 219-224.

103. Togashi Y, Shirakawa J, Okuyama T et al (2016), "Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice", *Scientific reports*, 6(1), 25465.
104. Turkmen K (2017), "Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse", *International urology and nephrology*, 49, 837-844.
105. Bui Thanh Tung et al. (2015), "Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver", *Experimental gerontology*, 64, 1-7.
106. Nguyen Thanh Hai, Pham Thi Minh Hue, Bui Thanh Tung et al. (2016), "Protective Effect of Coenzyme Q10 on Methamphetamine-Induced Neurotoxicity in the Mouse Brain". *repository.vnu.edu.vn*
107. Rehman, Kanwal, and Muhammad Sajid Hamid Akash. (2017), "Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked?", *J Cell Biochem*, 118(11), 3577-3585.
108. Demircan N, Gürel A, Armutcu F et al. (2008), "The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. ", *Med Sci Monit* 14, 97-101.
109. Aebi H (1974), "Catalase, in methods of enzymatic analysis. ", *Elsevier* 673-684.
110. Marklund, Stefan L (1984), "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species", *Biochemical Journal*, 222(3), 649-655.
111. Lawrence, Richard A., and Raymond F. Burk. (1976), "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver", *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952-958.
112. Kruger N J (2009), "The Bradford method for protein quantitation", *The protein protocols handbook*, 17-24.
113. Gandhi G R, Ignacimuthu S and Paulraj M G (2012), "Hypoglycemic and β -cells regenerative effects of Aegle marmelos (L.) Corr. bark extract in streptozotocin-induced diabetic rats", *Food Chem Toxicol*, 50(5), 1667- 74.
114. Tang H, Huang L, Sun C, et al. (2020), "Exploring the structure–activity relationship and interaction mechanism of flavonoids and α -glucosidase based on experimental analysis and molecular docking studies", *Food & function*, 11(4), 3332-3350.
115. Nokhala A, Siddiqui M J, Ahmed Q U, et al. (2020), "Investigation of α -Glucosidase Inhibitory Metabolites from Tetracera scandens Leaves by GC–MS Metabolite Profiling and Docking Studies", *Biomolecules*, 10(2), 287.
116. Hevener K E, Zhao W, Ball D M, et al. (2009), "Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase", *Journal of chemical information and modeling*, 49(2), 444-460.
117. Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. (2012), "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings", *Advanced drug delivery reviews*, 64, 4-17.

118. Kar S and Leszczynski J (2020), "Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates", *Expert opinion on drug discovery*, 15(12), 1473-1487.
119. Gohlke H, Hendlich M and Klebe G (2000), "Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions", *Journal of molecular biology*, 295(2), 337-356.
120. Moradi-Afrapoli F, Asghari B, Saeidnia S, et al. (2012), "In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 37.
121. Nguyen Phi Hung, Yang J-L, Uddin M N, et al. (2013), "Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from *Morinda citrifolia* (Noni) and their insulin mimetic activity", *Journal of natural products*, 76(11), 2080-2087.
122. Trần Văn Hiền, Trần Thanh Loan, Nguyễn Đăng Dũng, et al. (2005), "Áp dụng kỹ thuật MTT để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào lách chuột chịu stress oxy hoá của các dịch chiết hà thủ ô, cúc hoa vàng", *Tạp chí dược liệu*, 5(1), 23-25.
123. Park S H, Do M H, Lee J H, et al. (2017), "Inhibitory effect of *Arachis hypogaea* (Peanut) and its phenolics against methylglyoxal-derived advanced glycation end product toxicity", *Nutrients*, 9(11), 1214.
124. Tan X F, Uddin Z, Park C, et al. (2017), "Competitive protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors, prenylated caged xanthenes from *Garcinia hanburyi* and their inhibitory mechanism", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(8), 2498-2506.
125. Zhang W, Hong D, Zhou Y, et al. (2006), "Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(10), 1505-1512.
126. Larregieu C A and Benet L Z (2013), "Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements", *The AAPS journal*, 15, 483-497.
127. Cabrera-Pérez, Miguel Á., Nguyen-Hai Nam et al. (2018), "In silico assessment of ADME properties: advances in Caco-2 cell monolayer permeability modeling", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(26), 2209-2229.
128. Yupparach, Piyapong, and Ampa Konsue (2017), "Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities of Ethanolic Extract from *Mimosa pudica* L. in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats", *Pharmacogn J*, 9(6), 834-837.
129. Pushparaj PN, Low HK, Manikandan J, et al. (2007), "anti- diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin- induced diabetic rats", *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 430-434.
130. Napapach, Sanong Chomko, and Chusri Talubmook, Chaimum-aom (2017), "Toxicology and Oral glucose Tolerance Test (OGTT) of Thai Medicinal Plant Used for Diabetes controls, *Phyllanthus acidus* L. (Euphorbiaceae)", *Pharmacognosy Journal*, 9(1), 58-61.

131. Trịnh Minh Thiên, Nguyễn Thị Thu Hương, et al. (2018), "Nghiên cứu tác dụng của cao chiết cùi từ vỏ quả thanh long ruột trắng (*Hylocereus undatus*) trên mô hình chuột nhất đái tháo đường", *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh*, 22(5), 109-114.
132. Wahjuni S, Asih IR, Bili DT, et al.(2021), "Effect of the Ethanol Extract of Mimosa Leaves on the Blood Glucose, Malondialdehyde, and Histopathological Characteristics of Wistar Rats", *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9, 1296-1301.
133. Rita Maneju Sunday (2019), "Antioxidant and Antidiabetic Properties of Mimosa pudica Seeds in Streptozotocin-induced Diabetic Wistar Rats", *Asian Journal of Biotechnology*, 12, 1-8.
134. Patro G, Bhattamisra S K, Mohanty B K, et al. (2016), "In vitro and In vivo Antioxidant Evaluation and Estimation of Total Phenolic, Flavonoidal Content of Mimosa pudica L", *Pharmacognosy Res*, 8(1), 22-8.
135. Bertram G. Katzung Susan B Masters A J T (2018), "Basic and clinical pharmacology", 754.
136. Abdelkader N F, Eitah H E, Maklad Y A, et al. (2020), "New combination therapy of gliclazide and quercetin for protection against STZ-induced diabetic rats", *Life Sci*, 247, 117458.
137. Afifi M, Alkaladi A, Abomughaid M M, et al. (2020), "Nanocurcumin improved glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats: a comparison study with Gliclazide", *Environ Sci Pollut Res Int*, 27(20), 25271-25277.
138. Portha B and Serradas P (1991), "Improvement in glucose-induced insulin secretion in diabetic rats after long-term gliclazide treatment: a comparative study using different models of non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin", *Am J Med*, 90(6a), 15s-21s.
139. Lebovitz et al. (1983), "Diabetes Mellitus: Theory and Practices.", *New York: Medical Examination Publishing*, 591-610.
140. Baba S, Nakagawa S, Takebe K et al (1983), " Comparison of gliclazide and glibenclamide treatment in non-insulin-dependent diabetes", *Tohoku J Exp Med.*, 141, 693–706.
141. Harrower, Andrew DB (1985), "Comparison of diabetic control in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients treated with different sulphonylureas.", *Curr Med Res Opin*, 9, 676–680.
142. Abdurrazak M, Rao U M and Mohd K S (2015), "Biochemical evaluation of antihyperglycemic and hypolipidemic effects of methanolic tepal extract of *Musa paradisiaca* studied in STZ-induced diabetic mice", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(8), 837-846.
143. Abdelkader N F, Eitah H E, Maklad Y A, et al. (2020), "New combination therapy of gliclazide and quercetin for protection against STZ-induced diabetic rats", *Life sciences*, 247, 117458.
144. Amalraj T and Ignacimuthu S (2002), "Hyperglycemic effect of leaves of *Mimosa pudica* Linn", *Fitoterapia*, 73(4), 351-2.

145. Rajendiran D, Kandaswamy S, Sivanesan S, et al. (2017), "Potential Antidiabetic Effect of Mimosa pudica Leaves Extract in High Fat Diet and Low Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats", *International Journal of Biology Research*, 2(4), 55-62.
146. Huyen NT, Lan PT, Nham DT, et al (2019), "Study on the antidiabetic effect of *mimosa pudica* linn. leaf water extract", *Journal of Medicinal Materials*, 24(3), 180-186.
147. Jaiswal M, Schinske A and Pop-Busui R (2014), "Lipids and lipid management in diabetes", *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 28(3), 325-38.
148. Fried SK, Grauso NL, Brodin RE (1993), "Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. ", *J Clin Invest*, 92, 2191-8.
149. Harris, Maureen I (1991), "Hypercholesterolemia in diabetes and glucose intolerance in the U.S. population. ", *Diabetes Care*, 14(5), 366-374.
150. Verges Bruno (2005), " New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes ", *Diabetes & Metabolism*, 31(5), 429–439.
151. Thái Hồng Quang. (2012), "Thực hành lâm sàng bệnh ĐTĐ, Dự phòng hoặc làm chậm xuất hiện bệnh ĐTĐ type 2.", *Nhà xuất bản Y học*, 454 – 469.
152. Lü H, Chen J, Li W, et al. (2009), "Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from Folium Eriobotryae", *Phytomedicine*, 16(10), 967-971.
153. Luo-sheng w, Chen C-p, Xiao Z-q, et al. (2013), "In vitro and in vivo anti-diabetic activity of Swertia kouitchensis extract", *Journal of Ethnopharmacology*, 147(3), 622-630.
154. Jamel El Ghouli, Smiri M, Ghrab S, et al. (2012), "Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of traditional aqueous extract of *Zygophyllum album* in streptozotocin diabetic mice", *Pathophysiology*, 19(1), 35-42.
155. Antony P J, Gandhi G R, Stalin A, et al. (2017), "Myoinositol ameliorates high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling", *Biomed Pharmacother*, 88, 1098-1113.
156. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, et al. (2003), "Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). ", *Kidney Int* 63, 225–232.
157. Dinneen, Sean F., and Hertz C. Gerstein (1997), "The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin- dependent diabetes mellitus. A systematic overview of the literature. ", *Arch Intern Med*, 157, 1413–1418.
158. Showail, Anwar Ali, and Medhat Ghoraba (2016), "The association between glycemic control and microalbuminuria in Type 2 diabetes", *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 27(3), 473-479..
159. Sana MA, Chaudhry M, Malik A, et al. (2020), "Prevalence of Microalbuminuria in Type 2 Diabetes Mellitus", *Cureus*, 12(12), e12318.
160. Zuo Y, Wang C, Zhou J, et al. (2008), "Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high-performance liquid chromatography", *Anal Sci*, 24(12), 1589-92.

161. Gowda S, Desai P B, Kulkarni S S, et al. (2010), "Markers of renal function tests", *N Am J Med Sci*, 2(4), 170-3.
162. Bruun, Jens M, Lihn AS et al. (2003), "Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, 527–33.
163. Calle MC, Fernandez ML (2012), "Inflammation and type 2 diabetes", *Diabetes & Metabolism*, 38(3), 183–191.
164. Packham DK, Alves TP, Dwyer JP, et al (2012), "Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database.", *Am J Kidney Dis*, 59(1), 75–83.
165. Luis-Rodríguez D, Martínez-Castelao A, Górriz JL, et al. (2012), "Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy.", *World J Diabetes*, 3(1), 7–18.
166. Baby J, George J. , and Jeevitha M (2013), "Pharmacology and Traditional Uses of *Mimosa pudica*", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 5(2), 41-44.
167. Vikram, Pradeep Kumar, Reetesh et al. (2012), "Evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of *Mimosa pudica* L.", *Int J Curr Pharm Res*, 4(4), 47–50.
168. Patel N K and Kamlesh K B (2014), "Suppressive effects of *Mimosa pudica* (L.) constituents on the production of LPS-induced pro-inflammatory mediators", *Excli Journal*, 13, 1011–1021.
169. Patel N K, Bairwa K, Gangwal R, et al. (2015), "2'-Hydroxy flavanone derivatives as an inhibitors of pro-inflammatory mediators: Experimental and molecular docking studies", *Bioorg Med Chem Lett*, 25(9), 1952-1955.
170. Coughlan, Melinda T., and Kumar Sharma (2016), "Challenging the dogma of mitochondrial reactive oxygen species overproduction in diabetic kidney disease. ", *Kidney Int*, 90(2), 272–279.
171. Güçlü A, Yonguç N, Dodurga Y, et al (2015), "The effects of grape seed on apoptosis-related gene expression and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats", *Ren Fail*, 37(2), 192–197.
172. Hayden, Melvin R., and Suresh C. Tyagi. (2002), "Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus", *JOP* 3.4, 86–108.
173. Kaur J, Sidhu S, Chopra K, et al. (2016), "Protective effect of *Mimosa pudica* L. in an L-arginine model of acute necrotising pancreatitis in rats", *J Nat Med*, 70(3), 423-34.
174. Bialy L and Waldmann H (2005), "Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: Next-generation drugs?", *Angewandte Chemie International Edition*, 44(25), 3814-3839.
175. Johnson T O, Ermolieff J and Jirousek M R (2002), "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes", *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 696.

176. Montalibet J and Kennedy B P (2005), "Therapeutic strategies for targeting PTP1B in diabetes", *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2(2), 129-135.
177. Kumar S, Narwal S, Kumar V, et al. (2011), "α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes", *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 19.
178. Derosa G and Maffioli P (2012), "α-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice", *Archives of medical science: AMS*, 8(5), 899.
179. Yeon Sil Lee, Kang I-J, Won M H, et al. (2010), "Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1β by hispidin derivatives isolated from the fruiting body of *Phellinus linteus*", *Natural Product Communications*, 5(12), 1934578X1000501218.
180. Paulina Ormazabal, Scazzocchio B, Vari R, et al. (2018), "Effect of protocatechuic acid on insulin responsiveness and inflammation in visceral adipose tissue from obese individuals: possible role for PTP1B", *International Journal of Obesity*, 42(12), 2012-2021.
181. Adefegha S A, Oboh G, Ejakpovi I I, et al. (2015), "Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: a structure–function perspective", *Comparative clinical pathology*, 24(6), 1579-1585.
182. Abdulwali Ablat, Halabi M F, Mohamad J, et al. (2017), "Antidiabetic effects of *Brucea javanica* seeds in type 2 diabetic rats", *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-14.
183. Nguyen Thi Thanh Mai, Nguyen NT, Nguyen HX et al. (2012), "Screening of alpha-glucosidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants: Isolation of active principles from *Oroxylum indicum*", *Natural Product Sciences*, 18(1), 47-51.
184. Rasouli H, Hosseini-Ghazvini S M-B, Adibi H, et al. (2017), "Differential α-amylase/α-glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes", *Food & function*, 8(5), 1942-1954.
185. Costa T M, Mayer D A, Siebert D A, et al. (2020), "Kinetics analysis of the inhibitory effects of alpha-glucosidase and identification of compounds from *Ganoderma lipsiense* Mycelium", *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-14.
186. Ali Asgar MD (2013), "Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review", *International Journal of Food Properties*, 16(1), 91-103.
187. Ganiyu Oboh , Isaac A T, Akinyemi A J, et al. (2014), "Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rats' pancreas by phenolic extracts of avocado pear leaves and fruit", *International journal of biomedical science: IJBS*, 10(3), 208.
188. Young I K , Vatter D A and Shetty K (2006), "Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension", *Asia pacific journal of clinical nutrition*, 15(1), 107.
189. Jun H C and Kim S (2018), "Mechanisms of attenuation of clot formation and acute thromboembolism by syringic acid in mice", *Journal of Functional Foods*, 43, 112-122.

190. Mi H W, Nguyen D H, Choi J S, et al. (2020), "Chemical constituents from the roots of *Kadsura coccinea* with their protein tyrosine phosphatase 1B and acetylcholinesterase inhibitory activities", *Archives of pharmacal research*, 43(2), 204-213.
191. Bensellam M, Laybutt D R and Jonas J-C (2012), "The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions", *Mol Cell Endocrinol*, 364(1-2), 1-27.
192. Rajendiran D, Khan H B H, Packirisamy S, et al. (2019), "Dose dependent antidiabetic effect of *Mimosa pudica* leaves extract in type 2 diabetic rat model", *Pharma Innov. J.*, 8, 1-4.
193. Manosroi J, Moses Z Z, Manosroi W, et al. (2011), "Hypoglycemic activity of Thai medicinal plants selected from the Thai/Lanna Medicinal Recipe Database MANOSROI II", *J Ethnopharmacol*, 138(1), 92-98.
194. Bashir R, Aslam B, Javed I, et al. (2013), "Antidiabetic efficacy of *Mimosa pudica* (Lajwanti) root in albino rabbits", *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(4).
195. Rajendiran D, Kandaswamy S, Sivanesan S, et al. (2017), "Potential antidiabetic effect of *Mimosa pudica* leaves extract in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats", *International Journal of Biology Research*, 2(4), 55-62.
196. Yamagishi S-i (2011), "Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes", *Exp Gerontol*, 46(4), 217-224.
197. Do M H, Lee J H, Wahedi H M, et al. (2017), "Lespedeza bicolor ameliorates endothelial dysfunction induced by methylglyoxal glucotoxicity", *Phytomedicine*, 36, 26-36.
198. Lan PT, Huyen NTT, Kim SU et al. (2021), "Phytochemical analysis and protective effect of ethanolic extract of *Mimosa pudica* Linn. on methylglyoxal-induced glucotoxicity", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11(9), 093-101.
199. Dariya B and Nagaraju G P (2020), "Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy", *Drug Discov Today*, 25(9), 1614-1623.
200. Sompong W, Meeprom A, Cheng H, et al. (2013), "A comparative study of ferulic acid on different monosaccharide-mediated protein glycation and oxidative damage in bovine serum albumin", *Molecules*, 18(11), 13886-13903.
201. Zhou Q, Cheng K-W, Gong J, et al. (2019), "Apigenin and its methylglyoxal-adduct inhibit advanced glycation end products-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells", *Biochem Pharmacol*, 166, 231-241.
202. Zhu D, Wang L, Zhou Q, et al. (2014), "(+)-Catechin ameliorates diabetic nephropathy by trapping methylglyoxal in type 2 diabetic mice", *Mol Nutr Food Res*, 58(12), 2249-2260.
203. Gugliucci A, Bastos D H M, Schulze J, et al. (2009), "Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins", *Fitoterapia*, 80(6), 339-344.

204. Li X, Zheng T, Sang S, et al. (2014), "Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal", *J Agric Food Chem*, 62(50), 12152-12158.
205. Muhammad G, Hussain M A, Jantan I, et al. (2016), "Mimosa pudica L., a high-value medicinal plant as a source of bioactives for pharmaceuticals", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 303-315.

PHỤ LỤC 1

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC CỦA CÂY XẤU HỒ

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH MẪU
(Kết quả giám định chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số: 181DV21

Mẫu giám định: Xấu hổ (tên gọi do người gửi mẫu cung cấp)

Số lượng mẫu: 01 mẫu (Mẫu được lưu tại Phòng tiêu bản của Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu với số hiệu DL-251219).

Ngày lấy mẫu: 25/12/2019

Nơi lấy: xã Nghĩa Sơn, huyện Nghĩa Hưng, tỉnh Nam Định.

Nội dung yêu cầu: Xác định tên khoa học.

Người yêu cầu: Phạm Thị Lan

Đơn vị công tác: Khoa Dược, Đại học Kinh doanh & Công nghệ Hà Nội.

Phương pháp giám định: So sánh hình thái, đối chiếu khóa phân loại.

Cán bộ giám định: ThS. Nguyễn Văn Hiếu, ThS. Lại Việt Hưng

Sau khi phân tích mẫu có số hiệu DL-251219 kể trên, tham khảo các tài liệu hiện có, kết hợp đối chiếu với các tiêu bản của loài *Mimosa pudica* L. đang lưu giữ tại Phòng Tiêu bản của Khoa Tài nguyên Dược liệu (có số hiệu NIMM-7884^a và NIMM 7884 B-F), chúng tôi đã xác định được tên khoa học của mẫu, cụ thể như sau:

Yêu cầu	Kết quả
Tên khoa học:	<i>Mimosa pudica</i> L.
Tên đồng nghĩa (Synonym):	<i>Eburnax pudica</i> (L.) Raf.
Tên phổ thông:	Trinh nữ, Xấu hổ, Mắc cỡ, Cỏ thẹn
Họ thực vật:	Fabaceae Lindl. - Đậu
Tài liệu tham khảo - Phạm Hoàng Hộ (1999) <i>Cây cỏ Việt Nam</i>, tập 1: 819. NXB Trẻ. - Nguyễn Đăng Khôi (2003) Mimosaceae. <i>Danh lục thực vật Việt Nam</i>, tập 2: 720-721. NXB Nông Nghiệp.	

- Viện Dược liệu (2016) *Danh lục cây thuốc Việt Nam*, tr. 983. NXB Khoa học & Kỹ thuật.
- Shugang Li et al. (2011). Fabaceae. In: Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong, eds. 2008. *Flora of China*. Vol. 10 (Fabaceae): 53-54. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Iwatsuki, K., Boufford, D.E. & Ohba, H. (eds.) (2001). *Flora of Japan* IIb: 326-327. Kodansha Ltd., Tokyo.

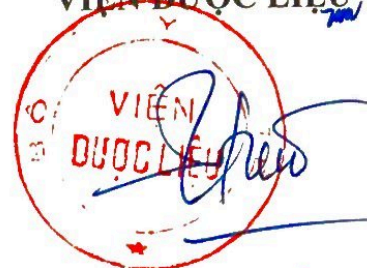
Hà Nội, ngày 13 tháng 10 năm 2021

KHOA TÀI NGUYÊN DƯỢC LIỆU



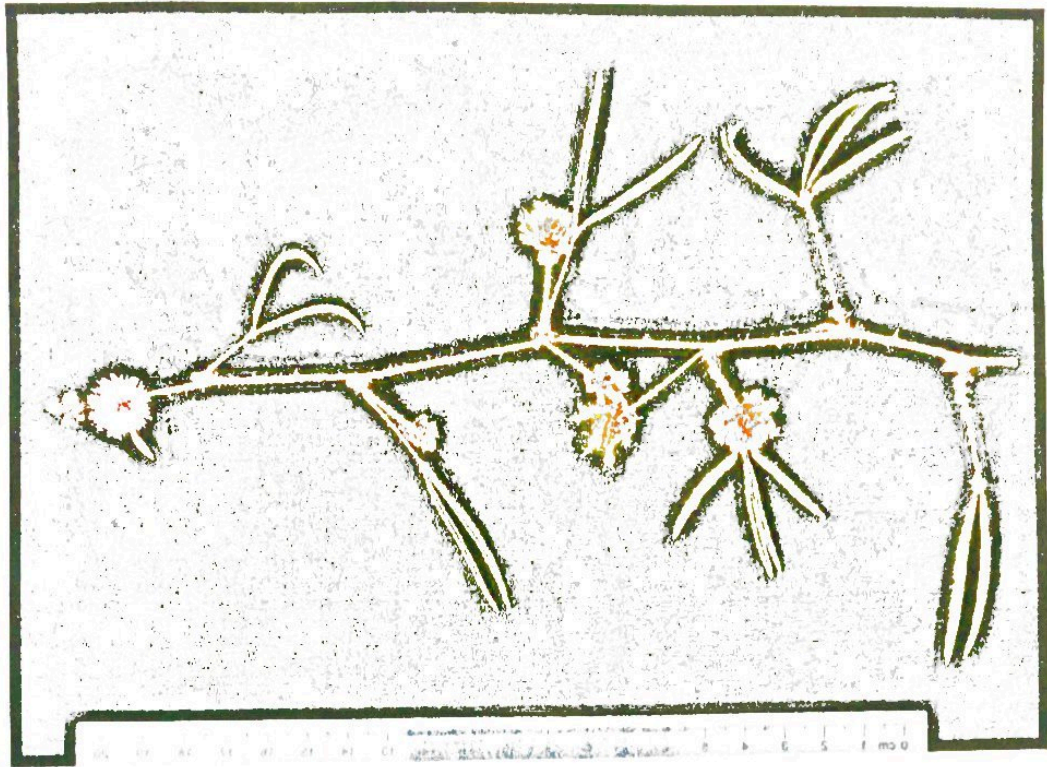
Phạm Thanh Huyền

VIỆN DƯỢC LIỆU

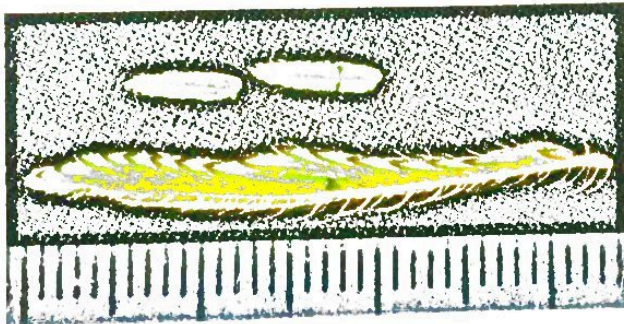


PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Phan Thúy Hiền

VIỆN
DƯỢC
LIỆU



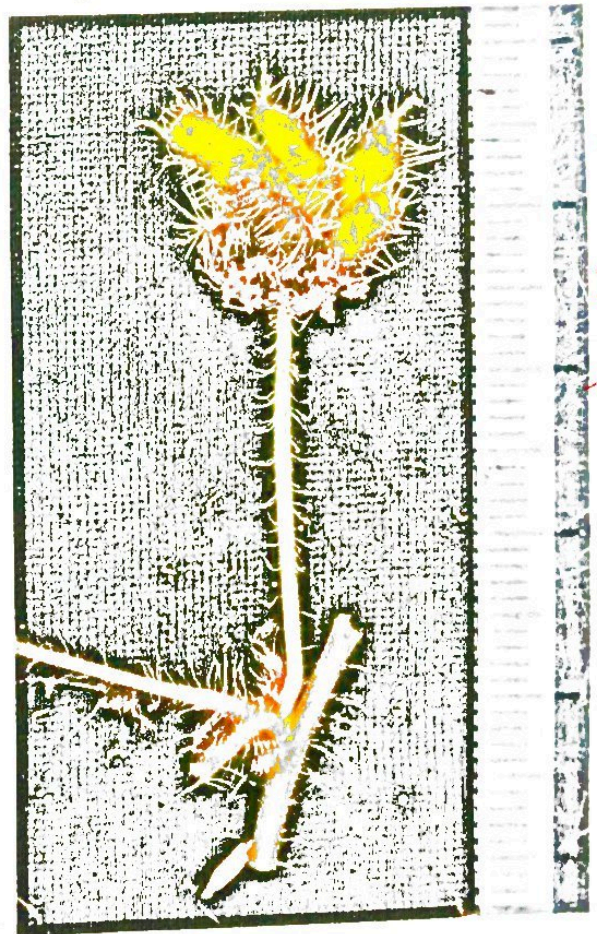
Cành mang lá, hoa và quả



Lá và lá chết



Cụm hoa



Cụm quả

PHỤ LỤC 2
PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU
VÀ PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT

Phụ lục 2.

PHƯƠNG PHÁP CHIẾT XUẤT DƯỢC LIỆU VÀ PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT

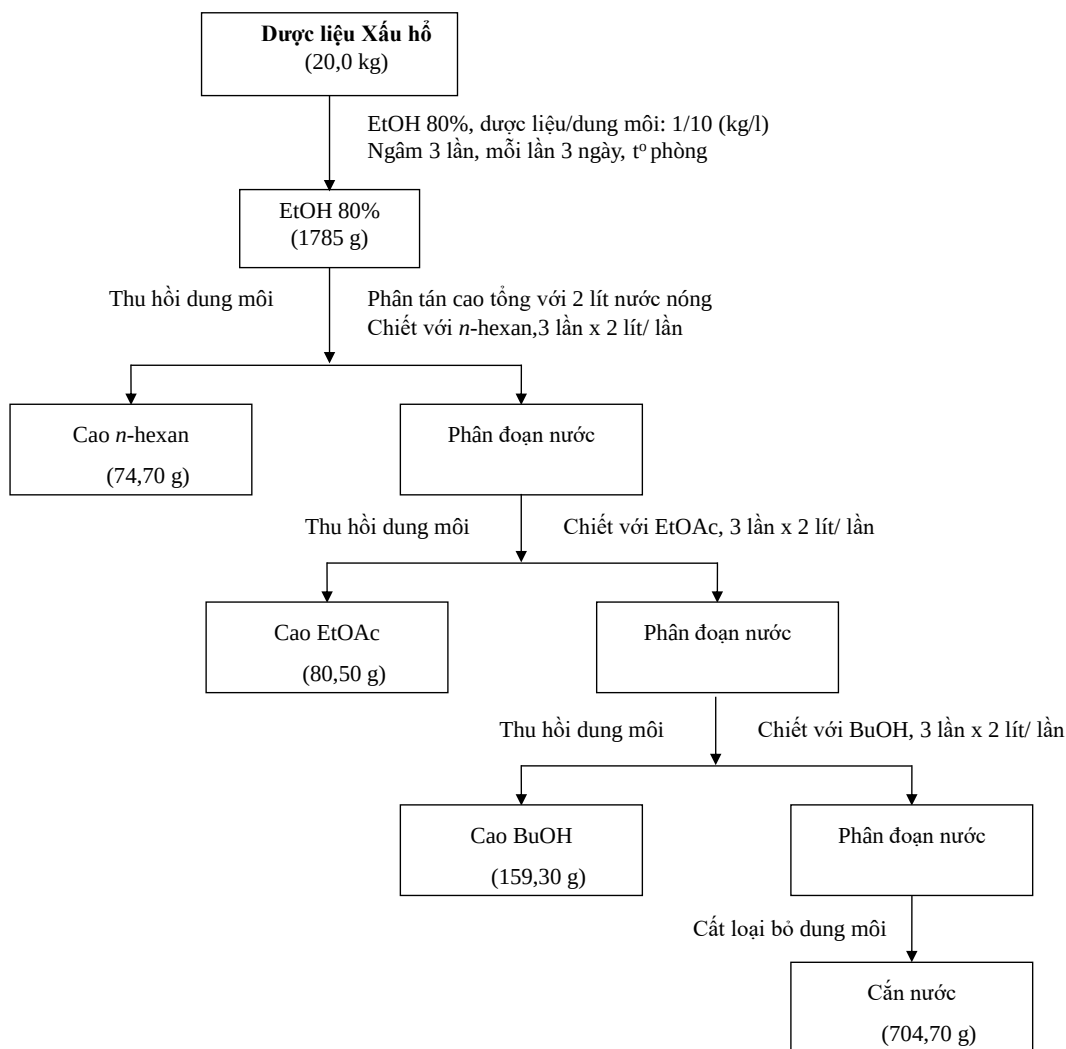
Cao chiết còn (MP), các cao chiết phân đoạn gồm n-hexan (MP-H), ethyl acetat (MP-E), n-butanol (MP-B) dùng cho thí nghiệm được thực hiện tại Khoa Hóa Thực vật, Viện Dược liệu. Quá trình chuẩn bị mẫu được tóm tắt như sau:

Cao chiết còn (MP) được chuẩn bị như sau:

Dược liệu được xay thô và chiết bằng phương pháp ngâm lạnh với dung môi ethanol (EtOH) 80% như sau: 20 kg dược liệu (lá cây Xấu hổ) được ngâm với dung môi EtOH 80% ở nhiệt độ phòng, 3 lần x 3 ngày/lần với tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1:10 (kg/l). Sau mỗi lần ngâm, tiến hành lọc bã dược liệu, gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 1.785 kg cao EtOH 80%. Hiệu suất chiết đạt khoảng 8.925%.

Các cao chiết phân đoạn:

Các cao chiết phân đoạn lá cây Xấu hổ được chuẩn bị như sau: một phần cao chiết tổng MP ở trên phân tán trong nước nóng, sau đó được lắc phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexan, ethylacetat, n-butanol, H₂O. Cất quay loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao khô với khối lượng lần lượt: n-hexan (74,70 g)- cao MP-H, ethylacetat (80,50 g) cao MP-E, và n-butanol (159,30 g)- cao MP-B, và pha nước còn lại (704,70 g) như sơ đồ thể hiện trong Hình 2.2. Ngay sau khi điều chế, các loại cao chiết tổng và cao phân đoạn thu được (dạng cao khô, độ ẩm 3-5%) được chia nhỏ theo khối lượng thành từng ống nghiệm riêng, nút kín và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.



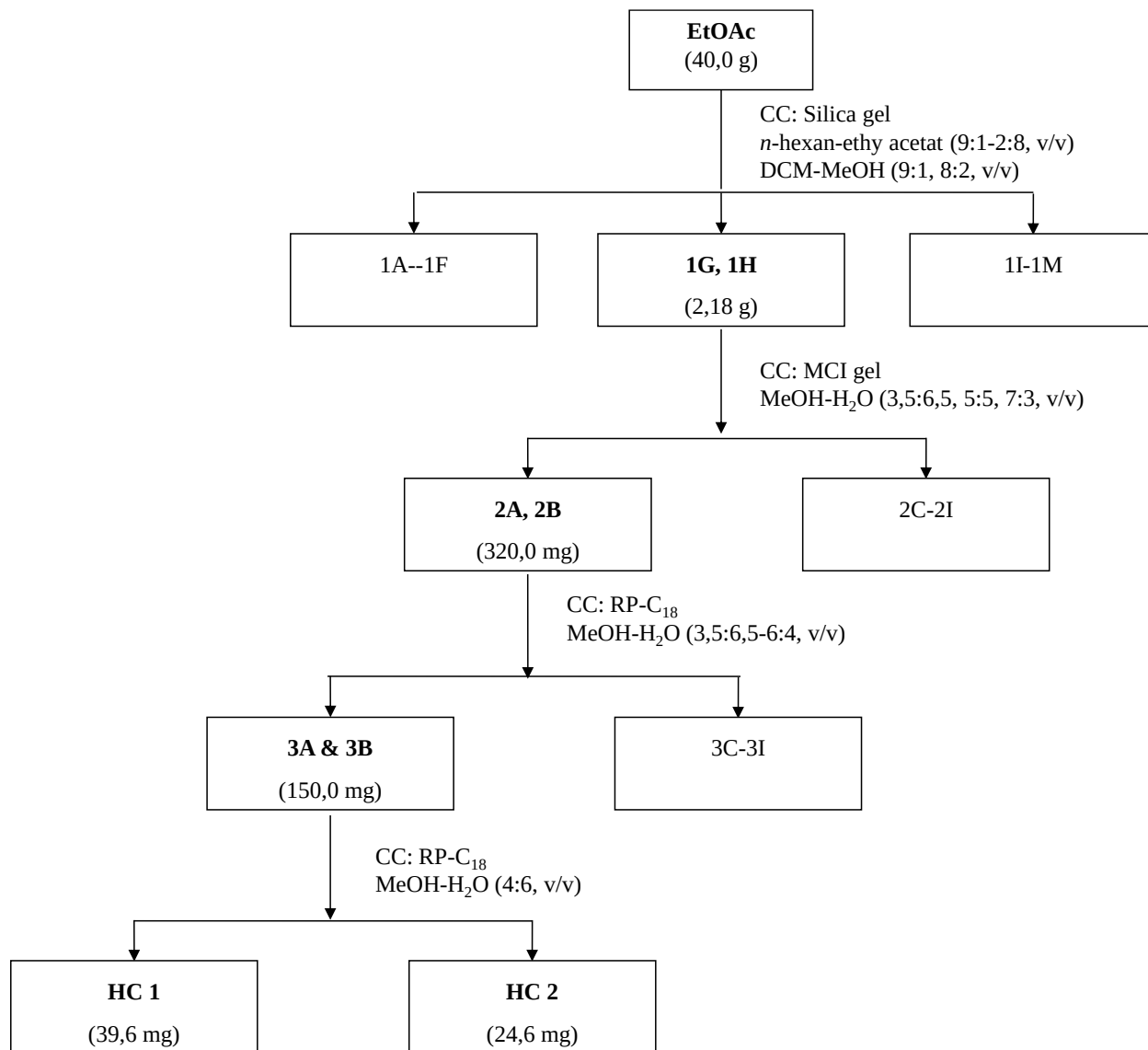
Hình PL2.1. Sơ đồ điều chế cao toàn phần và cao phân đoạn từ dược liệu lá cây Xấu hổ.

Phân lập các hợp chất chính của phân đoạn EtOAc

Phân đoạn EtOAc được sử dụng để tiến hành phân lập các hợp chất. 40,0 g cao EtOAc được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi gradient *n*-hexan-ethyl acetat (9:1-2:8, v/v) và DCM-MeOH (9:1 và 8:2, v/v) thu được 12 phân đoạn (1A-1M). Phân tách 2 phân đoạn 1G và 1H (2,18 g) bằng sắc ký cột với chất nhồi cột MCI gel, hệ dung môi rửa giải là MeOH-H₂O (3,5:6,5, 5:5, 7:3, v/v) thu được 9 phân đoạn (2A-2I). Gộp 2 phân đoạn 2A và 2B (320,0 mg) và phân tách bằng sắc ký cột pha đảo RP-C₁₈, rửa giải bằng hệ MeOH-H₂O (3,5:6,5, 6:4, v/v) thu được

9 phân đoạn (3A-3I). Phân lập phân đoạn 3A & 3B (150,0 mg) bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải MeOH-H₂O (4:6, v/v) thu được 2 hợp chất **HC 1** (39,6 mg) và **HC 2** (24,6 mg).

Quy trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc được thể hiện qua Hình 2.3.



Hình PL2.2. Quy trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc của Xấu hổ

Xác định cấu trúc của các hợp chất

Hợp chất 1

Hợp chất **HC 1** thu được dưới dạng bột màu nâu nhạt. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 7,43 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,81 (1H, d, $J = 8,0$ Hz H-5), 7,45 (1H, m, H-6). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ_{C} 123,3 (C-1), 115,8 (C-2), 146,1 (C-3), 151,5 (C-4), 117,8 (C-5), 123,9 (C-6), 170,3 (C-7). Phổ ESI-MS: m/z 153,10 $[\text{M-H}]^-$ (negative).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **HC 1** xuất hiện 3 tín hiệu proton aromatic tại δ_{H} 6,81 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,43 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và 7,45 (1H, m). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT xuất hiện 7 tín hiệu carbon trong đó có 1 carbon carboxylic (δ_{C} 170,2), 3 carbon không liên kết với hydro (δ_{C} 123,3; 146,1 và 151,5) và 3 carbon methin (δ_{C} 115,8; 117,8 và 123,9), gợi ý sự xuất hiện của vòng benzen thế 1,3,4 trong cấu trúc của **HC 1**. Phổ khối ESI-MS của **HC 1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 153,10 $[\text{M-H}]^-$ (negative), phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ ($M = 154,0$).

Từ những phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [1*], có thể xác định **HC 1** là **acid protocatechuic** (Hình PL2.3).

Bảng PL2.1. Dữ liệu phổ của hợp chất **HC 1** và **acid protocatechuic**

C/H	HC 1		Acid protocatechuic [1*]	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (độ bội, $J =$ Hz, ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (độ bội, $J =$ Hz, ppm)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$ (ppm)
1		123,3		123,1
2	7,43 (1H, d, 2,0)	115,8	7,30 (1H, br s)	115,7
3		146,1		146,1
4		151,5		151,6

5	6,81 (1H, d, 8,0)	117,8	6,78 (1H, d, 7,9)	117,7
6	7,45 (1H, m)	123,9	7,41 (1H, dd, 2,2; 7,9)	123,9
7		170,3		170,2

a) Đo trong CD₃OD, b) 500 MHz, c) 125 MHz

Hợp chất HC 2

Hợp chất **HC 2** thu được dưới dạng bột màu nâu nhạt. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ_H 7,35 (2H, s, H-2, H-6), 3,90 (6H, s, 3,5-OCH₃). Phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ_C 122,5 (C-1), 108,4 (C-2, C-6), 148,8 (C-3, C-5), 141,6 (C-4), 170,3 (C-7), 56,8 (3,5-OCH₃). Phổ ESI-MS: m/z 197,10 [M-H]⁻ (negative).

Phổ ¹H-NMR của **HC 2** xuất hiện 2 tín hiệu proton aromatic tại δ_H 7,35 (2H, s) và 6 tín hiệu proton của 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,09 (6H, s). Phổ ¹³C-NMR và DEPT xuất hiện 9 tín hiệu carbon trong đó có 1 carbon carboxylic (δ_C 170,3), 4 carbon không liên kết với hydro (δ_C 122,5; 141,6 và 148,8 (2C)), 2 carbon methin (δ_C 108,4) và 2 carbon methoxy (δ_C 56,8), gợi ý sự xuất hiện của vòng benzen đối xứng trong cấu trúc của **HC 2**. Phổ khối ESI-MS của **HC 2** cho pic ion giả phân tử tại m/z 197,10 [M-H]⁻ (negative), phù hợp với công thức phân tử C₉H₁₀O₅ (M = 198,1).

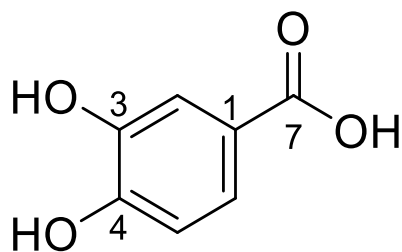
Từ những phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [2*], có thể kết luận **HC 2** là **acid syringic** (Hình PL2.4).

Bảng PL2.2. Dữ liệu phổ của hợp chất **HC 2** và **acid syringic**

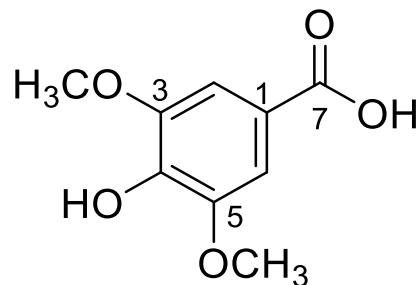
C/H	HC 2		Acid syringic [2*]	
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J =$ Hz, ppm)	$\delta_C^{a,c}$ (ppm)	$\delta_H^{a,d}$ (độ bội, $J =$ Hz, ppm)	$\delta_C^{a,c}$ (ppm)

1		122,5		120,5
2, 6	7,35 (2H, s)	108,4	7,323 (2H, s)	106,9
3, 5		148,8		147,4
4		141,6		140,3
7		170,3		168,5
3,5-OCH ₃	3,90 (6H, s)	56,8	3,78 (6H, s)	55,3

a) Đo trong CD₃OD, b) 500 MHz, c) 125 MHz, d) 600 MHz



Hình PL2.3. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HC 1** (acid protocatechuic)



Hình PL2.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HC 2** (acid syringic)

- 1*. Rho, T. and K.D. Yoon (2017), “Chemical constituents of *Nelumbo nucifera* seeds. “, *Natural Product Sciences*, **23**(4), 253-257.
- 2*. Panyo, J., K. Matsunami, and P. Panichayupakaranant (2016), “Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla* against some oral pathogens.”, *Pharmaceutical biology*, **54**(9): p. 1522-1527.

PHỤ LỤC 3

PHỤ LỤC CÁC PHỔ

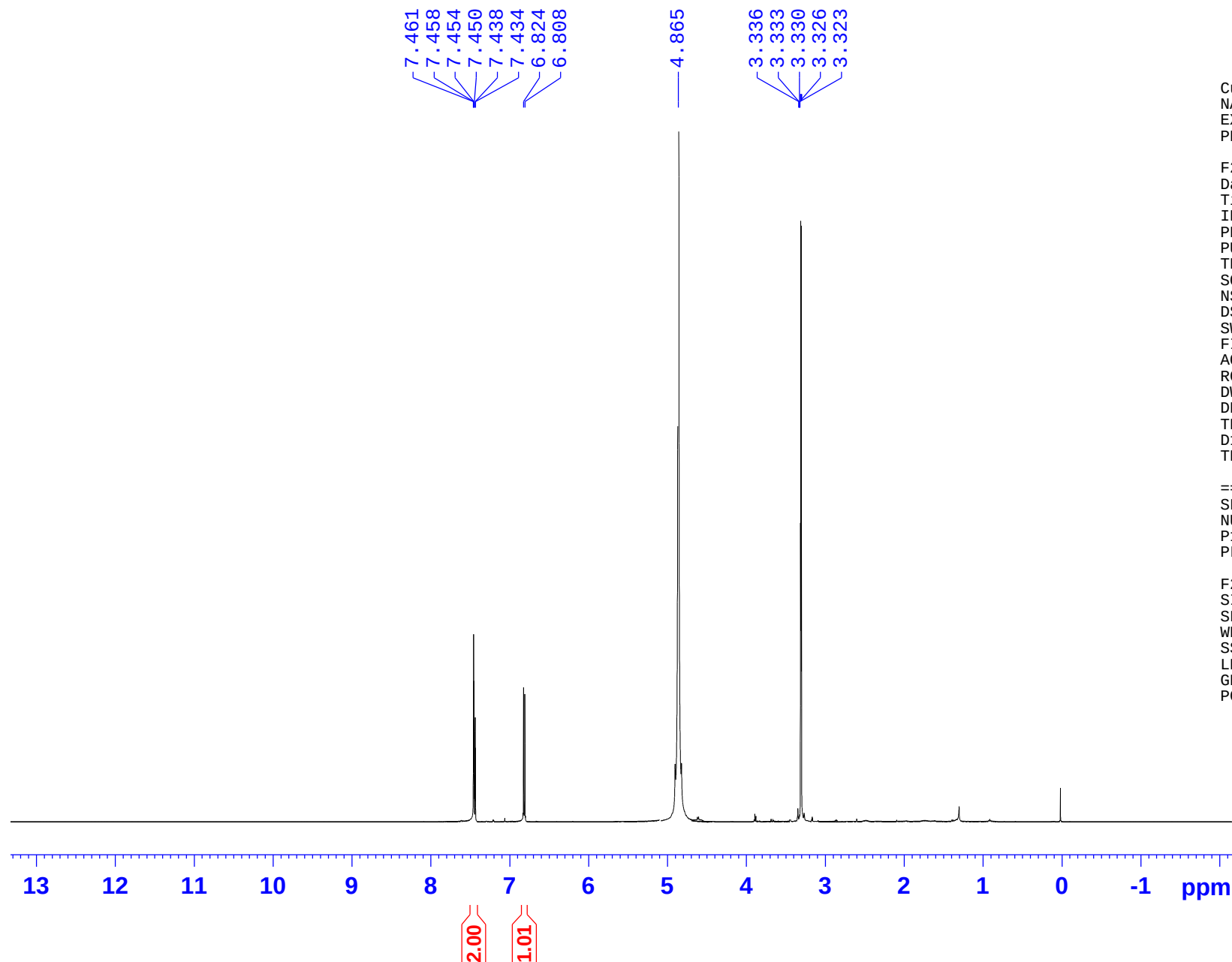
Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của các hợp chất phân lập từ phân đoạn ethyl acetat của cao chiết lá cây Xấu hổ

Hợp chất 1: Acid Protocatechuic

Hợp chất 2: Acid Syringic

Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của
ACID PROCATECHUIC

XH3B1 - MeOD - 1H



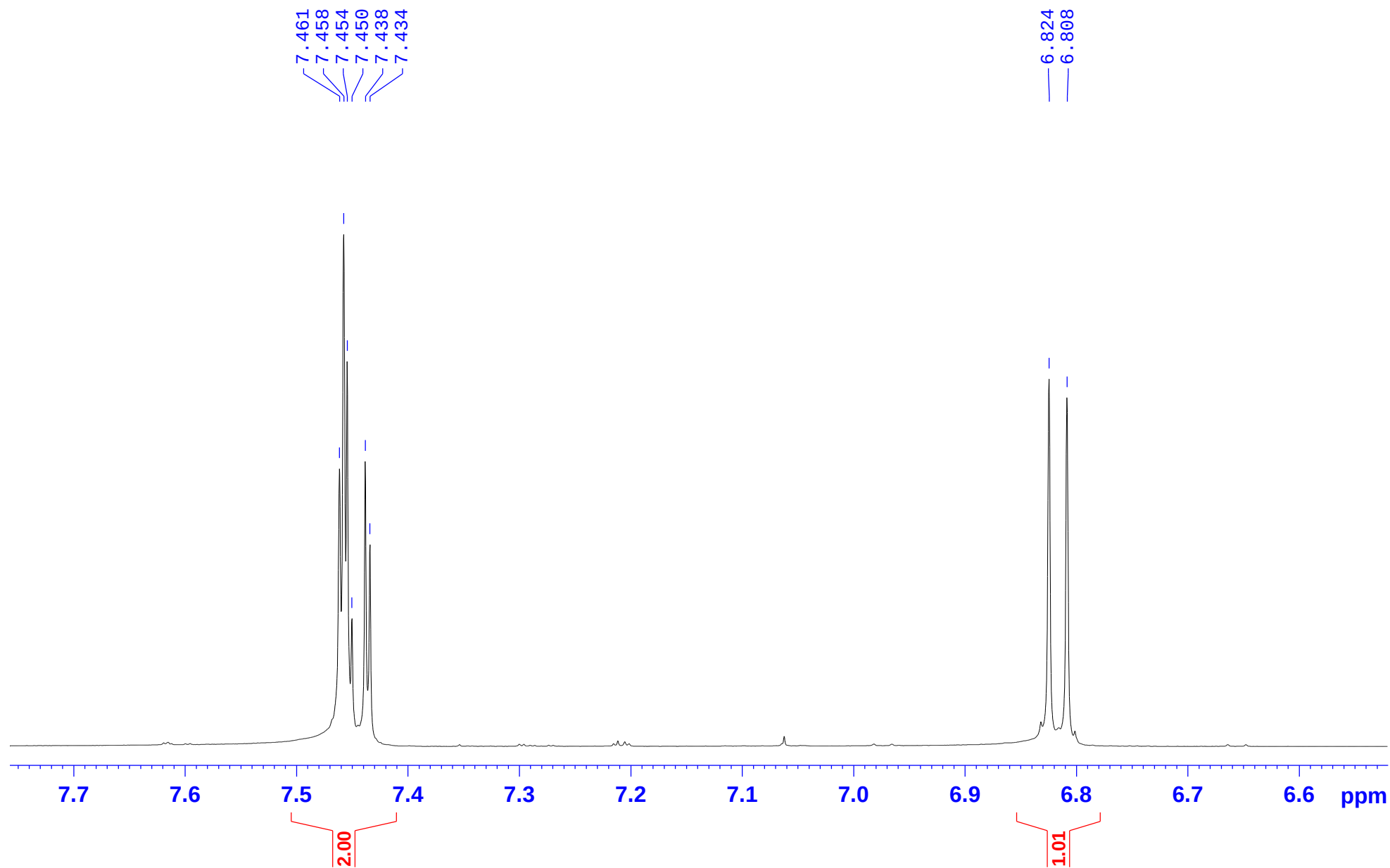
Current Data Parameters
NAME 13HD_XH3B1
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200827
Time 11.33
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 142.98
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 302.9 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

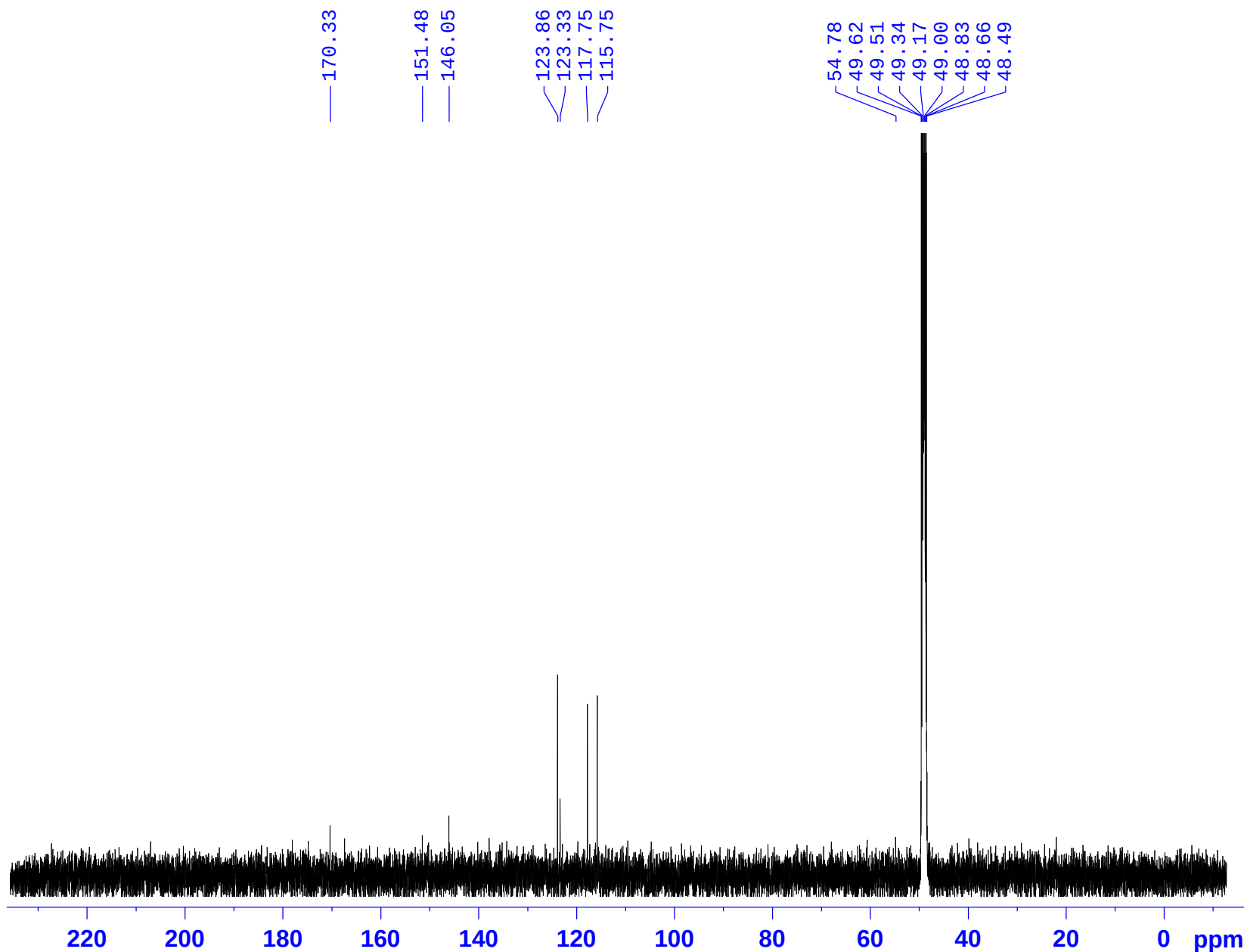
===== CHANNEL f1 =====
SF01 500.2420892 MHz
NUC1 1H
P1 10.20 usec
PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.2390001 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

XH3B1 - MeOD - 1H



XH3B1 - MeOD - C13CPD



Current Data Parameters

NAME 13HD_XH3B1
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20200827
Time 19.42
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 2048
DS 4
SWH 31250.000 Hz
FIDRES 0.476837 Hz
AQ 1.0485760 sec
RG 198.57
DW 16.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====

SF01 125.7864591 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 88.00000000 W

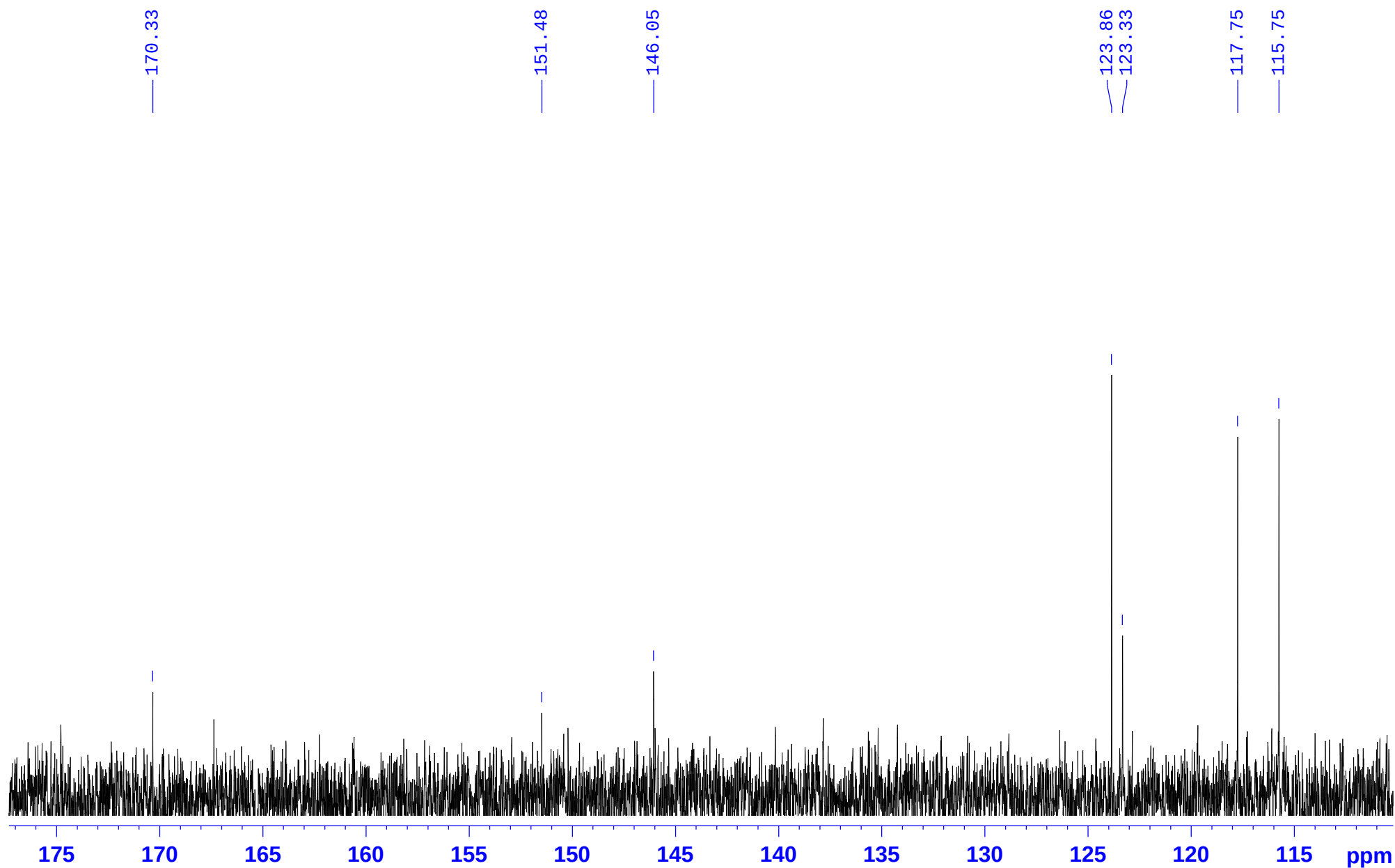
===== CHANNEL f2 =====

SF02 500.1910008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 22.00000000 W
PLW12 0.35764000 W
PLW13 0.17989001 W

F2 - Processing parameters

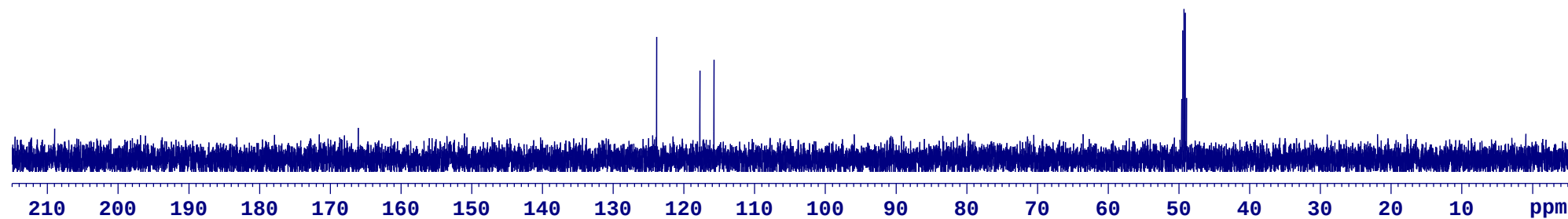
SI 32768
SF 125.7724473 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.20

XH3B1 - MeOD - C13CPD

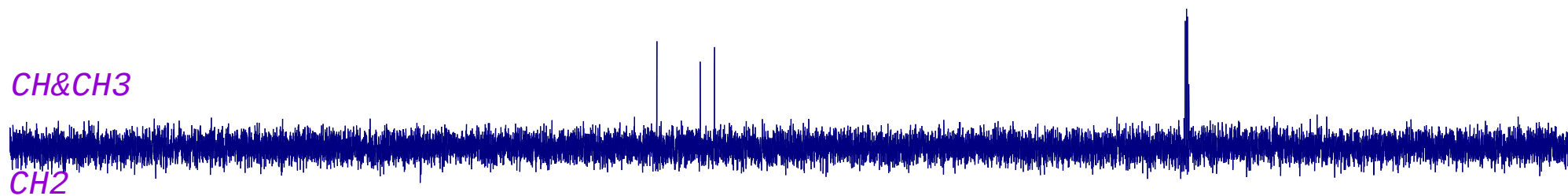


XH3B1 - MeOD - C13CPD&DEPT

DEPT90



DEPT135

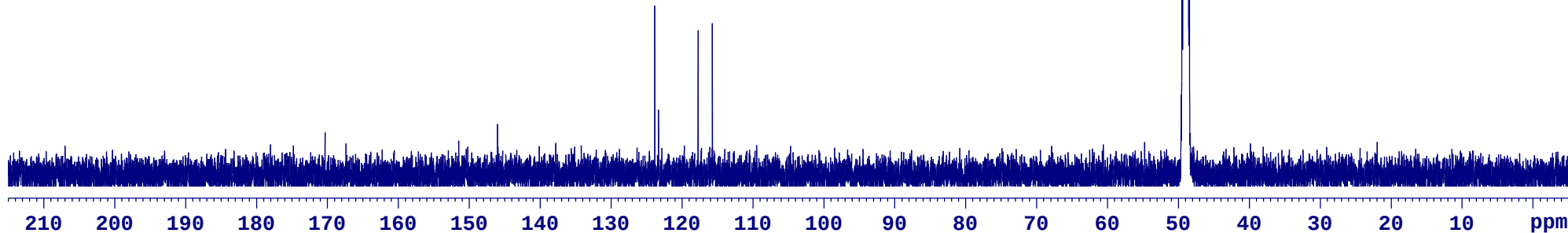


CH&CH3

CH2

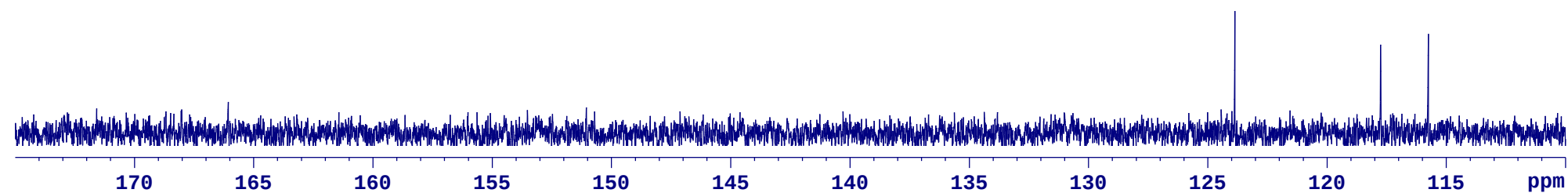


C13CPD

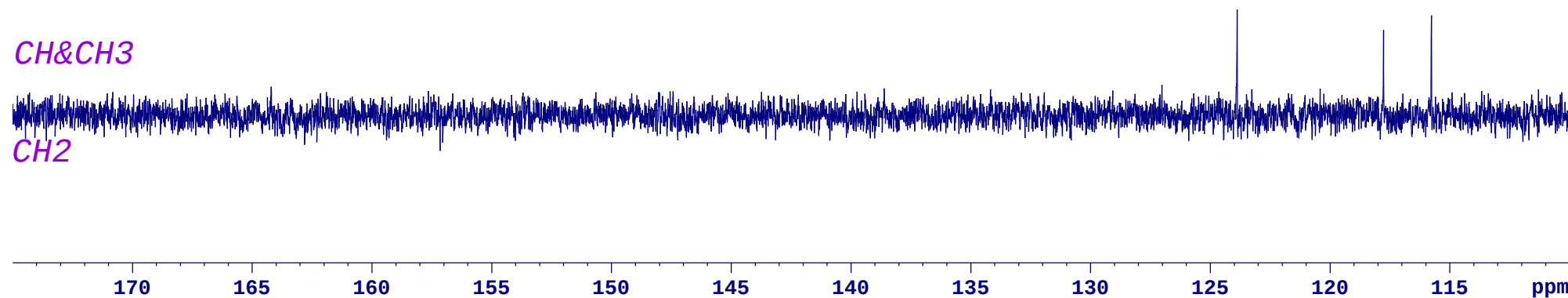


XH3B1 - MeOD - C13CPD&DEPT

DEPT90



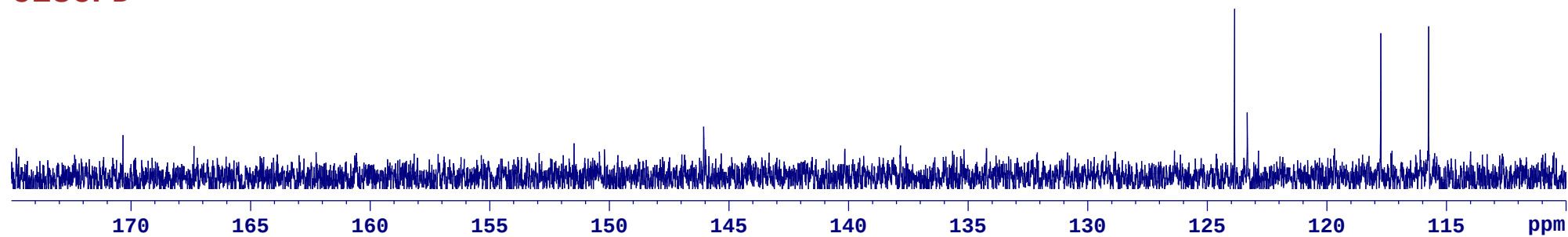
DEPT135

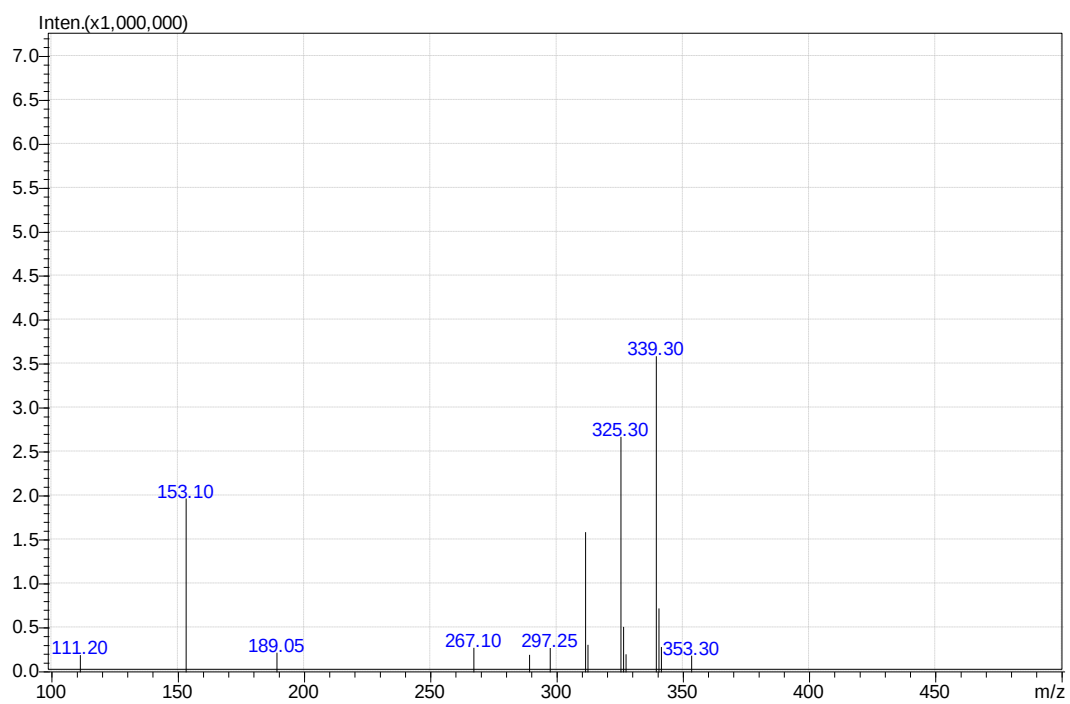


CH&CH3

CH2

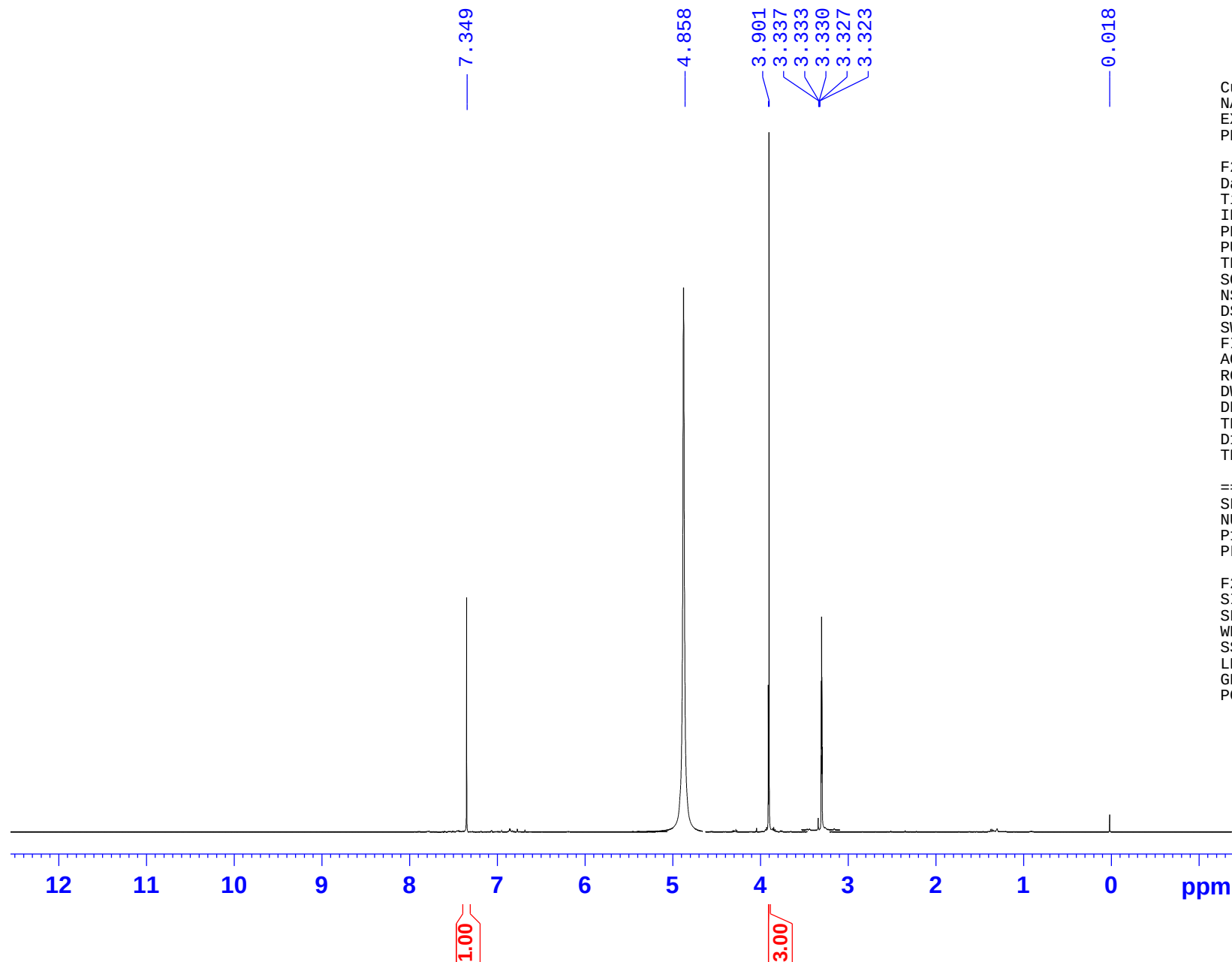
C13CPD





Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của
ACID SYRINGIC

XH3B3 - MeOD - 1H



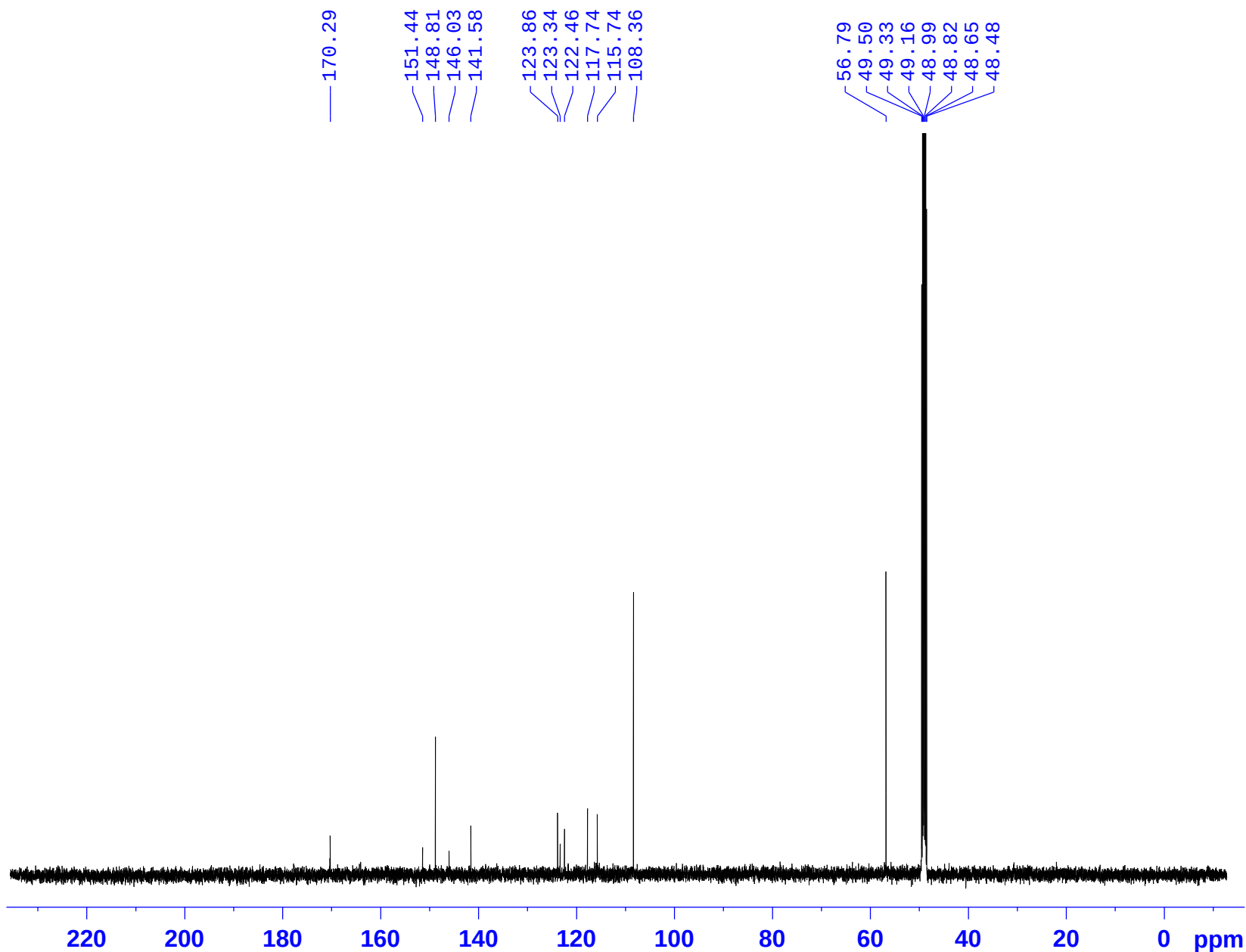
Current Data Parameters
NAME 13HD_XH3B3
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200827
Time 11.54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 127.68
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 500.2420892 MHz
NUC1 1H
P1 10.20 usec
PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.2389996 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

MT2F2-MeOD-C13CPD



Current Data Parameters
NAME 13HD_MT2F2
EXPNO 2
PROCNO 1

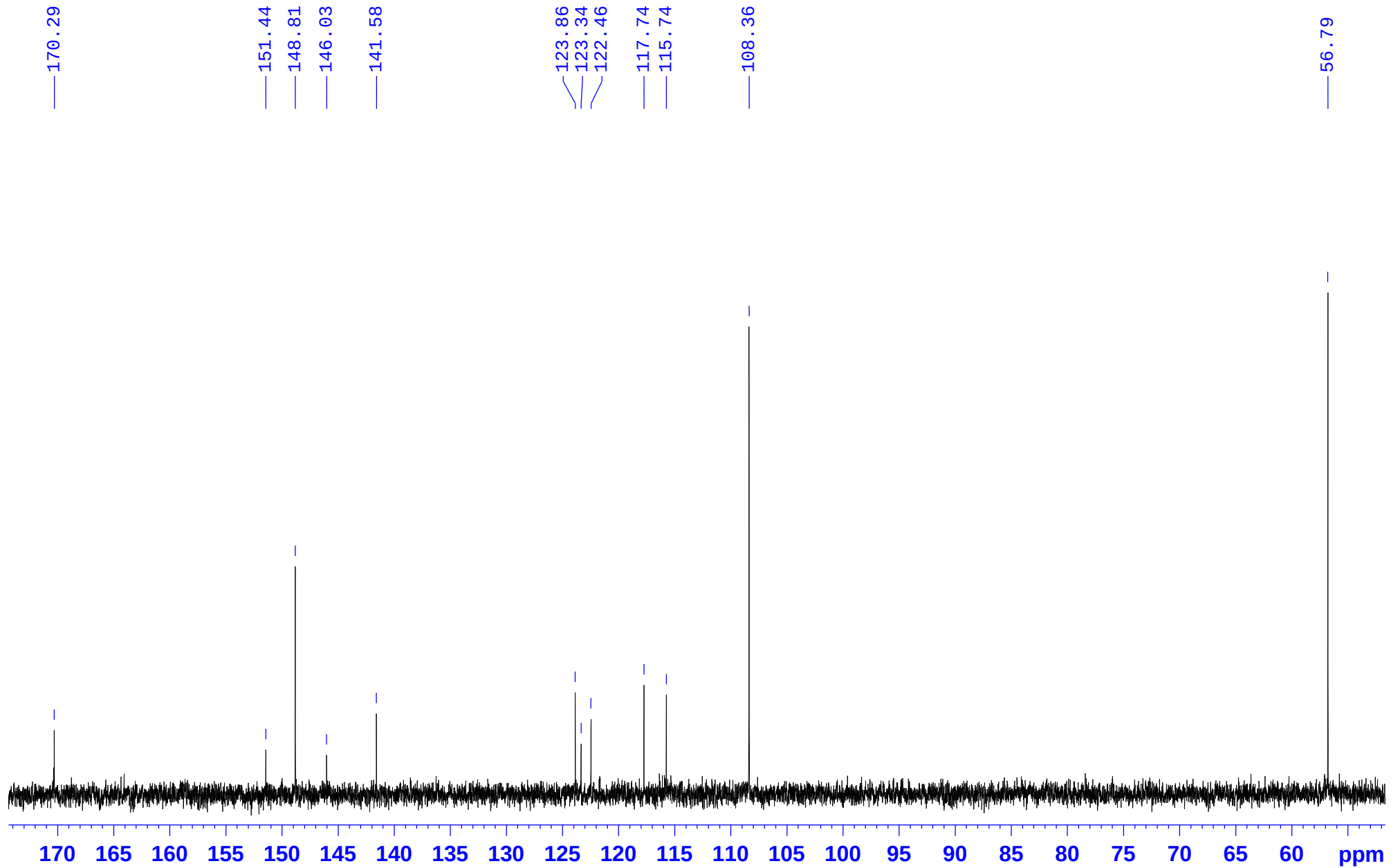
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200211
Time 12.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 256
DS 4
SWH 31250.000 Hz
FIDRES 0.476837 Hz
AQ 1.0485760 sec
RG 198.57
DW 16.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 125.7864591 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 88.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02 500.1910008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 22.00000000 W
PLW12 0.35764000 W
PLW13 0.17989001 W

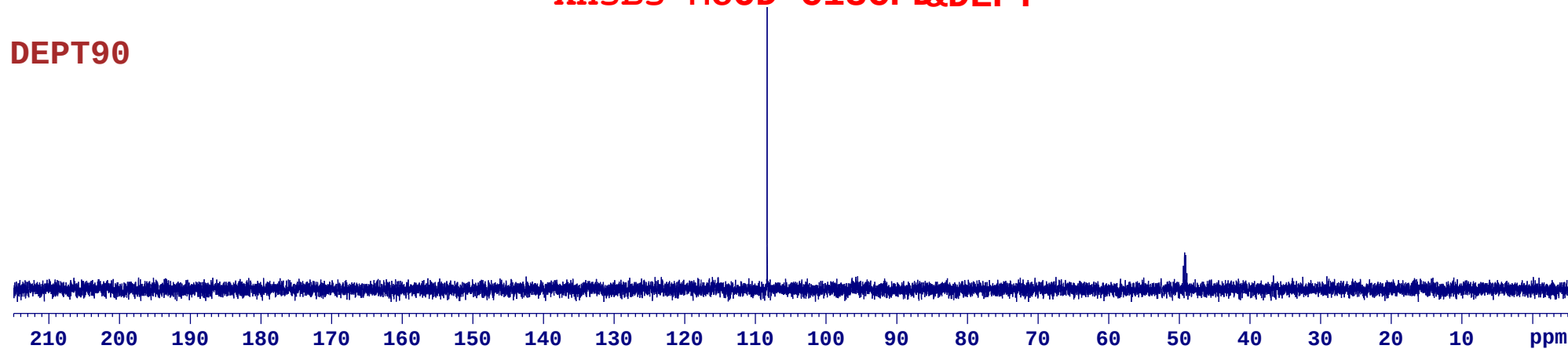
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7724498 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

MT2F2-MeOD-C13CPD

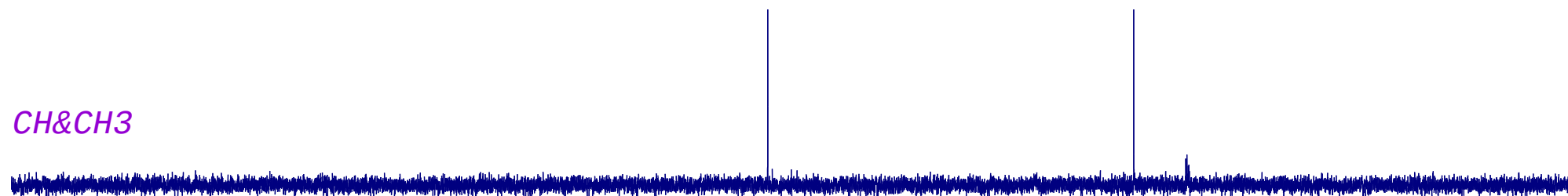


XH3B3 - MeOD - C13CPD&DEPT

DEPT90



DEPT135



CH&CH3

CH2

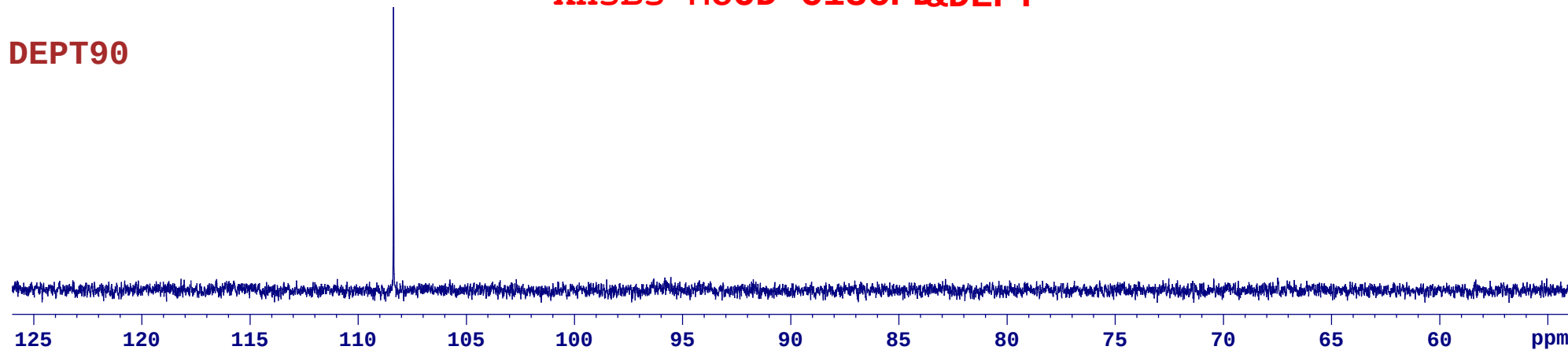


C13CPD

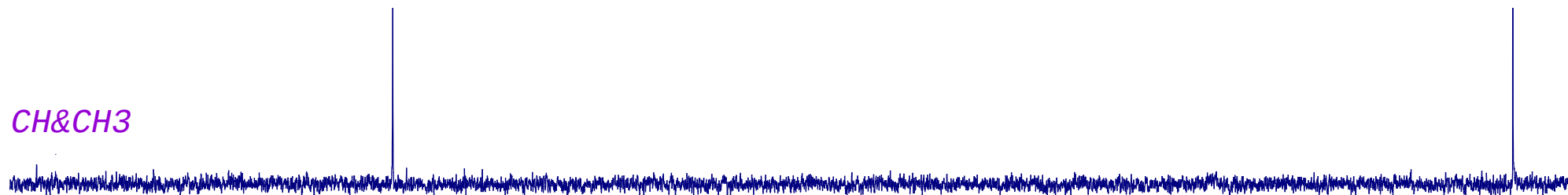


XH3B3 - MeOD - C13CPD&DEPT

DEPT90



DEPT135

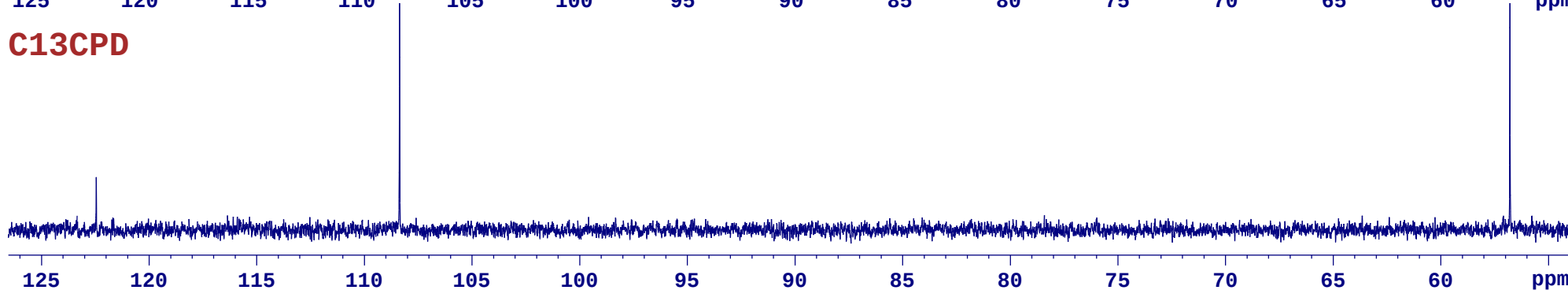


CH&CH3

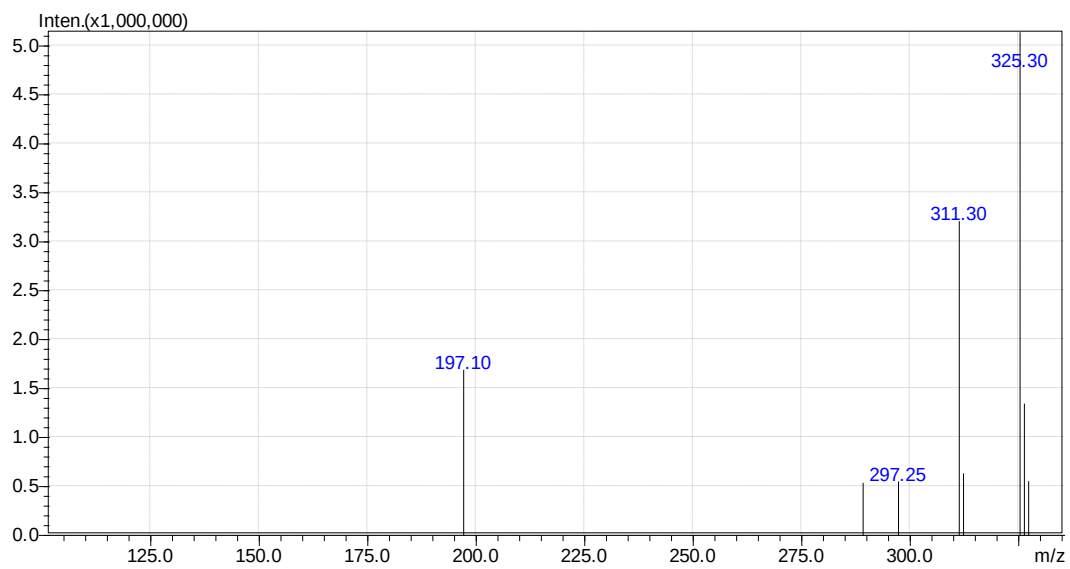
CH2

125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 ppm

C13CPD



125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 ppm



PHỤ LỤC 4
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP
CỦA CAO XÁU HỒ PHÂN ĐOẠN EtOAc

PHỤ LỤC 4: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH CẤP CỦA CAO XÁU HỔ PHÂN ĐOẠN EtOAc

1. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.1. Nguyên liệu

Thuốc nghiên cứu: Cao chiết lá cây Xấu hổ phân đoạn EtOAc.

1.2. Động vật nghiên cứu

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 18 – 22 g do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

1.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới và hướng dẫn của Bộ y tế Việt Nam về thuốc có nguồn gốc dược liệu. Xác định LD₅₀ của thuốc thử trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhin ăn qua đêm. Từng lô chuột nhắt trắng, mỗi lô 10 con, được uống thuốc nghiên cứu theo liều tăng dần. Tìm liều cao nhất không gây chết chuột (0%), liều thấp nhất gây chết chuột hoàn toàn (100%) và các liều trung gian. Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc nghiên cứu.

Cách pha thuốc trong đánh giá độc tính cấp: Lấy 24 gam cao dược liệu nghiên cứu trong cối sứ, thêm nước cất thành 80 ml vừa đủ. Như vậy 1 ml chứa 0,3 gam dược liệu. Đây là dung dịch đậm đặc nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống bằng kim chuyên dụng. Dung dịch đậm đặc này dùng để nghiên cứu độc tính cấp tính và xác định LD₅₀.

2. KẾT QUẢ

Chuột nhắt trắng được uống thuốc thử từ liều thấp nhất đến liều cao nhất có thể cho uống bằng kim chuyên dụng và không gây tắc kim. Chuột đã uống với thể tích tối đa là 0,2 ml/10 g chuột, 3 lần trong 24 giờ. Đây là lượng thuốc tối đa mà chuột có thể dung nạp được. Liều tối đa chuột đã uống là 60 ml/kg thể trọng chuột (tương đương 18 g cao dược liệu/kg thể trọng chuột) không có chuột nào chết nên không xác định được liều gây chết (lethal dose) và liều chết năm mươi phần trăm (LD₅₀) bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

Tuy nhiên ở liều 18 g/kg và liều 13,5 g/kg, chuột có hiện tượng giảm vận động và tiêu chảy sau lần uống thứ 2 và thứ 3, sau 24 giờ phân chuột trở về bình thường, ăn uống, vận động, hô hấp không xuất hiện gì bất thường trong suốt 6 ngày theo dõi tiếp theo. Còn ở liều 9 g/kg và 4,5 g/kg chuột không xuất hiện bất cứ triệu chứng bất thường nào, chuột vẫn tỉnh táo, lông mượt, phân khô, ăn uống vận động bình thường sau khi cho uống được liệu và trong 7 ngày theo dõi.

Lô	n	Liều (g cao được liệu/kg thể trọng chuột)	Số chuột chết	Dấu hiệu bất thường
1	10	4,5	0	Không
2	10	9,0	0	Không
3	10	13,5	0	3/10 chuột tiêu chảy sau uống lần 2, phân khô sau 24 giờ
4	10	18,0	0	5/10 chuột tiêu chảy sau uống lần 2, phân khô sau 24 giờ

3. KẾT LUẬN

Với các mức liều 4,5; 9; 13,5; 18 g/kg cân nặng, không thấy có biểu hiện độc cấp tính của chế phẩm Cao Xấu hổ phân đoạn EtOAc trên chuột nhắt trắng. Chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y Tế (2015). Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Ban hành kèm theo Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 do Cục trưởng Cục Khoa học công nghệ và Đào tạo ký.
2. World Health Organization (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, 28-29.
3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949). A simplified method of evaluating dose effect experiments, Journal Pharmacology Experimental Therapeutics, 96, 99-113.