

MỤC LỤC

| | |
|---|-----------|
| LỜI CẢM ƠN | 3 |
| LỜI CAM ĐOAN | 6 |
| DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT | 7 |
| DANH MỤC CÁC BẢNG | 9 |
| DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, BIỂU ĐỒ | 11 |
| ĐẶT VẤN ĐỀ | 1 |
| Chương 1. TỔNG QUAN | 3 |
| 1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG..... | 3 |
| 1.1.1. Định nghĩa, phân loại và tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường | 3 |
| 1.1.2. Cơ chế bệnh sinh đái tháo đường..... | 3 |
| 1.2. CÁC NHÓM THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG | 15 |
| 1.2.1. Các nhóm thuốc kích thích tăng tiết insulin tại tụy | 15 |
| 1.2.2. Các nhóm thuốc làm giảm kháng insulin..... | 19 |
| 1.2.3. Nhóm thuốc làm giảm/chậm hấp thu glucid | 21 |
| 1.2.4. Nhóm thuốc làm tăng thải trừ glucose ở ống thận..... | 22 |
| 1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐTĐ TRÊN THỰC NGHIỆM..... | 23 |
| 1.3.1. Các mô hình nghiên cứu in vivo. | 23 |
| 1.3.2. Các mô hình nghiên cứu invitro..... | 29 |
| 1.4. TỔNG QUAN VỀ CÁC THÀNH PHẦN CỦA ANDIABET VÀ CÁC NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ANDIABET | 31 |
| 1.4.1. Bằng lắng nước | 31 |
| 1.4.2. Giao cổ lam | 35 |
| 1.4.3. Tri mẫu | 37 |
| 1.4.4. Andiabet | 39 |
| Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU | 40 |
| 2.1.1. Chất liệu nghiên cứu | 40 |
| 2.1.2. Động vật nghiên cứu | 41 |
| 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 42 |
| 2.2.1. Phương pháp xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên Andiabet | 42 |
| 2.2.2. Phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose máu và sơ bộ cơ chế tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên thực nghiệm. | 44 |
| 2.3. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU | 52 |
| Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU..... | 54 |
| 3.1. ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN ANDIABET | 54 |
| 3.1.1. Độc tính cấp | 54 |
| 3.1.2. Độc tính bán trường diễn | 54 |
| 3.2. TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU VÀ MỘT SỐ CƠ CHẾ TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU CỦA VIÊN ANDIABET TRÊN THỰC NGHIỆM... | 64 |
| 3.2.1. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường..... | 64 |
| 3.2.2. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2..... | 65 |
| 3.2.3. Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống glucose / sucrose / tinh bột của Andiabet. | 76 |
| 3.2.4. Ảnh hưởng của Andiabet đến mức kháng insulin của chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2..... | 87 |
| Chương 4. BÀN LUẬN..... | 89 |
| 4.1. VỀ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA ANDIABET.... | 89 |
| 4.1.1. Về độc tính cấp của Andiabet | 89 |
| 4.1.2. Về độc tính bán trường diễn của Andiabet | 90 |

| | |
|--|--------------|
| 4.2. TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU VÀ MỘT SỐ CƠ CHẾ TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU CỦA VIÊN ANDIABET TRÊN THỰC NGHIỆM... | 95 |
| 4.2.1. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường..... | 95 |
| 4.2.2. Tác dụng HGM của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2..... | 97 |
| 4.2.3. Về khả năng ức chế dung nạp glucose của viên Andiabet sau uống glucose/sucrose/ tinh bột trên chuột nhắt trắng bình thường và chuột gây đái tháo đường typ 2..... | 113 |
| 4.2.4. Ảnh hưởng của Andiabet đến mức kháng insulin của chuột gây ĐTĐ typ 2..... | 124 |
| KẾT LUẬN | 132 |
| KIẾN NGHỊ | 134 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ | 135 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 136 |
| PHỤ LỤC | |
| PHỤ LỤC 1: Quy trình sản xuất viên nang155 | |
| PHỤ LỤC 2: Tiêu chuẩn viên nang cứng Andiabet | |

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ chân thành và quý báu của các tập thể, thầy cô giáo, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và người thân.

- Trước tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và sự kính trọng tới PGS.TS Nguyễn Trọng Thông và PGS. TS. Đào Thị Vui. Những người thầy đã tận tình hướng dẫn, quan tâm giúp đỡ cũng như động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

- Ban Giám hiệu, phòng Sau đại học trường Đại học Y Hà Nội và anh Nguyễn Phi Hùng - người trực tiếp quản lý nghiên cứu sinh đã rất nhiệt tình và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

- Cảm ơn tập thể Thầy Cô giáo, các anh chị em giảng viên, kỹ thuật viên, nghiên cứu sinh, cao học và nội trú Bộ môn Dược Lý trường ĐH Y Hà Nội đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và làm thực nghiệm tại bộ môn.

- Cảm ơn chị Phạm Thị Vân Anh, trưởng BM Dược lý, giám đốc trung tâm Dược lý lâm sàng, trường ĐH Y HN. Chị không chỉ động viên bằng lời nói mà bằng thái độ quyết liệt, bằng những việc làm cụ thể tìm mọi cách tháo gỡ cho đề tài của tôi.

- Cảm ơn Ban Giám Hiệu trường Đại học Dược Hà Nội, các phòng ban chức năng, cá nhân đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi đi học và hoàn thành việc học. Đặc biệt tôi muốn gửi lời cảm ơn Thầy PGS.TS. Nguyễn Đăng Hòa nguyên hiệu trưởng nhà trường đã giúp đỡ tôi trong lúc khó khăn nhất.

- Cảm ơn tập thể cán bộ giảng viên, kỹ thuật viên BM YHCS trường ĐH Dược HN đã giúp đỡ, tạo điều kiện cho tôi hoàn thành tốt nhiệm vụ giảng dạy tại BM.

- Cảm ơn Lụa, Đông, các em phòng y tế đã chia sẻ, gánh vác giúp tôi những

công việc hàng ngày để tôi có thời gian tập trung cho học tập.

- Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc sự giúp đỡ quý báu của các bạn bè, đồng nghiệp tại trường ĐH Y HN, trường Đại Học Dược HN.

- Cuối cùng, tôi xin cảm ơn tất cả những người thân trong gia đình đã luôn hết lòng ủng hộ, chia sẻ khó khăn và động viên tôi hoàn thành luận án này.

NCS. Nguyễn Thị Hương Giang

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Hương Giang, nghiên cứu sinh khóa 32 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Dược lý và độc chất, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy: PGS. TS Nguyễn Trọng Thông và PGS. TS Đào Thị Vui.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng 10 năm 2019

Người viết cam đoan

Nguyễn Thị Hương Giang

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|---------|---|
| ADA | Hiệp hội đái tháo đường Hoa Kỳ (American Diabetes Association) |
| ALT | Alanin transaminase |
| AMPK | Adenosine Monophosphate (AMP) – activated Protein Kinase |
| AST | Aspartate transaminase |
| AUC | Diện tích dưới đường cong (Area Under Curve) |
| BLN | Bảng Lãng Nước |
| BMI | Chỉ số khối cơ thể (Body Mass Index) |
| CS | Cộng sự |
| DC | Dịch chiết |
| DNG | Dung nạp glucose |
| DPP - 4 | Enzyme dipeptidyl peptidase – 4 |
| ĐTĐ | Đái tháo đường |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FFA | Acid béo tự do (Free Fatty Acid) |
| [G] | Nồng độ glucose máu |
| G6Pase | Glucose-6-phosphatase |
| GCL | Giảo Cổ Lam |
| GIP | Peptid hướng insulin phụ thuộc glucose (Gastric inhibitory polypeptide) |
| GLP – 1 | Peptid giống glucagon - 1 (Glucagon like peptide - 1) |
| HbA1C | Hemoglobin A1c |
| HDL-C | Lipoprotein cholesterol tỷ trọng cao (High Density Lipoprotein - Cholesterol) |
| HFD | Chế độ ăn giàu chất béo (High fat diet) |
| HGM | Hạ glucose máu |
| LD50 | Liều gây chết 50% (Lethal dose 50) |

| | |
|-----------------|---|
| LDL - C | Lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp (Low density lipoprotein - cholesterol) |
| MF | Mangiferin |
| mTOR | mammalian target of the rapamycin |
| NFD | Chế độ ăn bình thường (Nomal fat diet) |
| IDF | Hiệp hội đái tháo đường Quốc tế (International Diabetes Federation) |
| PBG | Đỉnh glucose máu (Peak Blood Glucose) |
| PĐ | Phân đoạn |
| PKA | Protein kinase A |
| PEPCK | Phosphoenolpyruvate carboxykinase |
| PGC1 | Proliferator- activated receptor γ coactivator- 1 |
| PPAR γ | Peroxisome proliferator-activated receptor γ |
| PI3K | Phosphatidyl-inositol 3-kinase |
| SLGT-1 & SLGT-2 | Kênh đồng vận chuyển Na - glucose 1 và 2 (Sodium-glucose cotransporter 1&2) |
| STZ | Streptozotocin |
| TC | Cholesterol toàn phần (Total Cholesterol) |
| TG | Triglycerid |
| TM | Tri Mẫu |
| WHO | Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization) |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | |
|---|-----------|
| <i>Bảng 1.1. Tóm tắt tác dụng điều trị đái tháo đường của Bằng lăng nước.....</i> | <i>33</i> |
| <i>Bảng 1.2. Tóm tắt một số cơ chế tác dụng hạ glucose máu của Bằng lăng nước, được nghiên cứu trên invitro.....</i> | <i>34</i> |
| <i>Bảng 1.3. Tóm tắt tác dụng điều trị ĐTĐ của Bằng lăng nước trên người. ..</i> | <i>35</i> |
| <i>Bảng 1.4. Tóm tắt các nghiên cứu về tác dụng điều trị ĐTĐ của Giáo cổ Lam.....</i> | <i>36</i> |
| <i>Bảng 1.5. Tóm tắt các nghiên cứu về tác dụng điều trị ĐTĐ của Tri mẫu....</i> | <i>38</i> |
| | |
| <i>Bảng 2.1. Thành phần viên Andiabet</i> | <i>40</i> |
| <i>Bảng 2.2. Chế độ ăn NFD và HFD tính trên 100g thức ăn.</i> | <i>46</i> |
| | |
| <i>Bảng 3.1. Kết quả độc tính cấp của viên Andiabet</i> | <i>54</i> |
| <i>Bảng 3.2. Ảnh hưởng của Andiabet đến cân nặng thỏ.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Bảng 3.3. Ảnh hưởng của Andiabet đến các chỉ số huyết học trong máu thỏ</i> | <i>56</i> |
| <i>Bảng 3.4. Ảnh hưởng của Andiabet đến công thức bạch cầu trong máu thỏ.</i> | <i>57</i> |
| <i>Bảng 3.5. Ảnh hưởng của Andiabet đến chức năng gan thỏ.....</i> | <i>58</i> |
| <i>Bảng 3.6. Ảnh hưởng của Andiabet đến chức năng thận thỏ.....</i> | <i>62</i> |
| <i>Bảng 3.7. Nồng độ glucose máu của chuột nhắt trắng bình thường sau 2 tuần uống chế phẩm thử Andiabet.....</i> | <i>64</i> |
| <i>Bảng 3.8. Sự thay đổi cân nặng chuột tại các thời điểm nghiên cứu.....</i> | <i>65</i> |
| <i>Bảng 3.9. Sự biến đổi nồng độ glucose máu chuột sau 8 tuần.....</i> | <i>66</i> |
| <i>Bảng 3.10. Ảnh hưởng của viên nang lên nồng độ glucose máu của chuột nhắt trắng ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống thuốc.....</i> | <i>67</i> |
| <i>Bảng 3.11. Ảnh hưởng của viên Andiabet lên nồng độ lipid máu của chuột nhắt trắng ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống thuốc.....</i> | <i>68</i> |
| <i>Bảng 3.12. Cân nặng gan của chuột ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống thuốc.....</i> | <i>69</i> |

| | |
|--|----|
| Bảng 3.13. Cân nặng tụy của chuột ĐTD typ 2 sau 2 tuần uống thuốc..... | 70 |
| Bảng 3.14. Vi thể gan chuột sau 2 tuần uống thuốc thử | 72 |
| Bảng 3.15. Vi thể tụy chuột sau 2 tuần uống thuốc thử..... | 74 |
| Bảng 3.16. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống glucose (2g/kg) ở chuột bình thường | 77 |
| Bảng 3.17. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu..... | 78 |
| Bảng 3.18. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu | 80 |
| Bảng 3.19. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống glucose (2g/kg) ở chuột gây ĐTD typ 2 | 82 |
| Bảng 3.20. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống sucrose (4g/kg) ở chuột gây ĐTD typ 2 | 84 |
| Bảng 3.21. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu | 86 |

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, BIỂU ĐỒ

| | |
|---|----|
| Hình 1.1. Con đường truyền tín hiệu của insulin..... | 10 |
| Hình 1.2. Các yếu tố điều hòa ngược con đường truyền tín hiệu insulin | 10 |
| Hình 1.3. Mối liên hệ giữa chuyển hóa glucose và acid béo trong tế bào..... | 11 |
| Hình 1.4. Con đường mTOR/S6K1 và AMPK trong kháng insulin..... | 14 |
| Hình 1.5. Cơ chế bài tiết insulin..... | 16 |
| | |
| Hình 2.1. Sơ đồ cách tiến hành thí nghiệm kẹp..... | 50 |
| Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm “kẹp” insulin..... | 51 |
| | |
| Hình 3.1. Hình thái vi thể gan thỏ sau 90 ngày uống chế phẩm thử Andiabet | 61 |
| Hình 3.2. Hình thái vi thể thận thỏ sau 90 ngày uống chế phẩm thử Andiabet | 63 |
| Hình 3.3. Hình ảnh đại thể gan chuột sau 2 tuần uống thuốc thử..... | 71 |
| Hình 3. 4. Hình ảnh đại thể tụy chuột sau 2 tuần uống thuốc thử..... | 74 |
| Hình 3.5 Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống sucrose (4g/kg) trên chuột bình thường..... | 79 |
| Hình 3.6. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống tinh bột (6g/kg) trên chuột bình thường..... | 81 |
| Hình 3.7. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống glucose (2g/kg) trên chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2. | 83 |
| Hình 3.8. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống sucrose (4g/kg) trên chuột gây ĐTĐ typ 2..... | 85 |
| Hình 3.9. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống tinh bột (6g/kg) trên chuột gây ĐTĐ typ 2. | 87 |

| | |
|--|-----|
| Hình 3.10. <i>Nồng độ glucose máu trong test kẹp insulin – đấng glucose ở chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2.</i> | 88 |
| Hình 3.11. <i>Tốc độ truyền glucose trong test kẹp insulin – đấng glucose ở chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2.</i> | 88 |
| Hình 4.1. <i>Rối loạn chuyển hóa trong bệnh ĐTĐ typ 2</i> | 109 |

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, cùng với ung thư và tim mạch, đái tháo đường là một trong ba bệnh có số bệnh nhân tăng nhanh nhất. Theo ước tính mới nhất từ Hiệp hội đái tháo đường Quốc tế (IDF-International Diabetes Federation) tỷ lệ hiện mắc đái tháo đường là 8,4% dân số trưởng thành trên toàn thế giới. Số lượng bệnh nhân đái tháo đường liên tục tăng, ước tính đến tháng 11/2017 có hơn 425 triệu người mắc bệnh ĐTĐ và dự báo đến năm 2045 số người mắc bệnh ĐTĐ là 629 triệu người [1].

Đái tháo đường (ĐTĐ) typ 2 là bệnh rối loạn chuyển hóa có cơ chế phức tạp. Các thuốc điều trị ĐTĐ có nguồn gốc tổng hợp hóa học hiện nay có đặc điểm không phù hợp với mọi người bệnh và thường kèm theo nhiều tác dụng không mong muốn. Người bệnh có xu hướng phải tăng liều, phải phối hợp thuốc sau một thời gian điều trị [2]. Nhằm khắc phục những điểm bất cập này, xu hướng nghiên cứu, kết hợp các thuốc có nguồn gốc dược liệu đang ngày càng thu hút được sự quan tâm không chỉ của người dân mà còn của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Liệu pháp kết hợp là một lựa chọn tốt trên lâm sàng, bởi vì việc kết hợp các thuốc có thể làm tăng khả năng hạ glucose máu do tác động trên nhiều đích tác dụng khác nhau, bổ sung, nâng cao hiệu quả điều trị của thuốc, đồng thời giúp giảm liều dùng, giảm tác dụng phụ.

Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu là các dược liệu đã được chứng minh riêng rẽ về hiệu quả trị bệnh ĐTĐ qua nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng [3], [4], cũng như đã được kết hợp với nhau thành dạng cao mềm Vinabetes. Tuy nhiên, cao mềm Vinabetes chỉ mới được chiết xuất trong điều kiện phòng thí nghiệm và chưa có các nghiên cứu dược lý đầy đủ.

Với mong muốn tạo ra một sản phẩm có tác dụng điều trị ĐTĐ hiệu quả, công ty Traphaco đã nghiên cứu chiết xuất và bào chế cao từ thân, lá, rễ Giảo

cỏ lam, thân rễ Tri mẫu và lá Bằng lăng nước, tạo ra viên nang cứng Andiabet theo quy mô công nghiệp. Tuy nhiên câu hỏi được đặt ra: khi thay đổi quy trình chiết xuất và dạng bào chế có làm thay đổi độc tính cũng như tác dụng của Andiabet hay không?

Để trả lời câu hỏi trên đề tài “Nghiên cứu độc tính và tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên thực nghiệm” được tiến hành nhằm các mục tiêu sau:

- 1. Xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên Andiabet.*
- 2. Đánh giá tác dụng và sơ bộ cơ chế tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên thực nghiệm.*

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

1.1.1. Định nghĩa, phân loại và tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường

Theo định nghĩa của “Ủy ban chẩn đoán và phân loại bệnh đái tháo đường Mỹ”, “Đái tháo đường là một bệnh rối loạn chuyển hóa có đặc điểm là tăng glucose máu, hậu quả của sự thiếu hụt tiết insulin; khiếm khuyết trong hoạt động của insulin; hoặc cả hai. Tăng glucose máu mạn tính thường kết hợp với hủy hoại, rối loạn và suy yếu chức năng của nhiều cơ quan, đặc biệt là mắt, thận, thần kinh, tim và mạch máu” [5].

Theo phân loại của hiệp hội đái tháo đường Mỹ (ADA) cập nhật năm 2019 [6], đái tháo đường (ĐTĐ) được chia làm 4 loại: ĐTĐ typ 1, ĐTĐ typ 2, ĐTĐ thai kỳ và các type đặc biệt khác. Trong đó ĐTĐ typ 1 và typ 2 là hay gặp nhất.

Tiêu chuẩn chẩn đoán ĐTĐ của ADA năm 2019 cũng không khác biệt so với các năm trước. Đó là [6]:

- Glucose máu tĩnh mạch lúc đói $\geq 126\text{mg/dL}$ (7mmol/L). Đói là khi không nạp năng lượng trên 8h.
- Hoặc glucose máu tĩnh mạch sau 2 giờ làm nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống $\geq 200\text{mg/dL}$ (11.1mmol/L). Test được thực hiện theo hướng dẫn của WHO, sử dụng 75g glucose (loại anhydrous) pha trong nước.
- Hoặc HbA1C $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol). Xét nghiệm này phải được thực hiện ở phòng thí nghiệm được chuẩn hóa theo tiêu chuẩn quốc tế.
- Hoặc glucose máu bất kì $\geq 200\text{mg/dL}$ (11.1mmol/l) kèm theo các triệu chứng kinh điển của tăng glucose máu hoặc cơn tăng glucose máu.

1.1.2. Cơ chế bệnh sinh đái tháo đường

1.1.2.1. Cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 1

ĐTĐ typ 1 là một rối loạn tự miễn mạn tính xảy ra ở những người có

tính miễn cảm di truyền kết hợp với các yếu tố môi trường, cuối cùng dẫn tới sự phá hủy các tế bào β tuyến tụy và thiếu hụt insulin [7]. Yếu tố môi trường sẽ đóng vai trò khởi động quá trình bệnh lý ở những người có miễn cảm di truyền. Những yếu tố từ môi trường bên ngoài thường đề cập nhất là: Virus (Coxsackie, Cytomegalovirus, Epstein-Bar, Rubella, Measles, Varicella zoster), sau đó là sữa bò, điều kiện sống (stress, thường xuyên tiếp xúc với các độc chất với tế bào β như thuốc diệt cỏ vascor...) có thể là những yếu tố ban đầu gây phá hủy và làm tăng quá trình phá hủy các tế bào β của tuyến tụy [8].

Hệ thống miễn dịch của cơ thể tấn công các tế bào β trong tiểu đảo Langerhans của tuyến tụy, phá hủy tụy dẫn đến giảm sút và tiến tới ức chế hoàn toàn sản xuất insulin [9]. Về mô bệnh học, đảo tụy bị thâm nhiễm các tế bào lympho (gọi là insulitis). Những nghiên cứu về quá trình tự miễn dịch ở người và trên các mô hình động vật ĐTD typ 1 (chuột nhắt NOD và chuột cống BB) đã xác định các bất thường trong hệ thống miễn dịch thể và tế bào. Đó là:

- Xuất hiện tự kháng thể kháng tế bào tiểu đảo (ICAs). ICAs được coi như là một dấu ấn của quá trình tự miễn dịch trong ĐTD typ 1.
- Hoạt hóa tế bào lympho ở tiểu đảo, hạch bạch huyết quanh tuyến tụy và hệ thống tuần hoàn ngoại vi; ĐTD typ 1 được định nghĩa là "một bệnh tự miễn, trong đó các tế bào TCD4⁺ và TCD8⁺ xâm nhập tiểu đảo Langerhans, dẫn đến phá hủy tế bào β ".
- Tế bào lympho T sinh sôi khi bị kích thích bởi protein tiểu đảo;
- Phóng thích các cytokins trong khi viêm đảo tụy như yếu tố hoại tử khối u TNF- α , interferon γ , và interleukin 1 (IL-1) phá hủy các tế bào β .

Khi các tế bào β tuyến tụy chưa bị phá hủy nhiều, lượng insulin máu vẫn đủ cho nhu cầu hoạt động cơ thể, thì lâm sàng chưa biểu hiện gì, đây là giai đoạn tiền ĐTD, có thể ngắn hoặc dài tùy từng cá thể. Khi tế bào β bị phá hủy ngày càng nhiều (~85%), lượng insulin sản xuất không đáp ứng đủ nhu cầu

hoạt động cơ thể, glucose máu sẽ tăng lên, lúc này biểu hiện lâm sàng đã rõ và được chẩn đoán là ĐTĐ [10].

1.1.2.2. Cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 2

Kháng insulin ở mô ngoại vi và rối loạn bài tiết insulin là 2 yếu tố đóng vai trò quan trọng và liên hệ mật thiết nhau trong cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 2, thường xảy ra trước khi có biểu hiện lâm sàng của ĐTĐ (ngay từ giai đoạn tiền ĐTĐ). Mặc dù còn rất nhiều tranh cãi, nhưng hầu hết các nghiên cứu đều ủng hộ quan điểm kháng insulin xuất hiện trước sự thiếu hụt bài tiết insulin [7]. Tuy nhiên, ở các bệnh nhân ĐTĐ typ 2 không thừa cân, biểu hiện giảm tiết insulin là chính, ngược lại ở các bệnh nhân ĐTĐ typ 2 có kèm béo phì, tình trạng kháng insulin là chính. Trong thực tế khi glucose máu đã ở mức cao (>10mmol/L) thì cả quá trình bài tiết insulin của tế bào β và khả năng hoạt động của insulin đều bị suy giảm nặng. Các yếu tố gen và môi trường đóng vai trò thúc đẩy làm phát sinh và phát triển bệnh [7]. Nhiều nghiên cứu dịch tễ cho thấy có sự liên quan giữa việc xem ti vi thường xuyên, ít vận động thể lực, chế độ ăn nhiều calo, béo phì, đặc biệt ở người cao tuổi, thì nguy cơ ĐTĐ typ 2 tăng lên rất cao [10].

**** Rối loạn bài tiết insulin***

Trong điều kiện sinh lý, glucose máu được duy trì do sự cân bằng giữa độ nhạy cảm insulin và bài tiết insulin. Khi độ nhạy cảm insulin giảm, bài tiết insulin sẽ tăng để duy trì nồng độ glucose máu. Nhưng nếu bài tiết insulin tăng cao vẫn không đáp ứng được sự giảm độ nhạy cảm insulin, sẽ dẫn đến rối loạn dung nạp glucose. Bệnh ĐTĐ typ 2 chỉ biểu hiện lâm sàng khi tế bào β đảo tụy bị tổn thương không còn khả năng đưa glucose máu về giới hạn bình thường [11].

Các nghiên cứu đều chỉ ra rằng ở những bệnh nhân ĐTĐ typ 2, chức năng tế bào β suy giảm trên 80% và khối lượng tế bào β cũng giảm 30% - 40% [11]. Như vậy đặc điểm giống nhau về cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 1 và typ

2 là đều có suy giảm khối lượng - chức năng tế bào β đảo tụy. Tuy nhiên nguyên nhân và mức độ thâm hụt khác nhau giữa ĐTĐ typ 1 và typ 2. Đối với ĐTĐ type 1, nguyên nhân chủ yếu của hiện tượng này là do tự miễn và thường diễn ra nhanh chóng, còn ĐTĐ typ 2 sự suy giảm khối lượng - chức năng tế bào β thường xảy ra từ từ, tương quan nhau và tăng dần theo thời gian mắc bệnh [11]. Nguyên nhân chính dẫn đến suy giảm khối lượng - chức năng tế bào β ở ĐTĐ typ 2 được cho là do sự chết theo chương trình của các tế bào β tăng lên, trong khi không có sự tái tạo tế bào β cũng như sự tân tạo giảm [11],[12]. Một số cơ chế gây ra sự chết theo chương trình của tế bào β đã được đề xuất như sau:

- Glucose máu tăng cao và kéo dài kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin, sự kích thích lâu dài dẫn đến kiệt quệ các tế bào β , giảm đáp ứng của các tế bào này và ảnh hưởng trực tiếp đến dẫn truyền tín hiệu, đến các biểu hiện gen và đến cấu trúc tế bào β đảo tụy, đồng thời gây tăng stress oxy hóa trong tế bào β đảo tụy, cuối cùng gây suy giảm chức năng tiết insulin [12], [13].
- Acid béo tăng cao và kéo dài đồng thời với mức glucose máu tăng cao sẽ ảnh hưởng ngược đến sự chuyển đổi từ proinsulin thành insulin và thậm chí ảnh hưởng đến sự bài tiết insulin [12]. Sự tiếp xúc kéo dài của các tế bào β với mức dư thừa acid béo (thường gặp ở người ĐTĐ typ 2 béo phì) gây ức chế sự bài tiết insulin, có thể ở giai đoạn xuất bào. Acid béo còn gây suy giảm gen biểu hiện insulin theo một cơ chế khác với cơ chế ức chế bài tiết insulin và có thể gây ra sự chết theo chương trình của tế bào β trong môi trường có nồng độ glucose cao [7], [13]. Như vậy nếu không điều chỉnh được nồng độ glucose máu cao và nồng độ lipid máu cao, số phận của tế bào β tiếp tục bị tấn công bởi độc tính của glucose và lipid, kéo dài vĩnh viễn vòng xoáy ốc đi xuống, làm suy giảm chức năng của tế bào β và dẫn đến cái chết [13].
- Sự tích lũy các amyloid (một polypeptid có khả năng gây độc đối với đảo tụy sự giảm tiết GLP- 1(glucagon like peptid -1) hoặc giảm tác dụng của GIP

(glucose-dependent insulintropic polypeptid) là những nguyên nhân gây suy giảm chức năng tiết insulin của đảo tụy [7], [12], [14].

- Các nguyên nhân khác góp phần làm suy giảm khối lượng - chức năng của tế bào β như: Stress oxy hóa, sản xuất cytokine viêm, rối loạn chức năng ti thể, stress lưới nội bào (ER) và rối loạn chức năng tự thực bào (autophagy) [11].

* *Kháng insulin*

Kháng insulin là tình trạng giảm hoặc mất tính nhạy cảm của cơ quan đích với insulin, được coi là khiếm khuyết ban đầu hoặc khiếm khuyết chính trong cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 2 [15]. Kháng insulin là tình trạng lượng insulin do tuyến tụy bài tiết không đủ đáp ứng chức năng của các tế bào trong cơ thể. Để duy trì nồng độ glucose máu bình thường, tế bào β phải tăng tiết thêm insulin bù trừ hiện tượng kháng insulin và hậu quả làm tăng nồng độ insulin máu. Nên kháng insulin cũng được coi là nguyên nhân gián tiếp dẫn đến suy kiệt khả năng tiết insulin của tuyến tụy.

* Cơ chế phân tử của kháng insulin trong ĐTĐ typ 2.

Mặc dù cơ chế phân tử của kháng insulin còn chưa được hiểu đầy đủ, nhưng ở mức độ tế bào, kháng insulin có thể do các nguyên nhân trước receptor, tại receptor và sau receptor.

- Các khiếm khuyết trước receptor insulin thường liên quan đến đột biến gen nên hiếm khi xảy ra. Một số cá thể có kiểu gen mắc cảm liên quan đến kháng insulin như: gen GRB14 (growth factor receptor-bound 14), HMGA1 (high Mobility group A1), SREBF1 (sterol regulatory element - binding transcription factor 1)... nhưng không phải lúc nào cũng mắc bệnh ĐTĐ, mà còn phụ thuộc vào yếu tố ngoại cảnh [16].

- Nguyên nhân tại receptor insulin: Đột biến gen mã hóa receptor của insulin (IR- Insulin receptor) là khiếm khuyết tại receptor ít gặp, chỉ chiếm tỷ lệ khoảng 0,4 - 7,8% [10]. Sau khi được tiết ra insulin sẽ gắn với các tiểu đơn vị α của

IR. Gen mã hóa receptor của insulin có 22 exon tạo ra 2 isoform khác nhau ở exon thứ 11, giữ lại exon thứ 11 là a-isoform (IRa), bỏ đi exon thứ 11 là b-isoform (IRb). Receptor tương ứng với gen đột biến mang exon 11 (IRa) có ái lực gắn insulin giảm đáng kể so với IRb, dẫn đến kháng insulin và làm tăng cao nồng độ insulin trong máu.

- Nguyên nhân sau receptor insulin: bất thường trong con đường truyền tin nội bào của insulin là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến kháng insulin đối với ĐTĐ typ 2.

Con đường truyền tín hiệu của insulin rất phức tạp, có thể tóm tắt ngắn gọn: Sau khi insulin gắn vào tiểu đơn vị α của IR, thông tin sẽ được truyền qua màng tế bào tới vùng trong bào tương của các tiểu đơn vị β , kích thích hoạt tính tyrosin kinase nội tại trong tiểu đơn vị β , dẫn đến sự tự phosphoryl hóa IR và tiếp nhận các phân tử tín hiệu trong tế bào đó là các cơ chất của receptor insulin (IRSs - Insulin receptor substrates). Sự tương tác của IRS với một số các phân tử tín hiệu trung gian khác sẽ khởi động các thác phản ứng phosphoryl hóa và khử phosphoryl hóa phức tạp, dẫn đến tác dụng rộng rãi trên chuyển hóa và phân bào của insulin. Cụ thể là các thác tín hiệu được hoạt hóa theo ba con đường khác nhau: con đường PI3K (phosphatidylinositol - 3 kinase), con đường MARK (mitogen - activated protein kinase) và con đường CAP (Cbl - associated protein). Trong đó PI3K là con đường chính [17].

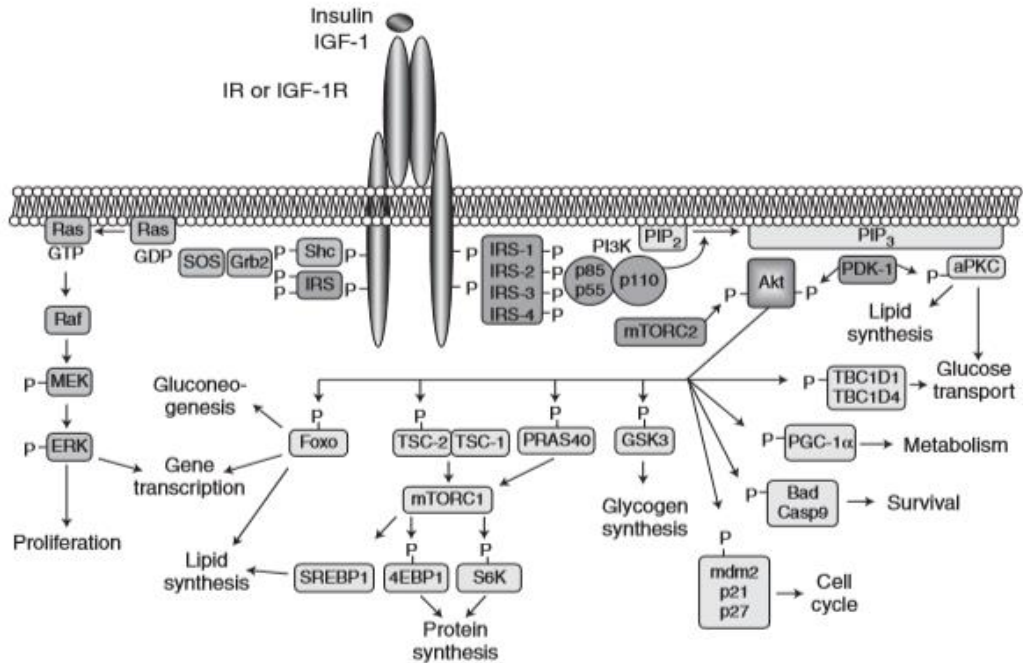
Các tác dụng quan trọng của insulin, cũng như hầu hết các hiệu ứng chuyển hóa đều xuôi dòng thác tín hiệu PI3K→Akt. Sau khi được hoạt hóa IRS cho phép sự gắn và hoạt động của PI3K. Các PI3K sau khi gắn vào IRS sẽ được hoạt hóa và xúc tác cho sự phosphoryl hóa phân tử phospholipid màng là PIP2 (Phosphatidyl-inositol (4,5) - biphosphat) ở vị trí 3' tạo ra PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5) - triphosphate). Phân tử phospholipid này gắn với vùng pleckstrin homology (PH) của PDK1 và PDK2 (PI3K - dependent serin/threonin kinase - 1 và - 2), tiếp tục gây phosphoryl hóa protein kinase B

(PKB hay còn gọi là Akt) ở các vị trí serin 473 và threonin 308. Tất cả các yếu tố này dẫn đến việc hoạt hóa đầy đủ Akt. Akt được hoạt hóa sẽ phosphoryl hóa các cơ chất của nó và điều hòa hoạt tính của một số protein xuôi dòng liên quan nhiều đến quá trình sinh lý trong tế bào. Ức chế PI3K bởi các chất hóa học hoặc gen sẽ khóa hầu như tất cả các đáp ứng chuyển hóa do insulin kích thích gồm: nhập glucose, tổng hợp glycogen và lipid, biệt hóa tế bào mỡ. Khẳng định rằng PI3K là điểm nút quan trọng đồng tác dụng với insulin. Còn Akt đóng vai trò trung tâm trong tế bào sinh vật do nó phosphoryl hóa và điều hòa hoạt tính các protein kiểm soát sự sống còn, sự phát triển, tăng trưởng, tân sinh mạch, chuyển hóa và phân bào như: AS160 (chuyển vị trí GLUT4, thúc đẩy sự hấp thu glucose), Bad (yếu tố gây chết tế bào), mTOR (mamalian target of rapamicin, thúc đẩy tổng hợp protein, tăng cường hấp thu và tổng hợp acid béo), Gsk3 β (glycogen synthase kinase-3 β , tổng hợp glycogen), Tsc2 (tuberous sclerosis protein-2, tổng hợp protein), nhưng quan trọng nhất Akt điều hòa sự chuyển hóa và sống còn bằng cách kiểm soát sự biểu hiện của nhiều gen thông qua các yếu tố phiên mã như forkhead Foxo1, SREBP1c [17], [18], [19]. (Hình 1.1[20]).

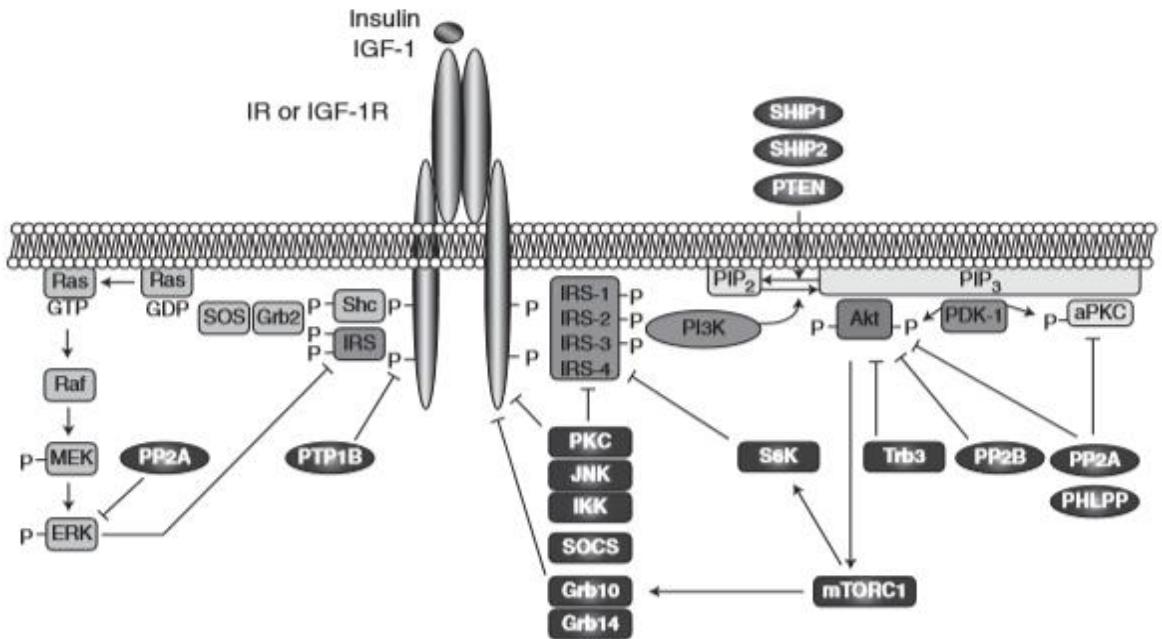
Nhiều nghiên cứu cho thấy con đường truyền tin nội bào của insulin có thể bị ức chế bởi một số các yếu tố do tác dụng của sự phosphoryl hóa hoặc bởi các phân tử protein ức chế. Các yếu tố này gây kháng insulin do tác dụng điều hòa ngược vào con đường tín hiệu của insulin [20]. (Hình 1.2)

Một số yếu tố đã được đề xuất để giải thích các cơ chế của kháng insulin như: béo phì; viêm; rối loạn chức năng ti thể; tăng insulin máu; lipotoxicity/tăng lipid máu; yếu tố di truyền; stress lưới nội bào; lão hóa; stress oxy hóa; gan nhiễm mỡ; giảm oxy máu; rối loạn chuyển hoá mỡ; mang thai [21]. Trong đó rất nhiều nguyên nhân liên quan đến béo phì và lão hóa, là các nguyên nhân phổ biến trong cộng đồng. Vì vậy nguyên nhân chính dẫn đến kháng insulin ngoài yếu tố di truyền, thì yếu tố mắc phải: thừa cân và béo phì là nguyên nhân

quan trọng nhất. Đề tài này tập trung vào mối liên quan giữa béo phì và kháng insulin.



Hình 1.1. Con đường truyền tín hiệu của insulin [20]



Hình 1.2. Các yếu tố điều hòa ngược con đường truyền tín hiệu insulin [20]

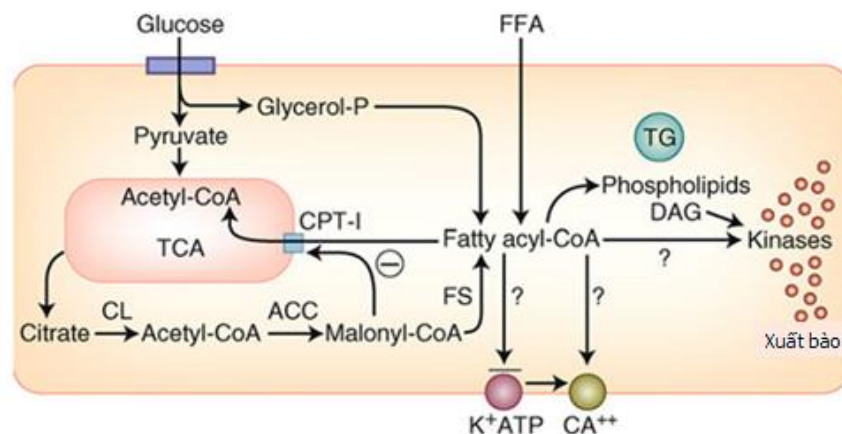
✱ Béo phì dẫn đến kháng insulin trong ĐTĐ typ 2.

Có 3 con đường quan trọng liên quan trực tiếp đến kháng insulin.

♦ Hoạt hóa con đường mTOR thúc đẩy kháng insulin và ĐTĐ typ 2.

Các chất dinh dưỡng dư thừa thúc đẩy kháng insulin bằng cách hoạt hóa protein kinase của con đường mTOR (mammalian target of the rapamycin). mTOR gây ra sự phosphoryl hóa serine (pS) của các IRS bằng cách hoạt hóa S6 Kinase 1(S6K1) làm IRS mất tác dụng hoạt hóa PI3K và protein Akt, Akt chính là mục tiêu của con đường chuyển hóa của insulin. Khi hoạt hóa con đường mTOR /S6K1, chất dinh dưỡng dư thừa cũng gây ra kháng insulin bằng cách ức chế sự biểu thị của gen PGC1 (proliferator- activated receptor γ coactivator- 1), làm giảm tiêu thụ năng lượng ti thể, từ đó dẫn đến béo phì. Con đường mTOR đóng vai trò rất quan trọng trong cân bằng glucose và được tìm thấy trong các tế bào cơ, mỡ và gan. Hoạt hóa con đường mTOR thúc đẩy kháng insulin, ngược lại ức chế con đường này có thể cải thiện kháng insulin [22]. (Hình 1.2 và 1.4).

♦ Tăng Acid béo tự do gây kháng insulin.



Hình 1.3. Mối liên hệ giữa chuyển hóa glucose và acid béo trong tế bào [10]

Đầu tiên, insulin gắn với receptor của nó, phosphoryl hóa các IRS, sau đó hoạt hóa PI3K, dẫn đến hoạt hóa Akt, làm tăng cường dịch chuyển GLUT4 đến bề mặt tế bào để nhập glucose vào trong tế bào. Khi nồng độ glucose ở

trong phạm vi bình thường, acid béo tự do được vận chuyển vào trong ty thể thông qua enzyme carnitine-palmytoyl transferase-1 (CPT-1) và được β oxy hóa. Ngược lại, ở bệnh nhân béo phì khi cả 2 nồng độ glucose và acid béo đều tăng cao, tế bào có xu hướng tăng sử dụng năng lượng từ acid béo tự do, do đó tăng tạo thành LC-CoA (long chain-CoA) trong bào tương. Đồng thời chuyển hóa glucose trong vòng TCA (tri carboxylic cycle) sinh ra citrat, mà dẫn tới sự hình thành malonyl CoA trong bào tương. Trong tế bào β malonyl CoA ức chế hoạt động của CPT-1, do đó khóa sự oxy hóa acid béo và kết quả là tích lũy các ester acyl CoA chuỗi dài (LC-CoA) trong bào tương. Sự tích lũy của LC-CoA trong bào tương ảnh hưởng có hại đến chức năng của tế bào một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua các chất chuyển hóa của acid béo [ceramid, acyl-CoA, diacylglycerol (DAG)]. Tác dụng trực tiếp là do cả acetyl CoA và LC-CoA đều ức chế tế bào sử dụng glucose, gây kháng insulin. Acetyl CoA tăng sẽ ức chế pyruvate dehydrogenase và làm tăng nồng độ citrate trong tế bào nên gây ức chế phosphofructo-kinase, là enzyme quan trọng trong con đường thoái hóa glucose. Glucose 6 phosphat (G6P) tích lũy lại gây ức chế hexokinase, kết quả làm tăng nồng độ glucose trong tế bào do đó giảm vận chuyển glucose từ máu vào tế bào [22], [13]. Tác dụng gián tiếp là do tăng LC-CoA trong bào tương gây ức chế tổng hợp glycogen từ glucose, tăng tổng hợp triglyceride, tăng DAG gây kháng insulin thông qua PKC (protein kinase C) và PPAR (Peroxisome proliferator activated receptor) [13]. DAG là chất hoạt hóa nội sinh của PKC, tăng lượng DAG trong cơ xương ở người và mô hình động vật kháng insulin gây hoạt hóa isoforms đặc hiệu của PKC và hoạt hóa các phân tử tín hiệu trong con đường viêm như IKKs (I κ B β -kinase), NF κ B (nuclear factor κ B) và JN Ks (c-Jun N-terminal kinase) dẫn đến ức chế IRS và PKB/Akt, do đó ức chế tín hiệu của insulin và ngăn chặn dịch chuyển của GLUT4 [18], [21]. (Hình 1.3).

Các adipokin ảnh hưởng đến mức độ kháng insulin.

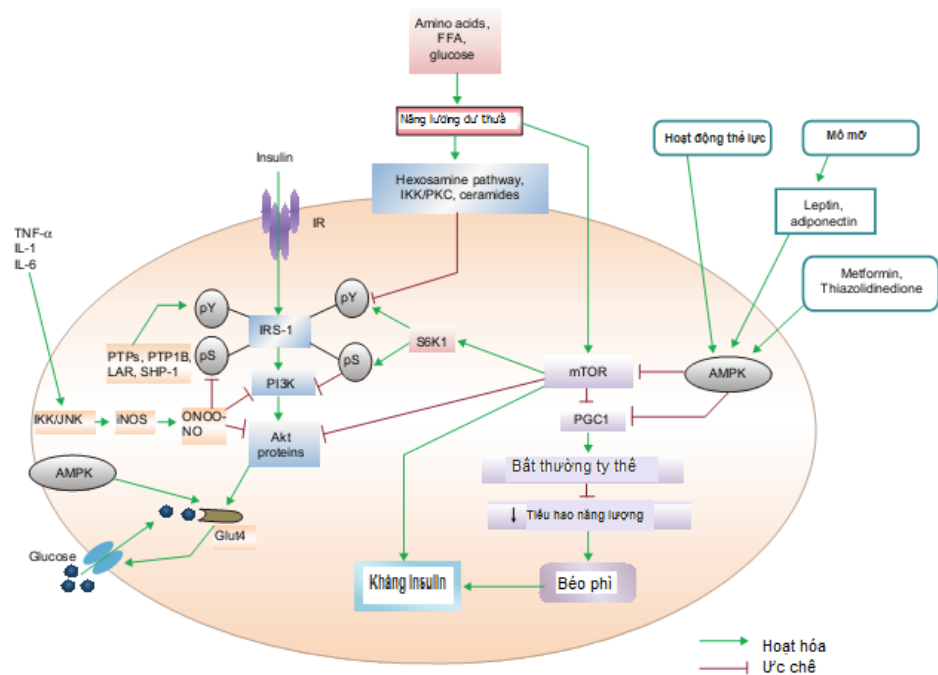
Các adipokin do các tế bào của mô mỡ tiết ra, gồm adiponectin, resistin, leptin, các cytokine, interleukin 6 (IL6), tumour necrosis factor α (TNF α), retinol-binding protein 4 (RBP4), visfatin, chất hóa ứng động bạch cầu đơn nhân monocyte chemo-attractant protein 1 (MCP-1) [23]. Các yếu tố này được chia làm 2 nhóm: nhóm các yếu tố gây tăng nhạy cảm insulin (gồm adiponectin, leptin) và nhóm các yếu tố gây kháng insulin (gồm TNF α , MCP-1, resistin, IL6...)

✓ Nhóm các yếu tố gây kháng insulin: TNF α được cho là nguyên nhân chính dẫn đến kháng insulin ở bệnh nhân béo phì. Do trong béo phì luôn có một tình trạng viêm mạn tính dẫn đến tăng TNF α . TNF- α hoạt động thông qua receptor p55, kích hoạt IKK β và JNK1 để ức chế con đường tín hiệu của insulin bằng cách tăng phosphoryl hóa các phân tử serin của IRS-1 trong tế mỡ. Ngoài ra, TNF- α cũng ức chế chức năng PPAR γ , một họ receptor nhân có chức năng điều hòa phiên mã, có vai trò trong tổng hợp lipid và dự trữ chất béo trong tế bào. TNF α cũng gây giảm tác dụng của adiponectin ở mô mỡ và trong máu của bệnh nhân béo phì [21]. Adipokine MCP-1 và receptor CCR2 đóng vai trò hấp dẫn các đại thực bào đến mô mỡ trắng trong giai đoạn khởi đầu của phản ứng viêm ở chuột. Tăng tiết MCP-1 từ tế bào mỡ của chuột béo phì có thể kích hoạt sự thâm nhiễm của các đại thực bào, sau đó các tế bào này lại lần lượt tiết ra một loạt các chemokine (protein kích hoạt bạch cầu) khác và các cytokine khác do đó tiếp tục thúc đẩy phản ứng viêm tại chỗ và ảnh hưởng đến biểu hiện gen trong tế bào mỡ, dẫn đến kháng insulin hệ thống. Hoạt hóa resistin làm tăng kháng insulin toàn thân và giảm tác dụng của insulin trên vận chuyển glucose ở tế bào mô mỡ. Kháng resistin gây tác dụng ngược lại. Tác dụng của resistin một phần cũng thông qua ức chế AMPK [23].

✓ Nhóm yếu tố tăng nhạy cảm insulin: Leptin ức chế sản xuất insulin trong tế bào β . Ngoài ra Leptin còn làm tăng tiêu thụ năng lượng và giảm cảm giác thèm

ăn do tác dụng lên các receptor leptin ở vùng dưới đồi. Adiponectin là một adipokin do tế bào mỡ tổng hợp và bài tiết, nồng độ trong máu khoảng 5-10 μ g/ml, hiện nay adiponectin đang được coi như một chỉ số sinh học để đánh giá tình trạng kháng insulin [24]. Các vai trò quan trọng của adiponectin trong kháng insulin gồm: (1) làm tăng độ nhạy cảm insulin; (2) làm tăng quá trình oxy hóa acid béo; (3) tương quan đáng kể với stress oxy hóa; và (4) có tác dụng chống viêm và điều hòa lên/xuống nhiều gen trong các con đường chuyển hóa khác nhau [25]. Phần lớn tác dụng trên chuyển hóa của các adipokin nói chung, trong đó có leptin, adiponectin đều thông qua hoạt hóa con đường AMPK.

♦ Hoạt hóa con đường AMPK làm giảm kháng insulin.



Hình 1.4. Con đường mTOR/S6K1 và AMPK trong kháng insulin [22]

AMPK (Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase), một protein kinase có chức năng như một cảm biến năng lượng của tế bào và điều hòa chính chuyển hóa carbohydrat và lipid thông qua các tác dụng trên tổng hợp cholesterol, oxy hóa các acid béo và trên quá trình tổng hợp glucose ở gan.

Sau khi Adiponectin gắn vào receptor của nó làm hoạt hóa AMPK. AMPK kích thích sự oxy hóa acid béo bằng cách ức chế enzym acetyl-CoA carboxylase β (ACC β), enzym xúc tác cho phản ứng tổng hợp malonyl CoA từ acetyl CoA, do đó làm giảm nồng độ malonyl CoA trong tế bào, dẫn đến giảm tổng hợp acid béo do ức chế vận chuyển acid béo vào ty thể để β oxy hóa. Bằng cách hoạt hóa PPAR γ , AMPK cũng làm tăng tốc độ β oxy hóa, đồng thời AMPK cũng ức chế tổng hợp nitric oxide (iNOS) và tín hiệu mTOR/S6K1, vì thế làm tăng vận chuyển GLUT4 qua màng, cuối cùng làm tăng sự hấp thu glucose vào tế bào, cải thiện tình trạng kháng insulin (Hình 1.4)

[25], [24]. Do đó AMPK là một đích quan trọng trong điều trị ĐTĐ typ 2.

1.2. CÁC NHÓM THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐÁI THÁO ĐƯỜNG

Các thuốc điều trị ĐTĐ hiện nay đều nhằm vào các mục đích:

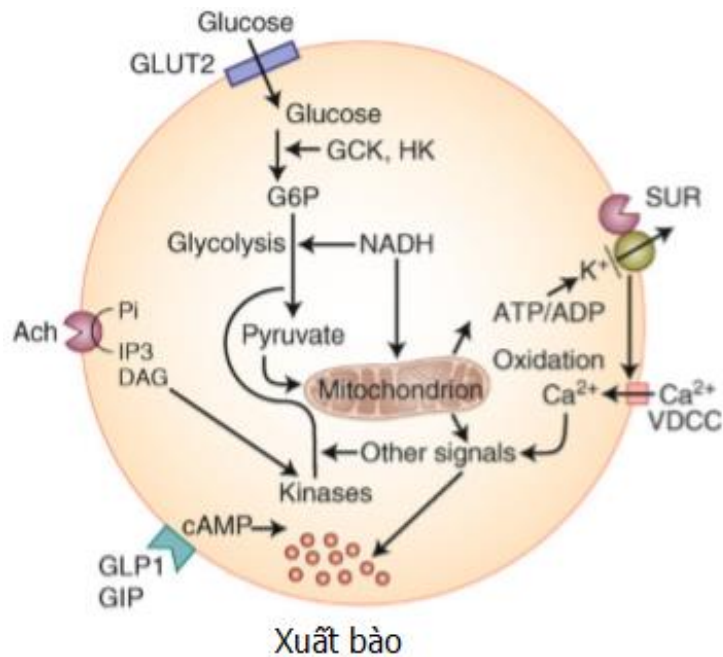
- Bù lại lượng insulin thiếu hụt hoặc bù trừ hiện tượng kháng insulin bằng cách đưa insulin từ ngoài vào hoặc kích thích tế bào β đảo tụy tăng bài tiết insulin.
- Giảm kháng insulin: tăng tính nhạy cảm insulin của các mô đích chính của insulin như gan, cơ, mô mỡ.
- Giảm hoặc làm chậm hấp thu glucid ở ruột.
- Một số thuốc nhắm đến các đích tác dụng khác: giảm sản xuất glucose ở gan, tăng thải trừ glucose ở ống thận.

Vì vậy biện pháp điều trị ĐTĐ typ 2 ngoài điều chỉnh lối sống (chế độ ăn và luyện tập) là dùng thuốc. Các thuốc điều trị ĐTĐ typ 2 hiện nay tập trung vào các nhóm chính sau:

1.2.1. Các nhóm thuốc kích thích tăng tiết insulin tại tụy

Insulin là hormon do tế bào β của tuyến tụy bài tiết, đóng vai trò chủ yếu trong cơ chế điều hoà đường huyết của cơ thể. Insulin được giải phóng từ các tế bào β tuyến tụy với tốc độ cơ sở thấp (~ 5-20% nồng độ insulin sau ăn) và dưới tác dụng của các chất kích thích bài tiết insulin (các acid amin, glucose,

alcol...) đặc biệt là glucose, tốc độ bài tiết tăng lên rất nhiều [26]. Sự bài tiết insulin phụ thuộc chủ yếu vào nồng độ ion Ca^{2+} trong tế bào. Khi nồng độ glucose máu tăng cao, glucose được vận chuyển vào tế bào β tuyến tụy, thông qua chất vận chuyển glucose (GLUT_2). Sau đó glucose bị phosphoryl hóa thành glucose 6 phosphat (dưới tác dụng của glucokinase-GK). Sự chuyển hóa của glucose trong tế bào cung cấp nguyên liệu để tổng hợp ATP. Kết quả nồng độ ATP trong tế bào tăng cao, dẫn đến đóng kênh K^+ nhạy cảm ATP (K_{ATP}) lại, làm nồng độ K^+ nội bào giảm xuống, gây khử cực màng tế bào và kênh Ca^{2+} nhạy cảm điện thế mở ra; Ca^{2+} ồ ạt vào trong tế bào. Ca^{2+} hoạt hoá phospholypase A_2 , phospholypase C... dẫn đến giải phóng Ca^{2+} từ lưới nội bào, nồng độ Ca^{2+} trong bào tương tăng sẽ giải phóng các hạt insulin dự trữ trong tế bào vào máu [8],[26]. (Hình 1.5).



Hình 1.5. Cơ chế bài tiết insulin [10].

Rối loạn bài tiết insulin là một trong 2 biểu hiện chính của ĐTĐ typ 2 [14] do đó các nhóm thuốc kích thích bài tiết insulin đóng vai trò quan trọng trong điều trị ĐTĐ typ 2. Các thuốc có tác dụng kích thích tiết insulin gồm:

1.2.1.1. Các nhóm thuốc ức chế kênh K_{ATP}

Các thuốc trong nhóm này gồm các sulfonylurea và meglitinid, có cơ chế tác dụng giống nhau, đều kích thích tế bào β tuyến tụy bài tiết insulin bằng cách gắn vào các vị trí khác nhau trên một receptor đặc biệt, liên kết với kênh K_{ATP} trên màng tế bào beta. Việc gắn với receptor làm chẹn kênh này, làm giảm K⁺ nhập vào gây khử cực màng tế bào. Sự khử cực, ngược lại làm mở kênh Ca²⁺ phụ thuộc điện thế, kết quả là Ca²⁺ từ ngoài vào trong tế bào. Nồng độ ion Ca²⁺ trong tế bào tăng sẽ khởi động việc chuyển các hạt chứa insulin đến bề mặt tế bào và giải phóng insulin ra ngoài [27] (Hình 1.5 [10]).

Sulfonylurea được Marcel Janbon tình cờ phát hiện vào năm 1942. Hơn 60 năm qua nhiều thuốc thuộc nhóm sulfonylurea đã lần lượt được tổng hợp (gồm hơn 20 thuốc chia thành 2 thế hệ) và các thuốc này hiện đang được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng để điều trị cho bệnh nhân ĐTĐ typ 2 [15],[28].

Nhóm meglitinid gồm 2 thuốc được phép lưu hành là: Repaglinid và Netaglinid [12],[15],[28], [29]. Nhóm thuốc này do có đặc điểm gắn nhanh và tách nhanh ra khỏi receptor đặc hiệu nên kích thích bài tiết insulin nhanh, có lợi trong kiểm soát glucose máu sau ăn tăng cao. Cũng giống sulfonylurea, nhóm này cũng có tác dụng không mong muốn là gây tăng cân và hạ glucose quá mức [30], [28].

1.2.1.2. Các nhóm thuốc điều biến incretin

Incretin là những hormon dạng peptid, được tiết vào máu chỉ vài phút sau khi thức ăn tác động lên niêm mạc ruột, gắn với các receptor khác nhau trên TB β tuyến tụy, kích thích bài tiết insulin và ức chế giải phóng glucagon phụ thuộc nồng độ glucose máu. Khoảng 50% - 70% lượng insulin được bài tiết sau bữa ăn là do các hormone incretin kích thích, tùy thuộc lượng glucose ăn vào [31], [32]. Hai hormone incretin có tác dụng HGM mạnh nhất là GLP-1 (glucagon like peptid-1) và GIP (glucose-dependent insulinotropic peptid).

[31], [33]. Cả hai hormone này thể hiện tác dụng bằng cách gắn vào receptor đặc hiệu, kích thích dòng thác các tín hiệu mà cuối cùng là kích thích các tế bào β tụy bài tiết insulin phụ thuộc glucose. Sau đó GIP và GLP-1 nhanh chóng bị chuyển hóa ($t_{1/2} \approx 2$ phút) bởi các enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) và tạo thành các chất chuyển hóa không hoạt tính, rồi loại trừ qua nước tiểu. Ở bệnh nhân ĐTĐ typ 2 tác dụng của incretin bị mất đi do sự suy giảm chuyển hóa liên quan ĐTĐ typ 2, nguyên nhân bao gồm: sự bài tiết GLP-1 bị suy giảm (nhưng tác dụng kích thích tiết insulin vẫn đảm bảo), trong khi sự bài tiết GIP bình thường (nhưng suy giảm mạnh khả năng kích thích tiết insulin), chuyển hóa nhanh chóng GLP-1 và GIP và thiếu hụt đáp ứng đối với cả hai hormone [34]. Do đó, chiến lược trong điều trị là làm tăng nồng độ GLP-1 trong huyết tương, được dựa trên 2 nhóm thuốc là:

- ◆ Các chất tương tự GLP-1: chất chủ vận của receptor GLP-1 (GLP-1-RA) như exenatide làm tăng tác dụng của GLP-1 hoặc chất tương tự GLP-1 kháng lại tác động của DPP-4 như liraglutide, được gọi chung là các chất tương tự GLP-1. Hiện nay các chất tương tự GLP-1 đã được FDA phê duyệt để điều trị bệnh ĐTĐ là Exenatid, Exenatid giải phóng chậm, Liraglutid, Lixisenatid [32]. Một số chất khác đang được nghiên cứu là Taspoglutide, Albiglutide [32]. Hiệu quả lâm sàng: các chất tương tự GLP-1 có khả năng kiểm soát đường huyết tốt: giảm nồng độ glucose qua đêm và glucose đói, giảm đáng kể HbA1c. Nguy cơ hạ đường huyết thấp, ngoài ra còn làm chậm thời gian tháo rỗng dạ dày và tăng cảm giác no nên làm giảm cân. Vì thế GLP-1RAs có thể kết hợp với các thuốc khác có khả năng gây hạ đường huyết và tăng cân như sulfonylureas, meglitinides hoặc insulin. Điểm bất lợi là thuốc dùng đường tiêm [31], [33].
- ◆ Các chất ức chế dipeptidylpeptidase-IV: có tác dụng làm chậm sự thoái hóa, bất hoạt của GLP-1 nội sinh do đó tăng cường và kéo dài tác dụng sinh lý của hormon này [8],[35],[36]. Các thuốc ức chế DPP-4 (iDPP-4) còn được gọi là

các '*gliptins*' gồm 5 chất đã được FDA và EU cấp phép và đang được sử dụng rộng rãi trên lâm sàng hiện nay là: sitagliptin (năm 2006), vildagliptin (năm 2007), saxagliptin (năm 2009), linagliptin (năm 2011), alogliptin (năm 2013) [28],[37], [31], [38]. Có 3 chất khác là teneligliptin, anagliptin, và trelagliptin mới được chấp nhận ở Nhật Bản và Hàn Quốc [33], [37]. Hiệu quả lâm sàng: các chất ức chế DPP-4 đã được chứng minh là có nhiều lợi thế: kích thích sự tổng hợp của insulin, ức chế tiết glucagon, làm giảm mức glucose sau ăn và glucose máu lúc đói, cải thiện chức năng tế bào β , làm giảm HbA1c ở bệnh nhân ĐTĐ typ 2 [34]. Lợi ích rõ ràng nhất của các chất ức chế DPP-4 trên lâm sàng là không gây giảm trọng lượng cơ thể và nguy cơ hạ đường huyết thấp, do đó có thể thích hợp với nhiều bệnh nhân khác nhau [31]. Các tác dụng có lợi khác như làm giảm mức acid béo tự do, do đó làm tăng nhạy cảm insulin và hiệu quả chống viêm mạnh [32]. Tuy nhiên các chất ức chế DPP- 4 liên quan đến gia tăng nguy cơ viêm tụy cấp [39].

1.2.2. Các nhóm thuốc làm giảm kháng insulin

Các thuốc điều trị ĐTĐ có tác dụng giảm kháng insulin còn gọi là thuốc làm tăng nhạy cảm của tế bào đích với insulin. Đích tác dụng làm giảm kháng insulin đang được quan tâm đó là: PTP1B, PKC, IKK β , SHIP2, PTEN, AMPK, ACC, PPAR γ . Trong đó 3 đích tác dụng được quan tâm nhiều nhất là PTP1B, AMPK và PPAR γ . Chỉ có thuốc tác dụng lên AMPK hiện đang được sử dụng trên lâm sàng.

* *Metformin*.

Được đưa vào sử dụng trong điều trị ĐTĐ từ năm 1957, hiện nay metformin là thuốc duy nhất thuộc nhóm biguanid còn được sử dụng trong lâm sàng. Ở mức độ cơ chế phân tử, metformin đã được chứng minh hoạt hóa AMPK bằng cách ức chế trực tiếp phức hợp I của chuỗi hô hấp trong ty thể của tế bào gan, gây tăng tỉ lệ AMP/ATP trong tế bào. Nhìn chung, tế bào sẽ cảm

nhận được sự thiếu hụt năng lượng. AMPK là bộ cảm biến năng lượng của tế bào, phát hiện thay đổi tỷ lệ AMP/ATP. AMP gắn vào tiểu đơn vị điều hòa γ để điều hòa dị lập thể AMPK và thúc đẩy sự phosphoryl hóa ở Threonine 172 của tiểu đơn vị xúc tác α . Sự gắn AMP cũng bảo vệ sự khử phosphoryl hóa AMPK của các tế bào phosphat. AMPK phosphoryl hóa các enzym quan trọng và các chất điều hòa sự sao chép. Hiệu quả thực sự của sự điều hòa xuôi dòng thác tín hiệu thể hiện ở sự ức chế các quá trình đồng hóa như tân tạo glucose, tổng hợp lipid, cùng với sự hoạt hóa những quá trình dị hóa sinh ATP như oxy hóa chất béo [27]. Do đó các tác dụng chính của metformin là: làm giảm sản xuất 25-40% glucose do ức chế quá trình tân tạo glucose ở gan. Tăng nhập glucose vào tất cả các mô trong cơ thể thông qua vai trò của insulin và tăng sử dụng glucose 20-50%. Giảm tổng hợp và tăng oxy hoá acid béo ở tế bào gan, dẫn đến dự trữ triglycerid trong gan giảm (15-20%), giảm cholesterol toàn phần (5-10%) và giảm LDL cholesterol [27].

Căn cứ vào kết quả của UKPDS và những khuyến cáo sử dụng, metformin là loại thuốc điều trị ĐTĐ được sử dụng phổ biến nhất trên toàn thế giới, là chỉ định đầu tay và xuyên suốt trong quá trình điều trị ĐTĐ typ 2 với ưu điểm hiệu quả, an toàn, rẻ, không gây tụt đường huyết, giảm nguy cơ tim mạch và đã có nhiều kinh nghiệm điều trị lâu năm. Metformin nên là thuốc được lựa chọn đầu tiên trong điều trị ĐTĐ typ 2, đặc biệt ở bệnh nhân thừa cân, béo phì [27].

✱ *Thiazolidinedion (TZDs).*

PPARs là một họ các receptor ở nhân tế bào, có chức năng điều hòa phiên mã. Các receptor PPAR γ được tìm thấy chủ yếu trong các mô đích của insulin và là những chất điều hoà quan trọng sự biệt hóa tế bào mỡ, sự chuyển hóa glucose ở gan và cơ, cân bằng lipid nội môi. Các TZDs là các chất chủ vận chọn lọc cao trên PPAR γ , sau khi gắn vào PPAR γ , hoạt hoá gen đáp ứng với

insulin và điều hòa sự biểu hiện của các gen liên quan đến chuyển hóa glucose và lipid, gồm adiponectin, GLUT₁, GLUT₄, leptin, TNF α , Akt (protein kinase B) và glucokinase gan [27].

Tác dụng chung của nhóm thuốc này là cải thiện tình trạng kháng insulin ở mô ngoại vi, tăng tổng hợp glycogen và làm giảm sản xuất glucose ở gan. TZDs làm tăng vận chuyển glucose vào cơ và mô mỡ do tăng tổng hợp các loại protein đặc biệt vận chuyển glucose. TZDs cũng hoạt hoá gen điều hoà chuyển hoá các acid béo tự do ở mô ngoại vi [28]. Ba hợp chất trong nhóm này đã được phê chuẩn sử dụng trên lâm sàng. Nhưng hiện nay chỉ có pioglitazon (Actos®) đang được sử dụng ở Hoa Kỳ. Troglitazon và Rosiglitazon đã bị loại bỏ và hạn chế sử dụng do các tác dụng không mong muốn nguy hiểm [27].

1.2.3. Nhóm thuốc làm giảm/chậm hấp thu glucid

Thức ăn chứa glucid của người gồm tinh bột, glycogen, cellulose, disaccharid và các monosaccharid. Ngoại trừ cellulose, các thức ăn glucid được thủy phân bởi enzym đặc hiệu trong dịch tiêu hóa. Tinh bột và glycogen được thủy phân nhờ α amylase trong nước bọt và dịch tụy tạo thành maltose và dextrin. Các sản phẩm này cùng với các disaccharid khác trong thức ăn tiếp tục được giáng hóa bởi các enzym đặc hiệu trong dịch ruột như dextrinase, maltase, lactase, saccharase cho sản phẩm cuối cùng là các monosaccharid. Các monosaccharid được hấp thu tại ruột non theo 2 cơ chế: khuếch tán thụ động (arabinose, mannose và fructose) và vận chuyển tích cực (glucose và galactose) chủ yếu nhờ chất mang là sodium-glucose cotransporter-1 (SGLT-1). Sau khi được hấp thu vào máu, các monosaccharid qua hệ thống tĩnh mạch cửa vào gan và được chuyển lại thành glucose [28]. Để làm giảm/chậm hấp thu các glucid tại đường tiêu hóa, ức chế tăng đường huyết sau ăn, các thuốc có thể tác dụng trên các đích sau:

- Ức chế các enzym thủy phân glucid như amylase, α -glucosidase, maltase...

- Ức chế hoạt động của SGLT-1 (chưa có trên lâm sàng).

Các thuốc ức chế enzym α -glucosidase gồm: acarbose (Precose, Glucobay) và miglitol (Glyset). Cơ chế tác dụng của các thuốc này là làm giảm/chậm quá trình hấp thu tinh bột, dextran và các disaccharid bằng cách ức chế tác dụng của enzym α -glucosidase ở niêm mạc ruột non, tránh được tình trạng tăng glucose máu sau ăn ở cả người bình thường và bệnh nhân ĐTĐ [28]. Các chất ức chế α -glucosidase không kích thích sự bài tiết insulin do đó không làm hạ đường huyết. Có thể điều trị đơn độc cho bệnh nhân già hoặc bệnh nhân tăng đường huyết tạm thời sau ăn hoặc kết hợp với các thuốc chống ĐTĐ uống khác và/hoặc insulin. Các thuốc này có thể gây đầy hơi, chướng bụng, tiêu chảy phụ thuộc liều [16], [30].

1.2.4. Nhóm thuốc làm tăng thải trừ glucose ở ống thận.

Thận góp phần điều hòa cân bằng glucose máu thông qua cơ chế tân tạo, sử dụng và tái hấp thu glucose từ dịch lọc cầu thận. Mỗi ngày, khoảng 180g glucose được lọc qua các tiểu cầu thận, sau đó được tái hấp thu hoàn toàn nhờ hệ thống đồng vận chuyên Na - glucose, các SGLTs (sodium-glucose cotransporters). SGLT1 có mặt chủ yếu ở ruột, chỉ một phần nhỏ ở thận, còn SGLT2 phân bố chủ yếu tại thận, có khả năng vận chuyển chuyên biệt glucose. Khoảng 90% glucose lọc ra sẽ được tái hấp thu bởi SGLT2 [28], [40].

Các chất ức chế SGLT2 (SGLT2i) hoạt động bằng cách ức chế SGLT2 ở ống lượn gần, do đó làm giảm tái hấp thu glucose và thúc đẩy sự bài tiết glucose vào nước tiểu do đó nồng độ glucose trong huyết tương sẽ giảm dẫn đến sự cải thiện tất cả thông số đường huyết. Đây là một cơ chế tác dụng độc lập với bài tiết insulin hoặc kháng insulin, không làm suy giảm tế bào β hay ảnh hưởng đến kháng insulin [30]. Các chất ức chế SGLT2 là nhóm thuốc mới nhất được phê duyệt để điều trị ĐTĐ typ 2. Ba thuốc được cấp phép lưu hành là: Dapagliflozin (năm 2012), Canagliflozin (năm 2013) và Empagliflozin (năm

2014) [41]. Các thử nghiệm lâm sàng cho thấy lợi ích của nhóm thuốc này trong việc kiểm soát tốt đường huyết, giảm huyết áp tâm thu và giảm trọng lượng cơ thể của bệnh nhân ĐTĐ typ 2, ít nguy cơ hạ đường huyết quá mức. Tuy nhiên, nhóm ức chế SGLT2 này cũng có hạn chế làm tăng nguy cơ nhiễm khuẩn tiết niệu - sinh dục [40], [39].

1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐTĐ TRÊN THỰC NGHIỆM

Để nghiên cứu tác dụng, cơ chế tác dụng của các thuốc trong pha tiền lâm sàng, hiện nay có nhiều mô hình nghiên cứu, chia làm 2 loại trên *in vivo* và *invitro*.

1.3.1. Các mô hình nghiên cứu *in vivo*.

1.3.1.1. Các mô hình gây ĐTĐ typ 1

❖ Mô hình ĐTĐ typ 1 tự phát:

Mô hình tự phát tức là bệnh/tình trạng bệnh xảy ra một cách tự nhiên ở các động vật như ở con người. Năm mô hình động vật ĐTĐ typ 1 tự phát điển hình, được ưa thích để nghiên cứu bệnh ĐTĐ tự miễn dịch là: chuột nhắt NOD, chuột cống BB tiền ĐTĐ, chuột cống LETL, chuột cống KDP và chuột cống LEW- iddm. Chuột nhắt NOD và chuột cống BB được sử dụng rộng rãi nhất [42]. Tuy nhiên, Việt Nam chưa có các giống chuột ĐTĐ tự phát này.

❖ Các mô hình ĐTĐ typ 1 thứ phát:

Các mô hình ĐTĐ do dùng hóa chất, cắt 1 phần tuyến tụy, mô hình biến đổi gen bằng kỹ thuật di truyền được phân loại là các mô hình ĐTĐ thứ phát.

♦ Mô hình gây ĐTĐ bằng hóa chất

Nguyên tắc: Dùng thuốc hoặc hóa chất có khả năng phá hủy tế bào β tuyến tụy để gây ĐTĐ. Các hoá chất hay được sử dụng là: alloxan (ALX), streptozotocin (STZ), dithizon, gold-thioglucoze, mononatri glutamate, vacor, 8-hydroxyl quinolon. Trong đó hay được sử dụng nhất là ALX và STZ. Cơ chế gây độc của 2 hóa chất này giống nhau ở chỗ đều gây độc trực tiếp và chọn lọc

trên TB β tụy thông qua hệ thống vận chuyển GLUT₂ nên về phương diện mô bệnh học, tế bào β đều bị mất hạt, chết do hoại tử [43]. Nhưng khác nhau là ALX tạo ra phản ứng oxy hóa nhóm thiol, sinh ra gốc hydroxyl phá hủy tế bào β và ức chế đặc hiệu *glucokinase*, còn STZ gây alkyl hóa ADN và protein, ức chế sự tháo xoắn, sự sao chép AND, vì vậy ức chế sự nhân lên của tế bào β , gây chết tế bào. STZ không ức chế *glucokinase* [43], [44]. Do đó, tiêm STZ hay ALX đều gây ra biến đổi glucose máu và insulin máu giống nhau và gây ra hội chứng giống như ĐTĐ typ 1 phụ thuộc insulin. Tuy nhiên, cơ chế này rõ ràng là rất khác với nền tảng tự miễn dịch của ĐTĐ typ 1 ở cả người và mô hình động vật là tế bào β bị phá hủy do sự chết theo chương trình chứ không có sự rò rỉ của insulin từ hạt tiết bị vỡ. Mức độ nghiêm trọng của bệnh phụ thuộc vào liều sử dụng. Do đó, thông qua việc lựa chọn liều ALX/STZ, có thể gây được những mô hình tương tự như ĐTĐ typ 1 hoặc typ 2. Điều này rất có ý nghĩa trong nghiên cứu tác dụng của các thuốc điều trị ĐTĐ [42], [43], [44].

♦ Mô hình gây ĐTĐ typ 1 bằng cắt bỏ tuyến tụy

Vào năm 1890, Merhing và Minkowski đã tiến hành cắt bỏ tuyến tụy của chó, gây ĐTĐ typ 1 tương tự ở người với các biểu hiện đái nhiều, khát, đường huyết tăng cao [42]. *Ưu điểm*: Đây là phương pháp gây ĐTĐ typ 1 hiệu quả trên động vật thực nghiệm. Chủ yếu được tiến hành trên chó, thỏ, mèo, lợn, chuột. *Nhược điểm*: phương pháp này phức tạp khó thực hiện, con vật dễ bị chết. Mặt khác, mô hình này không giống tiến triển bệnh ĐTĐ tự nhiên ở người nên ít được sử dụng. Ở Việt Nam: năm 1993 Phan Văn Các đã áp dụng thành công phương pháp này để gây ĐTĐ trên mèo [45]. Gần đây không ghi nhận được nghiên cứu nào sử dụng phương pháp gây ĐTĐ này.

♦ Mô hình gây ĐTĐ bằng virus

Virus là tác nhân gây ĐTĐ typ 1 với nhiều cơ chế gây tranh cãi nhưng 2

cơ chế chính được thừa nhận: Virus thâm nhiễm trực tiếp vào tế bào β phá hủy tế bào làm mất khả năng bài tiết insulin. Virus xâm nhập cơ thể khởi động quá trình tự miễn sinh kháng thể phá hủy tế bào β . Hai loại virus điển hình là virus *Killham* gây ĐTĐ trên chuột cống và virus *Encephalomyocarditis* gây ĐTĐ trên chuột nhắt. Mô hình gây ĐTĐ typ 1 bằng virus ít được sử dụng để nghiên cứu tác dụng của thuốc trên thực nghiệm nhưng lại có vai trò đặc biệt trong nghiên cứu cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 1, cũng như tác động của các yếu tố môi trường đến sự phát sinh bệnh ĐTĐ tự miễn [42].

1.3.1.2. Các mô hình gây ĐTĐ typ 2

❖ Mô hình ĐTĐ typ 2 tự phát thường được sử dụng

♦ Mô hình động vật gặm nhấm béo phì ĐTĐ typ 2 tự phát:

Chuột nhắt Ob/ob, chuột nhắt db/db và chuột cống Zucker fa/fa đặc trưng nhất cho mô hình ĐTĐ typ 2 với nền tảng đơn gen. Chuột nhắt ob/ob phát triển thành béo phì do đột biến mất gen leptin, còn chuột nhắt db/db và chuột cống fa/fa là đột biến đơn gen béo phì kháng leptin [42]. Còn chuột nhắt KK, NZO, chuột cống OLETF và chuột nhắt NSY đại diện cho mô hình ĐTĐ typ 2 béo phì với nền tảng đa gen [42].

♦ Mô hình động vật gặm nhấm không béo phì ĐTĐ typ 2 tự phát:

Thường dùng là chuột cống GK (Goto - Kakizaki) và chuột nhắt C57BL/6. Mô hình này có khá nhiều điểm tương đồng với ĐTĐ typ 2 ở người không béo phì, đó là rối loạn bài tiết insulin và kháng insulin ở mức độ nhẹ. Ở Việt Nam chưa có các giống chuột ĐTĐ do di truyền, mặc dù tác giả Nguyễn Ngọc Xuân đã công bố nghiên cứu trên chuột cống GK, tuy nhiên thí nghiệm này được tiến hành ở nước ngoài [46].

❖ Mô hình ĐTĐ typ 2 thứ phát

♦ Mô hình gây ĐTĐ typ 2 bằng hóa chất

Hóa chất thường được dùng để gây mô hình ĐTĐ typ 2 là STZ do những

lợi điểm đã được phân tích ở trên. Nếu tiêm STZ với một liều cao duy nhất sẽ gây phá hủy mạnh tế bào β , gây thiếu hụt insulin nghiêm trọng, do đó tạo ra mô hình ĐTĐ kiểu typ 1. Để gây được mô hình ĐTĐ typ 2, người ta có thể dùng STZ liều thấp tiêm cho chuột mới sinh, ĐTĐ typ 2 sẽ xuất hiện ở tuổi trưởng thành hoặc kết hợp việc sử dụng STZ liều thấp với các chất có tác dụng bảo vệ tế bào β như nicotinamid (NA).

Nhược điểm: Hạn chế lớn nhất của phương pháp này là không đại diện cho bệnh sinh ĐTĐ ở người (thường có béo phì), hóa chất sử dụng để phá hủy đảo tụy có thể gây độc với các cơ quan khác và đáp ứng của từng cá thể với hóa chất thường khác nhau [42].

♦ Mô hình gây ĐTĐ typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo kết hợp liều thấp STZ.

Nguyên tắc: cơ bản là cho chuột ăn chế độ ăn giàu chất béo (thành phần chất béo chiếm khoảng 40-60% calo) trong thời gian dài (1-2 tháng) để gây tình trạng kháng insulin, sau đó gây viêm đảo tụy bằng tiêm STZ liều thấp. Bằng cách đó gây tăng glucose máu mạn tính và tiến triển ĐTĐ typ 2 tương tự ở người.

Ưu điểm: Bắt chước tiến triển tự nhiên, tạo ra kháng insulin với những biểu hiện tương tự người: tăng lipid máu, insulin máu lúc đầu tăng sau đó giảm dần, glucose máu tăng cao, thay đổi biểu thị 1 số gen quan trọng trong chuyển hóa: adiponectin, leptin, PPAR γ , UCP2. Hơn nữa STZ liều thấp ít gây tác dụng độc hại trên các cơ quan khác. Thời gian động vật bị bệnh kéo dài và ổn định do đó thích hợp để nghiên cứu các thuốc đòi hỏi thời gian dài. Giá trị kinh tế cao, sử dụng rộng rãi hơn mô hình ĐTĐ do di truyền.

Nhược điểm: Thời gian nuôi kéo dài để đạt được tình trạng kháng insulin. Cần khảo sát để có mức liều STZ phù hợp với động vật nghiên cứu. Tại Việt Nam, nhiều tác giả đã áp dụng mô hình gây ĐTĐ cho chuột thực nghiệm bằng chế độ ăn giàu chất béo kết hợp tiêm STZ liều thấp [47], [48],[49].

♦ Mô hình gây ĐTĐ typ 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 nhất ĐTĐ typ 2 LIRKO (Liver-specific insulin receptor knockout) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào gan. Chuột nhất ĐTĐ typ 2 MIRKO (muscle specific insulin receptor knockout) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào cơ vân. Chuột nhất ĐTĐ typ 2 NIRKO (CNS-specific insulin receptor knockout) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào não. Chuột nhất ĐTĐ typ 2 FIRKO (adipose tissue specific knockout of the IR) do bất hoạt gen mã hóa IR tại tế bào mỡ. Chuột nhất BATIRKO xóa IR trong mô mỡ nâu. Chuột nhất BIRKO thiếu IR trong tế bào β tuyến tụy [42].

Vai trò thiết yếu của protein IRS trong thác tín hiệu insulin đã được chứng minh bằng cách tạo ra mô hình di truyền ở chuột như: chuột nhất thiếu IRS-1 (IRS-1)^{-/-} và chuột nhất thiếu IRS-2 (IRS-2)^{-/-} [50]. Cuối cùng, nhưng cũng rất quan trọng là mô hình sửa đổi gen tác động đến con đường chuyển hóa acid béo (ví dụ thiếu hụt Acyl-diacylglyceroltransferase, Acetyl CoA carboxylase, acyl - CoA dehydrogenase ở chuột nhất, ...) các mô hình này chính là các công cụ thích hợp để tìm hiểu về “nutrigenomics” của kháng insulin và ĐTĐ type 2.

1.3.1.3. Một số phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose máu trên *in vivo*

Nguyên tắc chung: Sử dụng các mô hình động vật thực nghiệm phù hợp để đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên các mô hình đó. Tiêu chí đánh giá tác dụng hạ glucose máu là nồng độ glucose máu (và/hoặc insulin máu) trước và sau khi cho động vật thí nghiệm dùng thuốc. So sánh các giá trị đó ở thời điểm trước và sau khi dùng thuốc, đồng thời so sánh với lô chứng để đánh giá tác dụng của mẫu thử. Bên cạnh đó có thể định lượng cholesterol toàn phần, triglyceride, cân

nặng... để tìm hiểu thêm tác dụng của thuốc trên chuyển hóa lipid.

❖ *Đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên khả năng dung nạp glucose*

Nguyên tắc: Khi đưa 1 lượng lớn glucose ngoại sinh vào cơ thể dẫn đến tình trạng lượng insulin được bài tiết ra không đủ để đưa glucose vào trong các mô, hay nói cách khác lượng glucose đưa vào vượt quá khả năng dung nạp glucose của cơ thể, dẫn tới tăng glucose máu tạm thời. Phương pháp này đánh giá tác dụng của thuốc trên mức độ nhạy cảm với insulin, thông qua khả năng ức chế tăng glucose máu của thuốc [51].

Ưu điểm: mô hình đơn giản, gây tăng đường huyết vừa phải, không kéo dài, do đó mô hình này thường được dùng trong nghiên cứu sàng lọc tác dụng hạ glucose máu của thuốc mới và đánh giá chức năng tế bào β của tuyến tụy.

Nhược điểm: không giống tình trạng tăng glucose máu mạn tính ở người [51], [52]. Phương pháp này đã được áp dụng nhiều tại Việt Nam.

❖ *Đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên khả năng hấp thu polysaccharid*

Tác dụng ức chế, làm chậm hấp thu tinh bột và các polysaccharide của thuốc thử trong in vivo có thể được đánh giá thông qua khả năng ức chế sự tăng glucose máu của tinh bột hoặc các disaccharide khi sử dụng cùng với thuốc thử [53]. Ở Việt Nam, tác giả Đỗ Thị Nguyệt Quế áp dụng phương pháp này [47].

❖ *Đánh giá tác dụng tăng nhạy cảm insulin với mô đích của thuốc*

Một trong những phương pháp được coi là “tiêu chuẩn vàng” để đánh giá mức độ kháng insulin là “kỹ thuật kẹp duy trì glucose ổn định-tăng insulin máu” gọi tắt là kỹ thuật “kẹp insulin đẳng glucose”. Kỹ thuật này được De Fronzo thực hiện lần đầu tiên năm 1979.

Nguyên tắc là giữ cho nồng độ glucose máu ổn định ở mức cao bằng cách truyền insulin liên tục với tốc độ hằng định, đồng thời duy trì nồng độ glucose máu không thay đổi bằng cách truyền dung dịch glucose. Khi nồng độ insulin tăng và duy trì ở mức tối đa, tốc độ truyền glucose và tốc độ chuyển hóa

glucose sẽ phản ánh trực tiếp mức độ gắn insulin vào các receptor ở các mô ngoại vi. Mức độ nhạy cảm với insulin của tất cả các mô trong cơ thể được xác định thông qua khả năng tiêu thụ glucose của cơ thể ở điều kiện nồng độ glucose đạt trạng thái ổn định (steady state) [54]. Có thể kết hợp dùng glucose đánh dấu phóng xạ để đánh giá mức độ chuyển hóa glucose ở các mô cụ thể như gan, não, cơ xương.... Động vật thí nghiệm hay được sử dụng là chuột nhắt ob/ob; db/db, chuột nhắt KK-Ay, chuột cống Zucker-fatty, chuột gây kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo...

Ưu điểm của phương pháp này là có thể hạn chế ảnh hưởng của sự tiết insulin và quá trình tân tạo glucose ở gan đến glucose máu do insulin máu cao sẽ ức chế tụy tiết insulin, ức chế gan tân tạo glucose.

Nhược điểm: Phương pháp không sinh lý, không giống với tình trạng tăng insulin máu ở người và kỹ thuật khá phức tạp [55]. Ở Việt Nam, Đỗ Thị Nguyệt Quế đã áp dụng mô hình đánh giá này trên chuột cống trắng [47].

1.3.2. Các mô hình nghiên cứu invitro.

Để đánh giá tác dụng HGM của thuốc đã có khá nhiều mô hình nghiên cứu *in vivo* được áp dụng. Tuy nhiên các mô hình này còn có nhiều hạn chế như mất thời gian, cần dùng nhiều động vật và cần lượng mẫu thử khá lớn. Hơn nữa, mô hình nghiên cứu *in vivo* thường chỉ mới dự đoán được cơ chế tác dụng của thuốc, chưa thể khẳng định cơ chế tác dụng cụ thể. Các mô hình nghiên cứu *ex vivo*, *in vitro* có thể khắc phục các hạn chế này, đặc biệt các mô hình đánh giá ảnh hưởng của thuốc ở mức tế bào, phân tử giúp tìm hiểu sâu hơn về cơ chế tác dụng của thuốc, các mô hình nghiên cứu *invitro* cũng rất hữu ích trong nghiên cứu sàng lọc.

Mô hình nghiên cứu *invitro* có thể chia 2 loại: đánh giá tác dụng của thuốc trên cơ quan, tế bào cô lập và trên các enzyme tham gia điều hòa glucose máu.

1.3.2.1. Mô hình đánh giá tác dụng của thuốc trên các cơ quan, tế bào cô lập

Các mô hình chủ yếu tập trung vào 2 hướng:

- Đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên khả năng tiết insulin của đảo tụy, do tế bào β là tế bào duy nhất tiết insulin trong cơ thể. Mô tế bào cô lập là đảo tụy.
- Đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên mức độ nhạy cảm của insulin tại tế bào đích và quá trình sử dụng glucose trong tế bào. Các tế bào đích chính của insulin là gan (tế bào HepG₂), cơ vân (tế bào C₂C₁₂), mô mỡ (tế bào 3T₃-L₁) [52], [56].

♦ *Đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên khả năng tiết insulin của tụy [57]*

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc trên khả năng tiết insulin của tuyến tụy, các nhà nghiên cứu đã tiến hành cô lập đảo tụy và đánh giá sự bài tiết insulin từ đảo tụy cô lập [58] theo các hướng nghiên cứu sau: (1) Tác dụng trên sự bài tiết insulin bằng cách ức chế stress oxy hóa. Chứng minh sự có mặt của chất chống oxy hóa trong thuốc thử đã cải thiện chuyển hóa oxy hóa, bảo vệ tế bào β khỏi các tác nhân gây độc. (2) Kích thích bài tiết insulin thông qua việc tăng sản xuất ATP, thúc đẩy nồng độ Ca²⁺ nội bào. (3) Kích thích bài tiết insulin thông qua việc thúc đẩy khả năng sống và phát triển của TB β . (4) Tác dụng trên sự bài tiết insulin thông qua ức chế UCP2. UCP2 là protein mang ti thể có trong các tiểu đảo tuyến tụy, có tác động âm tính trên sự tiết insulin được kích thích bởi glucose. Tăng biểu thị UCP2 dẫn đến suy giảm chức năng TB β và dẫn đến ĐTĐ.

Hiện nay ở Việt Nam, đã có tác giả thực hiện phương pháp này [47], thông qua việc ủ thuốc với đảo tụy cô lập, sau đó dựa vào nồng độ glucose máu trước và sau khi ủ với mẫu thử để đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên khả năng tiết insulin của đảo tụy cô lập, chứ chưa đánh giá được là tác động theo hướng nào.

♦ *Đánh giá tác dụng của thuốc đến mức độ nhạy cảm insulin tại mô đích.*

Phương pháp đánh giá tác dụng của thuốc trên độ nhạy cảm của insulin gồm:

- Đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên đáp ứng cuối cùng (end point) của con

đường truyền tin nội bào của insulin như: đánh giá sự di chuyển GLUT4 ra màng tế bào, đánh giá sự phosphoryl hóa phân tử tyrosin trên IR, IRS-1, Akt... [59].

- Đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên các đích tác dụng cụ thể tham gia hoặc ảnh hưởng trực tiếp đến con đường truyền tin nội bào của insulin như đánh giá ảnh hưởng của thuốc trên PTP1B, trên AMPK, trên PPAR γ ... Hai đích tác dụng quan trọng của thuốc điều trị ĐTĐ hiện đang được quan tâm là PTP1B và AMPK [60], [61], [62], [63].

1.3.2.2. Đánh giá tác dụng của thuốc lên một số enzym tham gia điều hòa glucose máu.

Các enzym quan trọng tham gia điều hòa glucose máu như các enzym thủy phân polysaccharid thành monosaccharid tại đường tiêu hóa (α -glucosidase, amylase), các enzym tham gia tổng hợp glucose ở gan trong đó đặc biệt quan trọng là PEPCCK, G6K và F6,1-BP. Các enzym tham gia tổng hợp glycogen như glucose synthase, các enzym tham gia thoái hóa glucose ở tế bào như pyruvate kinase...

Nguyên tắc chung để đánh giá hoạt tính invitro của các enzym này thường là dựa vào khả năng thủy phân của các enzym đối với cơ chất thích hợp ở các điều kiện thích hợp [64], [65]. Ở Việt Nam đã có nhiều tác giả đánh giá tác dụng của thuốc trên α -glucosidase [66].

1.4. TỔNG QUAN VỀ CÁC THÀNH PHẦN CỦA ANDIABET VÀ CÁC NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ANDIABET

Chế phẩm viên nang cứng Andiabet là sự kết hợp của ba loại thảo dược: Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu, những dược liệu cổ truyền có tác dụng HGM đã được chứng minh riêng rẽ về hiệu quả điều trị bệnh ĐTĐ qua nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng.

1.4.1. Bằng lăng nước

1.4.1.1. Đặc điểm hình thái, phân bố, bộ phận dùng của bằng lăng nước

Bằng lăng nước: *Lagerstroemia speciosa* (L) Pers., thuộc họ Tử vi: *Lythraceae*. Cây còn có tên gọi khác tử vi tàu. Tên thường gọi: bằng lăng [67].

Đặc điểm hình thái: Bằng lăng nước (BLN) là loài cây thân gỗ có kích thước trung bình, cao từ 5-20 m. Vỏ cây màu nâu hoặc kem. Lá đơn, hình bầu dục, tròn ở gốc, nhọn ngắn ở chóp, mép lá nguyên, dài 10-20cm, rộng 5-9cm. Lá BLN rất dai, bề mặt nhẵn, cả hai mặt lá đều có màu xanh nhạt, có 12-14 gân bên, lá già ngả sang màu vàng hoặc đỏ rồi rụng. Cụm hoa dạng chùy, đứng ở ngọn, nhánh chùy có lông sát, nụ hoa tròn hồng đỏ. Hoa to, rộng 3cm, màu đỏ tím hoặc hồng, đài có lông sát, 6 cánh hoa có cuống 5mm, không mùi, nhị nhiều. Quả nang tròn dài dạng trứng, kích thước 20x18mm, mang lá đài xòe ra, khi khô nở thành 6 mảnh. Hạt có dạng cánh mỏng, đường kính 12-15mm, màu nâu nhạt. Cây ra hoa tháng 4 - 5 [68].

Phân bố: BLN mọc nhiều ở vùng nhiệt đới, chủ yếu Nam Á và Đông Nam châu Á như: Ấn độ, Philippines, Malaysia,... Ở Việt Nam, BLN được trồng nhiều ở Tây Nguyên, Bình Phước... và các thành phố lớn Hà Nội, Hải Phòng[68].

Bộ phận dùng: vỏ, lá cây, quả (*cortex, folium, fructus Lagerstroemia*) [68].

1.4.1.2. Thành phần hoá học chính của bằng lăng nước

Cho đến nay, đã có hơn 40 hợp chất bao gồm triterpenes, tannin, axit ellagic, glycosides và flavones đã được xác định từ lá *L. speciose* ([69]). Trong đó, thành phần hóa học chủ yếu của Bằng lăng nước là tanin (> 10%), tập trung nhiều nhất ở lá già và quả chín [70]. Thành phần hóa học chính, chịu trách nhiệm về các tác dụng sinh học quan trọng của Bằng lăng nước là acid Corosolic, một triterpenoids có nhiều trong lá [71], [69].

1.4.1.3. Một số nghiên cứu về tác dụng hạ glucose máu của bằng lăng nước

❖ *Nghiên cứu trên mô hình động vật thực nghiệm*

Bảng 1.1. Tóm tắt tác dụng điều trị đái tháo đường của Bằng lăng nước trên mô hình động vật thực nghiệm.

| Tác dụng/Cơ chế tác dụng | TP có tác dụng | Đối tượng/Liều/Tgian | TLTK |
|---|--|--|---|
| HGM và/Hạ insulin máu và/ Giảm glucose niệu Giảm HbA1C | DC nước nóng DC nước 5%, methanol 2% DC n-hexan và DC nước DC chứa 1% acid corosolic Acid corosolic 0,023% Acid corosolic | Thỏ * uống 1-2g lá khô/kg Chuột nhắt KK-Ay * 5 tuần Chuột cống ĐTD/STZ * 1-2g/kg *5-12 ngày Chuột nhắt ĐTD/ALX 100mg/kg *28 ngày Chuột nhắt b/thường và ĐTD do STZ *18,2g/kg Chuột nhắt ĐTD do ALX * 2mg/kg *4 tuần | [72], [73]. [74]. [75] [76], [77]. [78]. [79] [80]. |
| Ức chế enzym sucrase | DC nước nóng lá BLN Acid corosolic | Chuột cống trắng Chuột nhắt trắng 10mg/kg | [81], [82] |
| Ức chế α -glucosidase | Acid oleanolic | Chuột ĐTD/STZ *5 tuần, | [83], [84] |
| Giảm tân tạo G do giảm G6Pase, F1,6Pase ở gan. Tăng hoạt độ HK. Tăng phân giải glycogen. Tăng hàm lượng glycogen gan. Kích thích oxy hóa G qua con đường PP. | DC nước nóng PD nước và PD n-hexan Acid corosolic 20-100 μ m | Chuột tiêm STZ Chuột ĐTD do STZ *150mg/kg * 15 ngày | [85], [86] [87], [88] |
| Giảm kháng insulin/Kích thích chuyển dịch GLUT4/Tăng nhạy cảm insulin do hoạt hóa gen PPAR γ ở TB mỡ, gan. | Acid corosolic 0,023% Acid corosolic DC nước 0,5% | Chuột KK-AY * 10mg/kg, sau uống 4h Chuột KK-Ay * 2mg/kg * 2 tuần. Chuột ĐTD typ 2 * 12 tuần | [79], [89] [90], [91] |
| Ức chế hấp thu TC ở ruột, Hạ TG, TC. Giảm cân nặng, khối lượng mỡ/ giảm lượng nước, thức ăn | DC nước 5% & methanol 2% DC nước 0,5% Acid corosolic | Chuột nhắt KK-Ay * 5 tuần Chuột cống ĐTD typ 2 * 14 ngày và * 12 tuần Chuột ĐTD typ 2*10g/kg | [73], [92] [89], [76]. |

Tóm lại: Nhiều nghiên cứu khác nhau trên động vật thực nghiệm đã chứng minh dịch chiết lá BLN cũng như acid corosolic có tác dụng HGM tốt. Đáp ứng trên chuột nhắt được ghi nhận là tốt hơn so với trên chuột cống. Các nghiên cứu

cũng nhận định: dịch chiết lá BLN thực sự an toàn cho động vật thực nghiệm [93].

❖ *Nghiên cứu trên invitro*

Bảng 1.2. Tóm tắt một số cơ chế tác dụng hạ glucose máu của Bằng lăng nước, được nghiên cứu trên invitro.

| <i>Cơ chế tác dụng</i> | <i>TP có tác dụng /Liều</i> | <i>TLTK</i> |
|---|---|-----------------------|
| Tăng nhập glucose vào TB mỡ 3T3-L1. Ức chế mô mỡ khác với tác dụng của insulin. Kích thích thu nhận glucose vào TB cơ L6 và TB trứng chuột Hamster. | DC nước nóng và DC methanol của BLN Các tannins: chiết xuất từ BLN. Acid corosolic 250nmol/L. | [94], [70],[95], [96] |
| Kích thích vận chuyển glucose vào TB, giảm giải phóng isoproterenol cảm ứng glycerol ở mô mỡ chuột cống. Tăng cường biểu thị gen mã hóa IR, tăng cường phosphoryl hóa tyrosin ở sau receptor của insulin. Tăng nhạy cảm của TB mỡ với insulin, tạo ra đáp ứng giống insulin. | Lagerstroemin. Acid tannic | [97], [98]. |
| Ức chế enzyme α -glucosidase, tác dụng ức chế phụ thuộc nồng độ. Hoạt chất mạnh nhất IC ₅₀ = 3.53 μ g/ml. | Dẫn chất phlyphenol trong dịch chiết aceton lá BLN Acid corosolic | [83], [71] |

Tóm lại: Rất nhiều nghiên cứu *invitro* đã chứng minh tác dụng chống ĐTĐ của dịch chiết lá BLN, acid corosolic và mỗi hợp chất không chỉ có một cơ chế tác dụng mà có nhiều cơ chế liên quan lẫn nhau, làm tăng tác dụng của BLN. Các cơ chế tác dụng chính của BLN và acid corosolic nhằm điều hòa chuyển hóa glucose gồm: tăng thu nạp glucose vào tế bào đích, hoạt hóa GLUT4, tăng nhạy cảm với insulin, giảm tân tạo đường, ức chế thủy phân sucrose ở ruột do ức chế α -amylase và α -glucosidase, kèm theo các tác dụng như giảm cân, chống oxy hóa, tăng sức đề kháng...do đó làm giảm glucose máu, giảm TC, TG và giảm béo phì [99].

❖ *Nghiên cứu trên người*

Bảng 1.3. Tóm tắt tác dụng điều trị ĐTĐ của Bằng lăng nước trên người.

| Tác dụng | TP có tác dụng | Đối tượng/Liều/Tgian | TLTK |
|--|--|---|--------------------------------------|
| G máu lúc đói giảm 10-20% G máu sau ăn 1h & 2h giảm 10-12%. Tăng DNG, rõ nhất sau 90 phút uống. Triệu chứng lâm sàng cải thiện. Không có ADR sau 1 năm điều trị. | Hỗn hợp DC nước nóng lá BLN. Viên nén 100mg chứa DC nước BLN. Viên nang chứa dịch chiết BLN chuẩn hóa-1% acid corosolic Acid corosolic 10mg | 24 BN ĐTĐ type 2 *3 lần /ngày 15 BN *100mg/ngày *1 năm 10 BN uống viên nang mềm, 57 BN viên cứng 32-48mg/ngày *2 tuần 31 người uống 1viên nang | [100], [101], [102], [103]. |
| Cân nặng giảm Sau 3 tuần: ~1,5kg Sau 12 tuần: 6,29 kg gồm 3,72 kg mỡ | DC lá BLN chuẩn hóa có 10mg acid corosolic Bổ sung trước ăn: hỗn hợp có 16mg DC BLN. Dịch chiết BLN chuẩn hóa, 10mg acid corosolic | 12 người không ĐTĐ * 1viên/ngày *2 tuần 56 BN * 12 tuần 100 BN tiền ĐTĐ type 2 *1 viên mềm * 30 ngày. | [104] [105]. |

1.4.2. Giảo cổ lam

1.4.2.1. Đặc điểm hình thái, phân bố, bộ phận dùng của Giảo cổ lam

Tên khoa học là *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino thuộc họ *Bí-Cucurbitaceae* [68], còn gọi là trường sinh thảo hoặc ngũ diệp sâm, thất diệp đởm...

Đặc điểm thực vật: Giảo cổ lam (GCL) cây thảo, dây leo mảnh, sống lâu năm. Lá kép, khía răng cưa. Tua cuốn mảnh xẻ đôi. Cụm hoa khác gốc, dạng chùy, mảnh, dài, nhất là hoa đực. Hoa nhỏ màu trắng hoặc lục nhạt, có lá bắc con, cuống hoa có đốt. Đài hoa hình bánh xe, chia 5 thùy, ngắn. Tràng hình bánh xe, hơi hàn liền phần gốc tràng, có đầu nhọn. Nhị 5, nhụy bầu hình cầu nhỏ, 2-3 ngăn, 2-3 vòi nhụy. Quả hình cầu, không tự mở, 2-3 hạt hình trứng hơi dẹt 2 bên hoặc có 3 góc. Hạt sần sùi. Có hoa vào tháng 7-8, quả tháng 9-10. Thu hái dây, lá vào mùa thu, phơi khô [106], [107].

Phân bố: Theo công bố mới nhất năm 2013, hiện nay có 45 loài *Gynostemma* trên thế giới. Trong đó loài *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.)

Makino là phổ biến nhất, được phân tán khắp Ấn Độ, Nepal, Lào, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Hàn Quốc và Nhật Bản. Trung Quốc là nơi đa dạng *Gynostemma* nhất, hiện nay đã biết tới 21 loài [108].

Ở Việt Nam, năm 2015 đã xác định được 5 loài thuộc chi *Gynostemma Blume*, trong đó chủ yếu là *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino [109]. Đến năm 2018 trong Dược điển Việt Nam V mới xuất hiện chuyên luận về Giảo cổ lam [110].

1.4.2.2. Thành phần hoá học chính của Giảo cổ lam

Hơn 230 hợp chất có nguồn gốc từ *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino đã được xác định và được nhóm lại theo cấu trúc hóa học gồm: saponin, sterol, flavonoid, polysaccharides và một số hợp chất khác [111]. Thành phần hóa học chính, chịu trách nhiệm về các tác dụng sinh học quan trọng của Giảo cổ lam là các saponin, còn được gọi là gypenosides (Gyps). Cho đến tháng 8/2016, 189 gypenosides đã được phân lập từ *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino và được mô tả đầy đủ bằng phương pháp quang phổ [111].

1.4.2.3. Một số nghiên cứu về tác dụng hạ glucose máu của Giảo cổ lam

Các nghiên cứu về tác dụng HGM của Giảo cổ lam cũng đều tập trung vào thành phần gypenosid [111], trong đó nổi bật là Phanosid một saponin dammaran mới được chiết xuất từ nguyên liệu Giảo cổ lam thu hái tại Việt Nam, do tác giả Việt Nam công bố [112],[113].

Bảng 1.4. Tóm tắt các nghiên cứu về tác dụng điều trị ĐTĐ của Giảo cổ Lam

| Tác dụng/Cơ chế tác dụng | TP có tác dụng | Đối tượng/Liều/Tgian | TLTK |
|--|--|---|----------------------------|
| Kích thích tụy bài tiết insulin. Cơ chế ngoài TB β , ức chế protein G_i , không giống cơ chế SU. Tăng giải phóng insulin từ các tiểu đảo. Cơ chế thông qua kênh K_{ATP} , kênh Ca^{2+} kiểu L, hệ thống PKA và phụ thuộc vào Ge- | Phanosid chiết xuất từ GCL DC của GCL | - Chuột công bình thường - Đảo tụy cô lập chuột công bình thường và chuột ĐTĐ typ 2 chủng GK | [112], [113], [114]. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| protein nhạy cảm với độc tính ho gà ở glucose cao | | | |
| Cải thiện test DNG. Tăng nhạy cảm của mô đích với insulin. Tăng nhạy cảm với insulin của gan do ức chế tân tạo glucose. Ức chế PTP1B. Hoạt hóa AMPK. Hoạt hóa các enzym chuyển hóa glucose ở gan. | DC nước, DC cồn DC 70% ethanol. DC ethanol chuẩn hóa gypenosid 0,0025% và 0,01% | Chuột cống lão hóa * 100-200 mg/kg *2th Chuột ĐTĐ/STZ * 500-1000mg/kg Chuột GK 1600mg/kg* 3 tuần Chuột nhắt C57BL/KsJ- db/db * 5 tuần Trên người: 3-9g/ng x 12 tuần | [115], [116], [117], [118] [119] |
| Tác dụng ức chế α -glucosidase | PĐ N-butanol, flavonoid của GCL | Trên nuôi cấy TB invitro | [120] |
| Hạ cholesterol, triglyceride và β -lipoprotein huyết tương, giảm LDL-C, tăng HDL. Hạ lipid máu do cải thiện sự nhạy cảm của receptor insulin. Chống béo phì, hoạt hóa AMPK. | Gypenosid PĐ saponin GCL DC nước GCL | Chuột Wistar nuôi béo 100mg/kg*7 tuần Chuột nhắt 700mg/kg Chuột Zucker * 250mg/kg* 2 tháng. Trên người:3-9g/ng x12 tuần | [108] [121]. [122]. [115] [123]. |
| HGM, Hạ TC, TG, fibrinogen, tăng HDL. Không có tác dụng phụ. Không có độc tính cấp, bán trường diễn. Không có độc tích lũy và không gây đột biến gen. | Dịch chiết GCL Gypenosid DC saponin toàn phần | Người 3g/ gói x 2 lần/ngày x 12 tuần 32 BN mỡ máu cao *120mg/kg gypenosid 300 BN tăng lipid máu* 8 tuần | [124], [125], [126] [127], [128]. |

1.4.3. Tri mẫu

1.4.3.1. Đặc điểm hình thái, phân bố, bộ phận dùng của Tri mẫu

Tri mẫu: *Anemarrhenae Aspheloides* (Bunge), họ Hành tỏi *Liliaceae* [110].

Đặc điểm hình thái: Tri mẫu là loại cỏ sống lâu năm, mọc ở vùng rừng núi. Thân rễ chạy ngang, dưới đất có củ cong queo. Lá rậm mọc từ gốc, hình dây rộng, lá mọc vòng, dài ~ 20-70cm, hẹp (3-5mm), đầu nhọn, phía dưới ôm vào nhau. Mùa hạ ra cành mang hoa, cành mọc từ kẽ lá có hình trụ tròn, dài chừng 60-90cm. Cụm hoa gồm những bông hoa nhỏ xếp thành 2 hàng, hoa có 6 cánh, sắc trắng, có những đường chỉ tím nhạt, mùi thơm, nở vào buổi tối. Quả

xốp, hình tròn, tam giác, hột 3 cạnh, sắc đen. Thu hoạch vào mùa xuân, thu. Đào lấy thân rễ củ, rửa sạch, cắt bỏ rễ con, phơi khô [129].

Phân bố: Tri mẫu mọc nhiều ở vùng núi cao, nơi có nhiều bóng râm, phía đông Châu Á, bắc Trung Quốc, Nhật bản. TM là một cây thuốc được dùng trong y học cổ truyền ở nhiều nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, đã di thực từ Trung Quốc vào Việt Nam từ lâu, hiện đang được trồng nhiều ở một số tỉnh phía Bắc như: Lạng Sơn, Sơn La, Lai Châu... [129].

Bộ phận dùng: chủ yếu là thân rễ Tri mẫu.

1.4.3.2. Thành phần hoá học chính của Tri mẫu

Năm 2016, những thành phần hóa học trong thân rễ Tri mẫu đã được xác định bằng HPLC (sắc ký lỏng hiệu năng cao) và phổ khối gồm 4 xanthones, 25 steroidal saponin và 8 cặp isomers [130], [131], [132], [133]. Đối với Tri mẫu, thành phần hóa học chính được quan tâm là các loại Xanthone C-glycozit: nổi bật là Mangiferin và neomangiferin [134].

1.4.3.3. Một số nghiên cứu về tác dụng hạ glucose máu của Tri mẫu

Bảng 1.5. Tóm tắt các nghiên cứu về tác dụng điều trị ĐTD của Tri mẫu

| <i>Tác dụng/Cơ chế tác dụng</i> | <i>TP có tác dụng</i> | <i>Đối tượng/Liều/Tgian</i> | <i>TLTK</i> |
|---|--|--|--|
| DC thân rễ TM có tác dụng HGM <i>Cơ chế:</i> Kích thích bài tiết insulin, giai đoạn xuất bào, thông qua Gi/ Ge- protein nhạy cảm với độc tố ho gà. Cải thiện test DNG. Tăng phosphoryl hóa AMPK. | DC nước thân rễ TM. DC ethanol DC toàn phần. DC polyphenol TM | Chuột nhắt bt* 90mg/kg Chuột ĐTD KK-Ay* 90mg/kg Chuột nhắt ĐTD/ALX và chuột KK-Cay *1700mg/kg. Chuột ĐTD/STZ* 300mg/kg (Tmb) & 1500mg/kg (uống) Nuôi cấy TB trên invitro | [135], [136], [137] [138], [139], [140] |
| <i>Cơ chế MF:</i> Không kích thích tuy bài tiết insulin. Tăng nhạy cảm của mô đích với insulin. Ức chế giáng hoá glycogen ở gan và/ hoặc ức chế tân tạo đường mới ở gan và cơ. Hạ TC và TG. | Mangiferin và glucoside của nó (mangiferin-7-O-d-glucoside) | Đào tụy cô lập chuột GK Chuột KK-Ay*1700mg/kg*5 tuần Chuột nhắt bt và ĐTD/STZ * 90mg/kg Chuột KK-Ay*30mg/kg*2 tuần | [141], [142], [138], [143], [144], [145]. |

1.4.4. Andiabet

Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu đã được kết hợp với nhau thành dạng cao mềm Vinabetes trong đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo của Phạm Hữu Điền (2012) [146]. Vinabetes có tỷ lệ kết hợp các loại dược liệu Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu lần lượt là 1,5: 1,5: 1 tương tự như Andiabet, nói cách khác đây là dạng tiền thân của Andiabet. Vinabetes đã được thử độc tính cấp, xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng là 42,98 g/kg [48]. Vinabetes cũng đã được nghiên cứu về độc tính bán trường diễn trên thỏ trong 4 tuần với 2 liều 1,8 g/kg/ngày và 3,6 g/kg/ngày [48]. Về tác dụng: Vinabetes liều 4,5 g/kg và 9 g/kg cho chuột nhắt trắng bình thường uống liên tục trong 4 tuần đã làm hạ glucose máu lần lượt là 34 % và 44% [56]. Còn trên chuột cống trắng gây ĐTĐ thực nghiệm uống Vinabetes liều 3 g/kg/ngày trong 2 tuần, nồng độ glucose máu giảm 44% [49]. Tuy nhiên, cao mềm Vinabetes chỉ mới được chiết xuất trong điều kiện phòng thí nghiệm và chưa có các nghiên cứu dược lý đầy đủ.

Viên nang cứng Andiabet là chế phẩm kết hợp của 3 loại thảo dược nêu trên, lần đầu tiên được chiết xuất, bào chế theo quy trình công nghiệp, đã được đưa ra thị trường như một loại thực phẩm chức năng. Đề tài này nghiên cứu tác dụng HGM, một số cơ chế tác dụng HGM của Andiabet với mong muốn tạo ra một thuốc hỗ trợ điều trị ĐTĐ hiệu quả.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Chất liệu nghiên cứu

2.1.1.1. Chế phẩm nghiên cứu:

Chế phẩm thử Andiabet dạng viên nang cứng gồm các thành phần sau:

Bảng 2.1. Thành phần viên Andiabet

| TT | Công thức viên nang cứng | Phương pháp chiết | Khối lượng trong 1 viên |
|----|--|-------------------|-------------------------|
| 1 | Cao khô lá Bằng lăng nước <i>Lagerstroemia speciosa</i> (L.) Pers. | Chiết cồn 70% | 200 mg |
| 2 | Cao khô thân, rễ, lá Giảo cổ lam <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino | Chiết nước | 200 mg |
| 3 | Cao thân rễ Tri mẫu <i>Anemarrhena asphdeloides</i> (Bunge) | Chiết cồn 50% | 133 mg |
| 4 | Tá dược vừa đủ | | 590mg |

Chế phẩm được sản xuất đạt tiêu chuẩn cơ sở (phụ lục 1 & 2) và được cung cấp bởi Công ty cổ phần Traphaco, Hà Nội. Tất cả các thuốc nghiên cứu cần phải được cất giữ ở nơi an toàn trong điều kiện bảo quản thích hợp. Điều kiện bảo quản thích hợp được ghi trên nhãn thuốc nghiên cứu.

2.1.1.2. Hoá chất phục vụ nghiên cứu

- Streptozotocin lọ 1g, hãng Sigma-Aldrich (Mỹ)
- Insulin Humalin R 100U, lọ 10ml của Lily (Mỹ).
- Diamicron (gliclazid) viên nén 80mg do hãng Servier (France) sản xuất.
- Metformin hydroclorid (Glucophage), dạng viên nén 500mg do công ty Merch-Lipha Sante (Đức) sản xuất.
- Acarbose (Glucobay) viên nén 100mg của hãng Bayer AG Germany (Đức)
- Tinh bột khoai gói 200 mg của Công ty TNHH Động Học STELLA, Tp.HCM.

- Đường glucose gói 500 g, đường sucrose lọ 500g của Công ty TNHH Thương mại Dược Phẩm Nhật Quang, Phú Thọ.
- Dung dịch Heparin 5000 UI/ml, lọ 5ml, hãng Rotexmedica, Germany (Đức)
- Dung dịch glucose 20 %, chai 500ml của Công ty TNHH B Braun Việt Nam.
- Dung dịch NaCl 0,9%, chai 500ml của Euro-Med® Laboratories Phil., inc.
- Bộ kit định lượng các enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT, AST, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần, triglycerid, HDL-C, creatinin của hãng Hospitex Diagnostics (Italy) và hãng DIALAB GmbH (Áo).
- Các dung dịch xét nghiệm máu của hãng Exigo, định lượng trên máy Exigo – Boule Medical AB của Thụy Điển.
- Các hóa chất xét nghiệm và làm tiêu bản mô bệnh học.

2.1.1.3. Thiết bị phục vụ nghiên cứu

- Máy đo đường huyết và kit định lượng glucose Onetouch Verio của Lifescan Europe Thụy Sĩ.
- Máy xét nghiệm sinh hoá máu bán tự động Screen master của hãng Hospitex Dianostics (Italy).
- Bơm tiêm truyền tự động của công ty Kd Scientific Instrument
- Các dụng cụ và hóa chất khác đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

2.1.2. Động vật nghiên cứu

- Thỏ chủng *Newzealand White*, cả hai giống, khoẻ mạnh, lông trắng, cân nặng 1,8 - 2,5 kg do Trung tâm cung cấp động vật thí nghiệm Đan Phượng – Hà Tây cung cấp để nghiên cứu độc tính bán trường diễn.
- Chuột nhắt trắng chủng *Swiss*, tuổi từ 5-6 tuần, khoẻ mạnh, cả hai giống đực, cái, cân nặng 18 - 22 g, do viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương cung cấp, dùng để tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và nghiên cứu tác dụng hạ glucose máu.

Động vật thực nghiệm được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm (nhiệt độ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm trung bình $55 \pm 5\%$, chu kỳ 12 giờ sáng/tối)

5 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu được ăn bằng thức ăn chuẩn riêng cho từng loại (Công ty liên doanh Guyomarc'h-VCN và Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp), được uống nước tự do và theo dõi cân nặng trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm tại các phòng thí nghiệm của bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội và bộ môn Dược Lực - Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp xác định độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên Andiabet

2.2.1.1. *Xác định độc tính cấp*

Nguyên tắc: Xác định độc tính cấp của chế phẩm thử Andiabet trên chuột nhắt trắng theo đường uống theo hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới (WHO) về thuốc có nguồn gốc dược liệu [147].

Tiến hành: Chuột nhắt trắng nặng $20 \pm 2g$, được chia thành từng lô, mỗi lô 10 con. Trước khi tiến hành thử nghiệm, chuột được nhịn ăn 16 giờ qua đêm, uống nước theo nhu cầu. Lấy 40 viên Andiabet, bỏ vỏ nang, nghiền kỹ trong cối sứ, thêm nước cất vừa đủ thành 40 ml (1ml tương ứng 1 viên Andiabet). Đây là dung dịch đậm đặc nhất có thể cho chuột nhắt trắng uống bằng kim đầu tù. Từ liều đặc nhất, thêm nước cất pha loãng dần thành các tỷ lệ khác nhau. Cho chuột uống chế phẩm thử với liều tăng dần với cùng một thể tích. Theo dõi liên tục trong 4 giờ đầu và tiếp tục theo dõi đến 72 giờ sau khi uống chế phẩm thử.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tình trạng chung của chuột, các hoạt động tự nhiên như đi lại, leo trèo, tư thế, màu sắc của mũi, tai, đuôi... dấu hiệu nhiễm độc như nôn, co giật, kích động, sự bài tiết phân, nước tiểu...
- Số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Tất cả chuột chết

được mô để đánh giá tổn thương đại thể của các cơ quan. Từ đó xây dựng đồ thị tuyến tính để xác định LD₅₀ của thuốc thử (nếu có) theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [148].

2.2.1.2. Xác định độc tính bán trường diễn

Nguyên tắc: Phương pháp nghiên cứu độc tính bán trường diễn theo đường uống, trên thỏ được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới (WHO) về thuốc có nguồn gốc dược liệu [147].

Tiến hành: Thỏ được chia làm 3 lô (10 con/lô), mỗi con nhốt riêng một chuồng. Thỏ được uống nước hoặc chế phẩm thử trong 90 ngày liên tục, mỗi ngày một lần vào buổi sáng.

- Lô chứng: uống nước cất 3 ml/kg/ngày.
- Lô thử 1: uống chế phẩm thử Andiabet liều 0,21 g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương liều dự kiến dùng trên người).
- Lô thử 2: uống chế phẩm thử Andiabet liều 0,64 g/kg/ngày (liều có tác dụng tương đương với liều gấp 3 lần liều dự kiến dùng trên người).

Thông số đánh giá:

- Tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng của thỏ.
- Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu.
- Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng các chỉ số sinh hóa như: ALT, AST, bilirubin toàn phần, cholesterol, albumin máu...
- Đánh giá chức năng thận thông qua chỉ số nồng độ creatinin huyết thanh.

Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống chế phẩm thử, sau 30, 60 và 90 ngày uống chế phẩm thử. Sau 90 ngày uống chế phẩm thử, thỏ được mô để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 3 thỏ/lô ở mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện bởi PGS.

TS Lê Đình Roanh, tại Trung tâm nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư (Liên hiệp các hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam - 58 Nguyễn Quyền - Hà Nội).

2.2.2. Phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose máu và sơ bộ cơ chế tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên thực nghiệm.

2.2.2.1. Phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose máu của Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường.

Nguyên tắc: Đánh giá tác dụng HGM của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường, ở 2 mức liều (Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày là liều tương đương liều dự kiến dùng trên người và Andiabet liều 2g/kg/ngày là liều gấp 3 lần liều dự kiến dùng trên người). So sánh tác dụng HGM giữa 2 liều.

Tiến hành: Chuột nhắt trắng cả 2 giống, được chia làm 4 lô (10 con/lô).

- Lô 1 (Chứng sinh học): Uống nước cất
- Lô 2 (Chứng dương): Uống gliclazid liều 80 mg/kg.
- Lô 3 (Andiabet 0,68g/kg): Uống Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày
- Lô 4 (Andiabet 2g/kg): Uống Andiabet liều 2g/kg/ngày

Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong 2 tuần vào các buổi sáng. Tiến hành lấy máu, định lượng nồng độ glucose máu tại 3 thời điểm: chưa uống thuốc (t_0); sau uống thuốc thử 1 tuần (t_1) và sau uống thuốc thử 2 tuần (t_2).

Thông số đánh giá: nồng độ glucose máu. Tại các thời điểm lấy máu, chuột đã được nhịn ăn 16 giờ qua đêm, cắt bỏ 2 mm đuôi chuột để máu chảy tự nhiên, thấm bỏ giọt máu đầu tiên, rồi nhỏ một giọt vào que thử dùng cho máy thử đường máu tương ứng.

2.2.2.2. Phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose máu của Andiabet trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2.

Nguyên tắc: Để đánh giá tác dụng HGM của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2, thiết kế nghiên cứu gồm 2 giai đoạn: gây mô hình ĐTĐ

typ 2 và đánh giá tác dụng HGM máu của viên Andiabet trên chuột nhất gây ĐTD typ 2.

Tiến hành:

❖ Giai đoạn 1: Gây mô hình ĐTD typ 2 theo phương pháp của Srinivasan [149] và Rivera [150].

Chuột nhất trắng sau khi nuôi ổn định 5 ngày, được chia làm 2 nhóm:

- Nhóm 1 (n = 10 con): Chuột được nuôi bằng chế độ ăn bình thường (NFD - normal fat diet) trong 8 tuần liên tục.
- Nhóm 2 (n = 100 con): chuột được nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo (HFD - high fat diet) trong 8 tuần liên tục.

Sau 8 tuần nuôi bằng chế độ ăn bình thường, tất cả các chuột nhóm 1 được tiêm dung dịch đệm citrat pH 4.5 là dung môi pha STZ. Còn sau 8 tuần nuôi béo, tất cả các chuột nhóm 2 được tiêm STZ liều 100mg/kg.

72 giờ sau tiêm STZ hoặc dung dịch đệm, tiến hành lấy máu, định lượng nồng độ glucose máu lúc đói (sau nhịn ăn 16 giờ) tại 3 thời điểm: bắt đầu tham gia nghiên cứu, sau khi nuôi béo 8 tuần (hay trước khi tiêm STZ) và 72 giờ sau tiêm STZ. Lựa chọn các chuột ở nhóm 2 tiêm STZ bị ĐTD (tức là có mức glucose lúc đói > 10 mmol/l) đưa vào nghiên cứu.

❖ Giai đoạn 2: Đánh giá tác dụng HGM của viên Andiabet:

Sau khi gây được mô hình ĐTD typ 2, những chuột ở nhóm 2 được lựa chọn tiếp tục được chia thành các lô để đánh giá tác dụng HGM của Andiabet trong đó: Nhóm chuột ăn chế độ ăn bình thường (NFD) ở giai đoạn trên tiếp tục được sử dụng làm lô 1 (lô chứng trắng) và các chuột bị ĐTD typ 2 được chia thành 5 lô, từ lô 2 đến lô 6, mỗi lô 10 con:

- Lô 1 (chứng sinh học): Chuột ăn chế độ ăn bình thường + uống nước cất.
- Lô 2 (chứng bệnh): Chuột ĐTD + uống nước cất.
- Lô 3 (chứng dương): Chuột ĐTD + uống gliclazid 80 mg/kg/ngày.

- Lô 4 (Andiabet 0,68 g/kg): Chuột ĐTĐ + uống Andiabet 0,68g/kg/ngày.
- Lô 5 (Andiabet 1 g/kg): Chuột ĐTĐ + uống Andiabet liều 1 g/kg/ngày.
- Lô 6 (Andiabet 2 g/kg): Chuột ĐTĐ + uống Andiabet liều 2 g/kg/ngày.

Tất cả chuột ở 6 lô được uống thuốc thử tương ứng liên tục trong 14 ngày vào các buổi sáng. Tiến hành định lượng glucose máu tại 3 thời điểm t_0 (chưa uống thuốc), t_1 (sau 1 tuần uống thuốc), t_2 (sau 2 tuần uống thuốc), và chỉ số lipid máu tại thời điểm t_2 (sau 2 tuần uống thuốc). Đồng thời mổ chuột lấy gan, tụy để đánh giá khối lượng, quan sát hình ảnh đại thể và vi thể ngẫu nhiên 30% số chuột mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu và phát hiện sớm Ung thư (Liên hiệp các hội khoa học và kỹ thuật Việt Nam - 58 Nguyễn Quyền - Hà Nội)

Các thông số đánh giá:

- Cân nặng chuột sau 2, 4, 6 và 8 tuần nuôi béo (đánh giá tình trạng béo phì).
- Nồng độ glucose máu trung bình mỗi lô chuột đo tại các thời điểm t_0 , t_1 , t_2 .
- Các chỉ số lipid: TC, TG, HDL - cholesterol, LDL - cholesterol,
- Quan sát hình ảnh đại thể và cân khối lượng gan, tụy chuột.
- Đánh giá tổn thương vi thể gan và tụy chuột nhất.

Chế độ ăn bình thường và chế độ ăn giàu chất béo có thành phần như sau:

Bảng 2.2. Chế độ ăn NFD và HFD tính trên 100g thức ăn.

| | Chế độ ăn (g) | |
|--------------------------|-------------------|----------------------|
| | Bình thường (NFD) | Giàu chất béo (HFD)* |
| Protein | 28,05 | 18,23 |
| Chất béo no | 12,14 | 42,89 |
| Carbonhydrat | 59,81 | 38,88 |
| Tổng (gam) | 100 | 100 |
| Năng lượng (kcal) | 467,5 | 614,5 |

*Siro fructose 55% (Daesang Corporation) được trộn thêm vào thức ăn của chuột nhất ăn chế độ HFD

2.2.2.3. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự dung nạp glucose, sucrose và tinh bột của Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường và chuột gây ĐTĐ typ 2.

Nguyên tắc: Đánh giá khả năng ức chế sự dung nạp glucose/sucrose/tinh bột của Andiabet bằng cách cho chuột nhắt trắng bình thường và chuột gây ĐTĐ typ 2 uống glucose/sucrose/tinh bột sau đó so sánh mức độ tăng glucose máu và so sánh diện tích dưới đường cong (AUC) của lô uống Andiabet so với lô chứng tại các thời điểm trước khi uống, sau 30, 60 và 120 phút uống glucose/sucrose/tinh bột [64].

♦ *Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự dung nạp glucose/sucrose/tinh bột của Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường.*

Tiến hành: Chuột nhắt trắng trưởng thành, cả 2 giống, được chia ngẫu nhiên thành 5 lô (10 con/lô):

- Lô 1 (Lô chứng sinh học): uống nước cất.
- Lô 2 (chứng dương): uống Acarbose 14 mg/kg/ngày.
- Lô 3 (chứng dương): uống Metformin 250 mg/kg/ngày
- Lô 4 (Andiabet 1g/kg): uống Andiabet liều 1 g/kg/ngày.
- Lô 5 (Andiabet 2g/kg): uống Andiabet liều 2 g/kg/ngày.

Chuột được uống nước cất hoặc acarbose hoặc metformin hoặc Andiabet trong 14 ngày liên tục vào các buổi sáng. Ngày thứ 15 (chuột đã được nhịn đói qua đêm 16h), sau khi uống thuốc thử 1 giờ, cho chuột uống glucose liều 2 g/kg (đối với test dung nạp glucose) hoặc uống sucrose liều 4 g/kg (đối với test dung nạp sucrose), hoặc uống tinh bột khoai liều 6 g/kg (đối với test dung nạp tinh bột). Tiến hành định lượng nồng độ glucose máu tại các thời điểm trước khi uống, 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi uống glucose hoặc sucrose hoặc tinh bột.

Thông số đánh giá:

- Nồng độ glucose máu tại các thời điểm.
- Đỉnh tăng glucose máu (PBG) – Mức độ tăng glucose máu tối đa của cả nhóm sau khi uống glucose.
- Diện tích dưới đường cong AUC glucose máu được tính theo công thức hình thang.

Công thức tính AUC như sau [151]:

$$AUC = \left(\frac{C_0 + C_{30}}{2} \right) \times (t_{30} - t_0) + \left(\frac{C_{30} + C_{60}}{2} \right) \times (t_{60} - t_{30}) + \left(\frac{C_{60} + C_{120}}{2} \right) \times (t_{120} - t_{60})$$

Trong đó $C_0, C_{30}, C_{60}, C_{120}$ lần lượt là nồng độ glucose máu đo được tại các thời điểm trước uống (t_0), 30 phút (t_{30}), 60 phút (t_{60}), 120 phút (t_{120}).

♦ *Phương pháp đánh giá khả năng ức chế sự dung nạp glucose/sucrose/tinh bột của Anddiabet trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2.*

Tiến hành: Gây mô hình ĐTĐ typ 2: cho chuột nhắt bằng chế độ ăn giàu chất béo kết hợp tiêm STZ liều thấp 100 mg/kg (đã mô tả trong mục 2.2.2.2). Sau khi gây được mô hình ĐTĐ typ 2, những chuột được lựa chọn tiếp tục được chia ngẫu nhiên thành 5 lô tương tự như trên chuột nhắt trắng bình thường:

Lô 1 (chứng trắng): Chuột ĐTĐ typ 2 + uống nước cất.

Lô 2 (chứng dương): Chuột ĐTĐ typ 2 + uống acarbose 14 mg/kg/ngày.

Lô 3 (chứng dương): Chuột ĐTĐ typ 2 + uống metformin 250 mg/kg/ngày

Lô 4 (Anddiabet 1g/kg): Chuột ĐTĐ typ 2 + uống Anddiabet 1 g/kg/ngày.

Lô 5 (Anddiabet 2g/kg): Chuột ĐTĐ typ 2 + uống Anddiabet 2 g/kg/ngày.

Cách tiến hành các test dung nạp glucose, sucrose và tinh bột trên chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2 cũng tương tự như trên chuột nhắt trắng bình thường: Chuột được uống nước cất hoặc acarbose hoặc metformin hoặc Anddiabet trong 14 ngày liên tục vào buổi sáng. Ngày thứ 15 (chuột đã được nhịn đói qua đêm 16h), sau khi uống thuốc thử 1 giờ, cho chuột uống glucose liều 2 g/kg (đối với test dung nạp glucose) hoặc uống sucrose liều 4 g/kg (đối với test dung nạp sucrose), hoặc uống tinh bột khoai liều 6 g/kg (đối với test dung nạp tinh bột).

Tiến hành định lượng nồng độ glucose máu tại các thời điểm thời điểm t_0 , t_{30} , t_{60} và t_{120} sau khi uống glucose hoặc sucrose hoặc tinh bột. Xác định đỉnh tăng glucose máu (PBG - PBG là mức độ tăng glucose máu tối đa của cả nhóm) và diện tích dưới đường cong (AUC) của các lô để đánh giá khả năng ức chế sự dung nạp glucose/sucrose/tinh bột của chế phẩm thử Andiabet.

Thông số đánh giá: giống như trên chuột nhất trắng bình thường.

2.2.2.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của Andiabet đến mức kháng insulin của chuột nhất trắng gây ĐTD typ 2.

Nguyên tắc: Để đánh giá tác dụng của thuốc thử trên mức độ kháng insulin của chuột nhất trắng gây ĐTD typ 2, sử dụng kỹ thuật “kẹp duy trì glucose ổn định - tăng insulin máu” (Hyperinsulinemic - euglycemic clamp test), gọi tắt là kỹ thuật “kẹp insulin - đẳng glucose”. Mục đích là giữ nồng độ insulin máu ổn định ở mức cao (bằng cách truyền insulin liên tục với tốc độ hằng định) đồng thời duy trì nồng độ glucose máu không thay đổi bằng cách truyền dung dịch glucose. Khi đưa nồng độ insulin tăng và giữ ở mức cao, tốc độ truyền glucose và tốc độ chuyển hóa glucose phản ánh mức độ gắn insulin vào các receptor ở mô ngoại vi. Mức độ nhạy cảm với insulin của tất cả các mô trong cơ thể được xác định thông qua khả năng tiêu thụ glucose của cơ thể trong điều kiện nồng độ glucose đạt trạng thái ổn định (steady state) [54]

Tiến hành: Chuột nhất trắng được gây ĐTD typ 2 (đã mô tả trong mục 2.2.2.2) được chia thành 4 lô (7 con/lô), được uống thuốc thử hoặc nước cất trong 2 tuần liên tiếp với thể tích 0.2ml/10g chuột.

Lô 1 (chứng trắng): Chuột bình thường + uống nước cất

Lô 2 (chứng bệnh): Chuột ĐTD typ 2 + uống nước cất

Lô 3 (Andiabet 1g/kg): Chuột ĐTD typ 2 + uống andiabet liều 1g/kg/ngày

Lô 4 (Andiabet 2g/kg): Chuột ĐTD typ 2 + uống andiabet liều 2g/kg/ngày.

Ngày thứ 15 (sau uống thuốc thử 1 giờ), tiến hành kỹ thuật “kẹp duy trì

glucose ổn định-tăng insulin máu” để đánh giá mức độ kháng insulin. Chuột được nhịn đói qua đêm (18 giờ) trước khi tiến hành kẹp insulin [55], [47]:

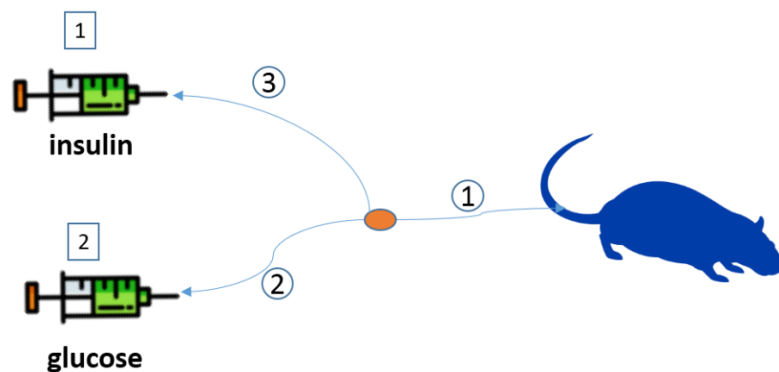
♦ Chuẩn bị huyết tương

Lấy 1ml máu chuột nhất cho 1ml máu đó vào ống nghiệm chứa 0,5ml EDTA. Ly tâm ống nghiệm trên (16.000 vòng/1 phút), thu huyết tương để pha insulin.

♦ Chuẩn bị dung dịch insulin truyền:

Sử dụng huyết tương thu được ở trên để tạo ra dung dịch truyền huyết tương 3% (bằng cách cho 6 ml nước muối sinh lý vào ống nghiệm, bỏ đi 180 μ l và thêm 180 μ l huyết tương). Sau đó lấy 180 μ l dung dịch huyết tương 3% ở trên, cho vào một ống nghiệm khác và thêm 20 μ l insulin U-100 (pha loãng gấp mười lần để tạo ra 200 μ l dung dịch U-10). Tiếp theo, chuyển 5 ml dung dịch huyết tương 3% vào ống nghiệm mới. Tính toán và thêm insulin U-10/1ml vào dung dịch 5 ml huyết tương để đạt được nồng độ dịch truyền insulin mong muốn dựa trên trọng lượng chuột, tốc độ truyền của bơm, và tốc độ truyền insulin mong muốn.

♦ Chuẩn bị trước khi kẹp insulin:



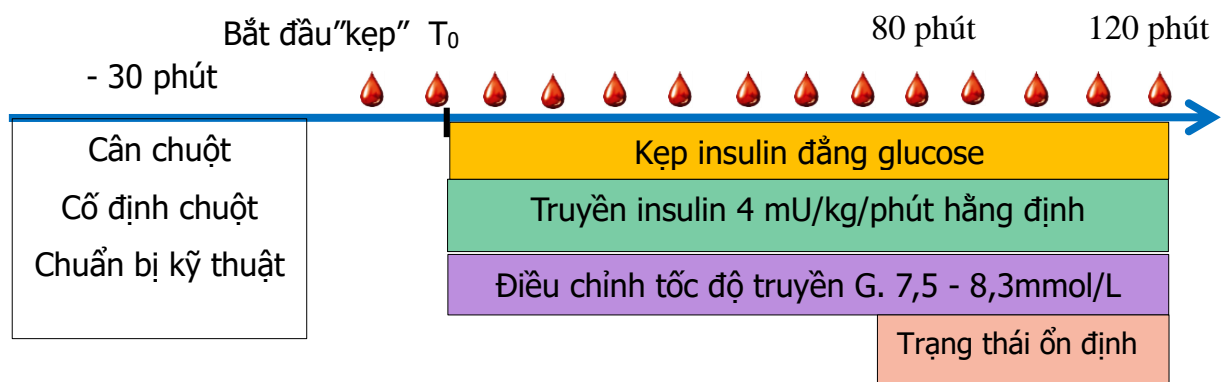
Hình 2.1. Sơ đồ cách tiến hành thí nghiệm kẹp

Chuột được nhốt trong cũi, để thò đuôi ra ngoài. Luồn kim bướm đã được làm đầy bằng dung dịch heparin vào trong tĩnh mạch đuôi chuột, sau đó cố định đuôi chuột bằng băng dính y tế. Sử dụng thiết bị có 3 trục, hình chữ Y (Y

connector) để kết nối các dây truyền dịch. Kim bơm được nối với 1 đầu của Y connector (1). Hai đầu còn lại (2) và (3) của Y connector được nối với bơm tiêm insulin hoặc xilanh truyền glucose. Lắp xilanh chứa insulin vào bơm tiêm điện 1, và lắp xilanh chứa glucose 20 % vào bơm tiêm điện 2. Thí nghiệm được bố trí như hình 2.1.

♦ Tiến hành kẹp insulin:

Tại thời điểm t_0 ngay trước khi kẹp insulin, lấy máu đuôi chuột để xác định nồng độ glucose máu. Sau đó truyền insulin liên tục với tốc độ: 4 mU/kg/phút, duy trì tốc độ không đổi trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm. Đồng thời truyền glucose 20 %: tốc độ truyền ban đầu dựa vào nồng độ glucose máu đo được tại thời điểm t_0 . Sau đó cứ 10 phút/lần, lấy máu đuôi chuột để đo nồng độ glucose máu và dựa trên kết quả đo được điều chỉnh tốc độ truyền glucose sao cho nồng độ glucose máu đạt được luôn trong khoảng 7,5 - 8,3 mmol/L, tiếp tục truyền insulin. Tại các thời điểm $t = 80, 90, 100, 110, 120$ phút sau khi truyền insulin và glucose, nồng độ glucose máu đo được được sử dụng làm kết quả để đánh giá. So sánh nồng độ glucose máu, tốc độ truyền glucose tại các thời điểm “kẹp” ở lô uống mẫu thử so với lô chứng, để đánh giá tác dụng của các mẫu thử trên mức độ nhạy cảm với insulin của động vật thí nghiệm. Chuột được sưởi ấm 30 phút trước khi truyền và trong suốt quá trình truyền dịch để tránh hạ nhiệt độ [55], [152].



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm “kẹp” insulin

Thông số theo dõi: Nồng độ glucose máu ở trạng thái ổn định và tốc độ truyền glucose ở trạng thái ổn định từ phút 80 -120.

2.3. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

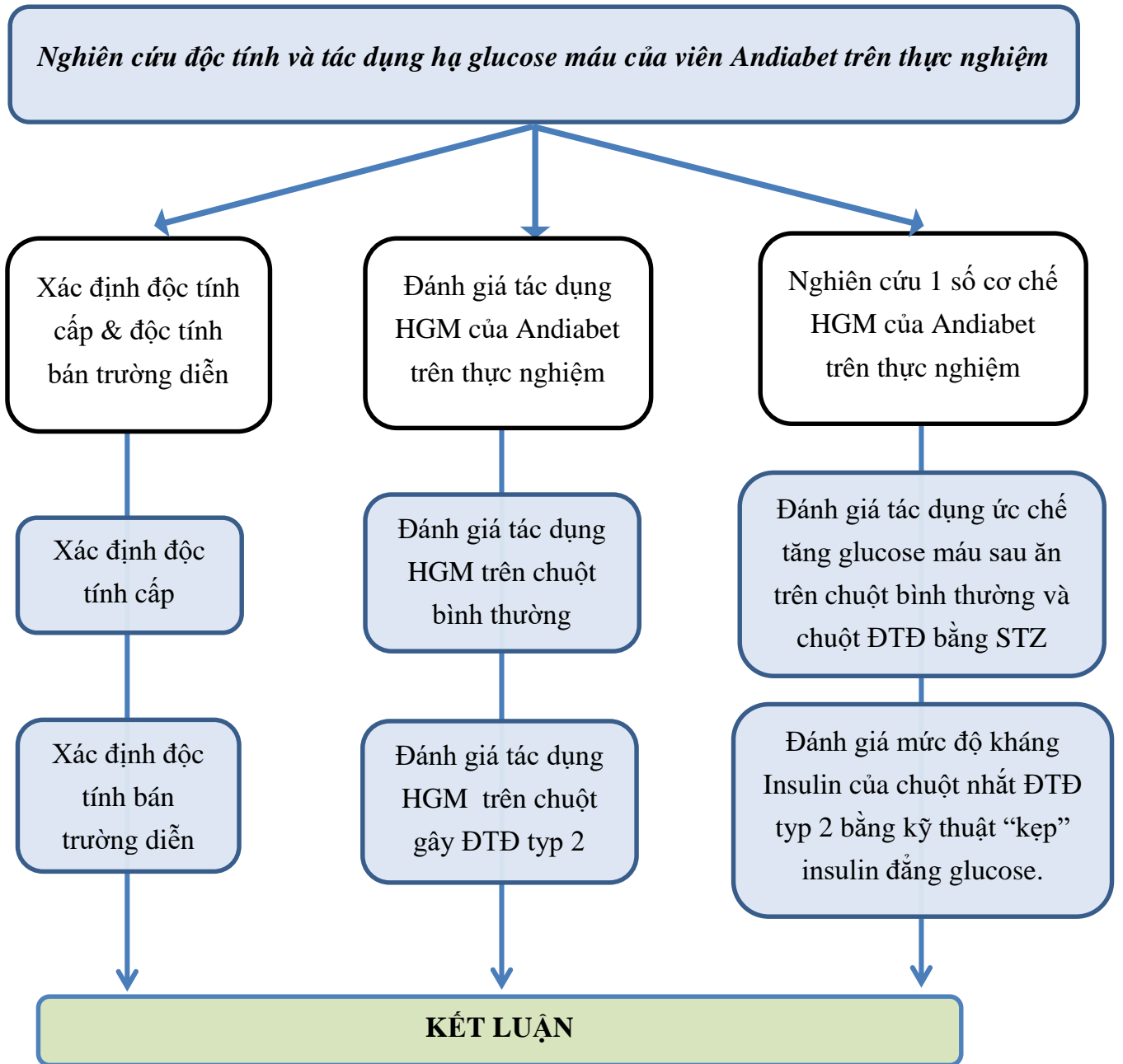
Xử lý số liệu:

Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và IBM - SPSS version 22. Trước khi đưa vào phân tích, số liệu này được kiểm tra ngẫu nhiên, tránh sai sót trong quá trình nhập số liệu.

Phương pháp thống kê:

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp t-test Student, phân tích phương sai ANOVA đơn biến. Kiểm định giả thiết: nếu phương sai đồng nhất, sử dụng test post hoc Dunnett's. Phương sai không đồng nhất dùng test post hoc Games-Howell. Số liệu được biểu diễn dưới dạng: $\bar{X} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Đề tài nghiên cứu được từng bước tiến hành theo sơ đồ 2.4.



Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA VIÊN ANDIABET

3.1.1. Độc tính cấp

Chuột nhắt trắng được uống chế phẩm thử Andiabet tăng dần đến liều cao nhất là 44,25 g/kg thể trọng chuột tương đương 0,25 ml/10g, 3 lần trong 24 giờ. Theo dõi không thấy có chuột nào chết, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ và trong suốt 7 ngày. Liều 44,25 g/kg là liều tối đa có thể dùng được bằng đường uống để đánh giá độc tính cấp của chế phẩm thử Andiabet (nồng độ đặc nhất, thể tích uống tối đa, số lần uống tối đa trong 24 giờ).

Bảng 3.1. Kết quả độc tính cấp của viên Andiabet

| Liều Andiabet (g/kg chuột) | Tình trạng chuột | | |
|-------------------------------|---|---|---|
| | Trong 4 giờ đầu | Trong 72 giờ | Trong 7 ngày |
| 44,25 g/kg | Chuột hoạt động bình thường, phân nước tiểu bình thường, phân xạ tốt với kích thích. Không có chuột chết. | Chuột hoạt động bình thường, phân nước tiểu bình thường, niêm mạc hồng hào, lông mượt, phân xạ tốt với kích thích. Không có chuột chết. | Chuột hoạt động, ăn uống bình thường, phân nước tiểu bình thường, niêm mạc hồng hào. Không có chuột chết. |

Như vậy Andiabet không có biểu hiện độc tính cấp ở liều 44,25 g/kg. Vì vậy chưa xác định được LD₅₀ trên chuột nhắt trắng của chế phẩm thử Andiabet trên đường uống [148]. Vậy theo WHO, Andiabet là chế phẩm thử nguồn gốc dược liệu có tính an toàn [147].

3.1.2. Độc tính bán trường diễn

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của viên nang Andiabet lên tình trạng sức khỏe chung của thử nghiệm, lên cân nặng, chức năng tạo máu và chức năng gan, thận thử sau khi uống liều lặp lại 90 ngày. Các kết quả được thu thập tại 4 thời điểm: trước uống thuốc (t₀); sau 30 ngày (t₁);

sau 60 ngày (t_2) và sau 90 ngày uống thuốc (t_3) như sau:

3.1.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng của thỏ:

❖ Tình trạng chung:

Trong thời gian thí nghiệm, thỏ ở cả 3 lô hoạt động bình thường, nhanh nhẹn, mắt sáng, lông mượt, ăn uống tốt, phân khô. Không thấy biểu hiện gì đặc biệt ở cả 3 lô thỏ trong suốt thời gian nghiên cứu.

❖ Sự thay đổi cân nặng thỏ:

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của Andiabet đến cân nặng thỏ

| Thời Điểm | Lô chứng (n =10) | | Lô thử 1 (n =10) | | Lô thử 2 (n =10) | | p |
|------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|--------|
| | Cân nặng (kg) | % tăng cân | Cân nặng (kg) | % tăng cân | Cân nặng (kg) | % tăng cân | |
| t₀ | 2,02 ± 0,08 | | 2,01 ± 0,19 | | 2,00 ± 0,13 | | > 0,05 |
| t₁ | 2,22 ± 0,15 | 9,90 | 2,18 ± 0,18 | 8,46 | 2,23 ± 0,16 | 11,50 | > 0,05 |
| P (trước – sau) < 0,05 | | | | | | | |
| t₂ | 2,40 ± 0,13 | 18,81 | 2,29 ± 0,15 | 13,93 | 2,24 ± 0,23 | 12,00 | > 0,05 |
| p (trước – sau) < 0,05 | | | | | | | |
| t₃ | 2,44 ± 0,13 | 20,79 | 2,32 ± 0,25 | 15,42 | 2,40 ± 0,20 | 20,00 | > 0,05 |
| p (trước – sau) < 0,05 | | | | | | | |

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy: sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống Andiabet, cân nặng trung bình của thỏ ở cả 3 lô (lô chứng và 2 lô thử) đều tăng so với trước khi nghiên cứu. Không có sự khác biệt về mức độ gia tăng cân nặng thỏ giữa lô chứng và các lô dùng chế phẩm thử ($p > 0,05$).

3.1.2.2. Đánh giá chức năng tạo máu.

Ảnh hưởng của thuốc đến chức năng tạo máu được đánh giá thông qua các chỉ số huyết học như: số lượng hồng cầu, lượng hemoglobin, hematocrit,

thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu. Kết quả thực nghiệm được thể hiện trên bảng 3.3 và 3.4 sau:

❖ Các chỉ số huyết học:

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của Andibet đến các chỉ số huyết học trong máu thỏ

| Chỉ tiêu | | Lô chứng (n =10) | Lô thử 1 (n =10) | Lô thử 2 (n =10) | pc-T1 | pc-T2 |
|--|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|--------|
| Số lượng hồng cầu (T/l) | t ₀ | 5,12 ± 0,24 | 4,92 ± 0,22 | 5,01 ± 0,27 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 4,83 ± 0,51 | 4,72 ± 0,40 | 4,96 ± 0,35 | | |
| | t ₂ | 5,07 ± 0,91 | 4,68 ± 0,36 | 4,79 ± 0,32 | | |
| | t ₃ | 5,01 ± 0,40 | 4,58 ± 0,54 | 4,92 ± 0,75 | | |
| Hemoglobin (g/dL) | t ₀ | 9,16 ± 0,49 | 8,88 ± 0,37 | 9,09 ± 0,67 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 10,35 ± 2,68 | 9,26 ± 0,56 | 9,81 ± 0,85 | | |
| | t ₂ | 10,21 ± 2,16 | 9,15 ± 0,57 | 9,42 ± 0,59 | | |
| | t ₃ | 9,33 ± 1,18 | 8,90 ± 1,43 | 9,32 ± 2,20 | | |
| Hematocrit (%) | t ₀ | 32,93 ± 1,93 | 31,96 ± 1,10 | 32,69 ± 1,80 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 31,67 ± 6,23 | 29,90 ± 4,80 | 30,76 ± 2,41 | | |
| | t ₂ | 32,18 ± 5,53 | 30,79 ± 5,24 | 31,13 ± 3,05 | | |
| | t ₃ | 32,55 ± 5,27 | 30,66 ± 6,87 | 32,70 ± 5,61 | | |
| Thể tích trung bình hồng cầu (fl) | t ₀ | 64,28 ± 2,58 | 65,83 ± 2,15 | 65,23 ± 0,84 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 61,14 ± 4,53 | 63,00 ± 4,58 | 62,46 ± 4,04 | | |
| | t ₂ | 63,33 ± 4,13 | 63,64 ± 4,71 | 63,86 ± 4,56 | | |
| | t ₃ | 63,80 ± 4,37 | 62,30 ± 5,10 | 62,90 ± 5,30 | | |
| Số lượng bạch cầu (G/l) | t ₀ | 7,10 ± 0,82 | 7,19 ± 1,24 | 7,68 ± 1,44 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 8,13 ± 1,05 | 8,49 ± 1,48 | 8,55 ± 1,44 | | |
| | t ₂ | 8,06 ± 1,76 | 8,37 ± 1,83 | 8,51 ± 1,88 | | |
| | t ₃ | 8,57 ± 2,25 | 8,51 ± 1,80 | 8,43 ± 1,46 | | |
| Số lượng tiểu cầu (G/l) | t ₀ | 165,60 ± 50,10 | 152,20 ± 50,49 | 185,30 ± 62,06 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 188,00 ± 54,12 | 169,10 ± 59,98 | 166,90 ± 39,24 | | |
| | t ₂ | 154,40 ± 41,94 | 144,40 ± 34,04 | 165,60 ± 57,24 | | |
| | t ₃ | 177,90 ± 46,50 | 193,70 ± 56,35 | 147,90 ± 51,20 | | |

Ghi chú: pc-T1 và pc-T2: giá trị p lô thử 1 và lô thử 2 so với lô chứng cùng thời điểm.

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy: Ở tất cả các thời điểm: trước khi uống chế phẩm thử, sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống Andiabet, các xét nghiệm đánh giá chức năng tạo máu gồm số lượng hồng cầu, hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu nhỏ, số lượng bạch cầu và số lượng tiểu cầu trong máu nhỏ thử nghiệm ở cả lô thử 1 (uống Andiabet liều tương đương lâm sàng 0,21g/kg/ngày) và lô thử 2 (uống Andiabet liều gấp 3 lần lâm sàng 0,64g/kg/ngày) đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng (uống nước cất) cùng thời điểm cũng như khi so sánh giữa thời điểm trước và các thời điểm sau khi uống chế phẩm thử ($p > 0,05$).

❖ *Công thức bạch cầu:***Bảng 3.4.** Ảnh hưởng của Andiabet đến công thức bạch cầu trong máu nhỏ

| Thời điểm | Công thức bạch cầu (tỷ lệ %) | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|
| | Lô chứng (n =10) | | Lô thử 1 (n =10) | | Lô thử 2 (n =10) | |
| | Lympho | Trung tính | Lympho | Trung tính | Lympho | Trung tính |
| t₀ | 47,04 ± | 52,96 ± | 48,52 ± | 51,48 ± | 45,21 ± | 54,79 ± |
| | 8,31 | 8,31 | 6,42 | 6,42 | 10,90 | 10,90 |
| t₁ | 45,70 ± | 54,30 ± | 47,37 ± | 52,63 ± | 48,81 ± | 51,19 ± |
| | 10,54 | 10,54 | 7,49 | 7,49 | 9,32 | 9,32 |
| p (trước-sau) > 0,05 | | | | | | |
| t₂ | 41,58 ± | 58,42 ± | 43,61 ± | 56,39 ± | 42,26 ± | 57,74 ± |
| | 12,95 | 12,95 | 12,40 | 12,40 | 11,09 | 11,09 |
| p (trước-sau) > 0,05 | | | | | | |
| t₃ | 47,42 ± | 52,58 ± | 47,88 ± | 52,12 ± | 48,94 ± | 51,06 ± |
| | 4,99 | 4,99 | 7,63 | 7,63 | 7,51 | 7,51 |
| p (trước-sau) > 0,05 | | | | | | |

Nhận xét:

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy: Sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống Andibet, tỷ lệ bạch cầu đa nhân trung tính và bạch cầu lympho ở cả 2 lô thử đều thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với trước khi dùng thuốc và so với lô chứng cùng thời điểm ($p > 0,05$).

3.1.2.3. Đánh giá chức năng gan thỏ

Ảnh hưởng của Andibet đến chức năng gan thỏ được đánh giá thông qua việc định lượng các chỉ số sinh hóa: hoạt độ của 2 enzym transaminase (AST và ALT), hàm lượng bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần trong huyết thanh và các thay đổi về mô bệnh học gan thỏ sau 90 ngày uống thuốc thử. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.5, hình 3.1.

❖ *Các chỉ số sinh hoá đánh giá chức năng gan thỏ:*

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của Andibet đến chức năng gan thỏ

| Chỉ tiêu | | Lô chứng (n =10) | Lô thử 1 (n =10) | Lô thử 2 (n =10) | P_{C-T1} | P_{C-T2} |
|---|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------|------------|
| Hoạt độ AST (UI/l) | t ₀ | 31,20 ± 8,22 | 30,40 ± 6,74 | 31,90 ± 8,08 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 31,30 ± 7,92 | 38,80 ± 9,11 | 39,20 ± 10,24 | | |
| | t ₂ | 32,00 ± 11,64 | 35,10 ± 10,07 | 36,30 ± 8,50 | | |
| | t ₃ | 31,30 ± 6,46 | 36,26 ± 5,07 | 37,66 ± 9,07 | | |
| Hoạt độ ALT (UI/l) | t ₀ | 40,40 ± 6,69 | 43,70 ± 8,23 | 42,30 ± 6,06 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 40,10 ± 6,82 | 48,10 ± 13,01 | 48,00 ± 11,25 | | |
| | t ₂ | 41,10 ± 10,32 | 45,90 ± 6,26 | 48,90 ± 12,21 | | |
| | t ₃ | 40,10 ± 10,85 | 48,40 ± 13,25 | 48,10 ± 5,28 | | |
| Bilirubin toàn phần (mmol/l) | t ₀ | 13,47 ± 0,57 | 13,60 ± 0,56 | 13,39 ± 0,61 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 13,47 ± 0,43 | 13,61 ± 0,47 | 13,59 ± 0,34 | | |
| | t ₂ | 13,43 ± 0,45 | 13,60 ± 0,43 | 13,66 ± 0,58 | | |
| | t ₃ | 13,35 ± 0,60 | 13,70 ± 0,36 | 13,47 ± 0,41 | | |

| Chỉ tiêu | | Lô chứng (n =10) | Lô thử 1 (n =10) | Lô thử 2 (n =10) | p _{C-T1} | p _{C-T2} |
|--------------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Albumin (g/dl) | t ₀ | 4,27 ± 1,00 | 4,14 ± 0,47 | 4,33 ± 0,41 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 4,64 ± 0,39 | 4,41 ± 0,45 | 4,28 ± 0,59 | | |
| | t ₂ | 3,93 ± 0,17 | 4,35 ± 0,31 | 4,25 ± 0,76 | | |
| | t ₃ | 3,93 ± 0,19 | 3,52 ± 0,97 | 3,91 ± 0,70 | | |
| Cholesterol toàn phần (mmol/l) | t ₀ | 2,55 ± 0,56 | 2,58 ± 0,60 | 2,34 ± 0,38 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 2,65 ± 0,58 | 2,12 ± 0,58 | 2,22 ± 0,49 | | |
| | t ₂ | 3,04 ± 1,10 | 2,36 ± 0,79 | 2,78 ± 0,88 | | |
| | t ₃ | 2,69 ± 0,70 | 2,98 ± 0,45 | 2,91 ± 0,86 | | |

Ghi chú: p_{C-T1} và p_{C-T2}: giá trị p của lô thử 1 và lô thử 2 so với lô chứng cùng thời điểm.

Nhận xét:

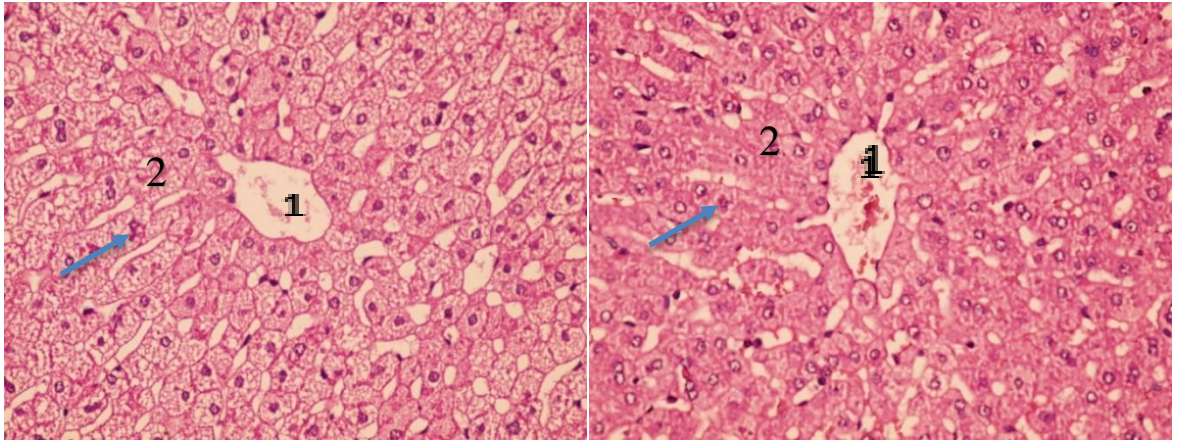
Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy: Trước thí nghiệm các chỉ số sinh hóa của thỏ ở lô chứng và các lô thử không có sự khác biệt nhau (p_{C-T1} và p_{C-T2}, thời điểm t₀ > 0,05). Sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống Andiabect, tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan (AST, ALT, bilirubin toàn phần, albumin, cholesterol toàn phần) ở cả 2 lô thử 1 và lô thử 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng và so sánh giữa hai thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử (p > 0,05).

❖ *Quan sát đại thể gan thỏ:*

Không thấy có sự bất thường về hình dạng bên ngoài, về màu sắc, sự thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của gan thỏ, cũng như của các cơ quan tim, phổi, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của thỏ sau 90 ngày uống chế phẩm thử.

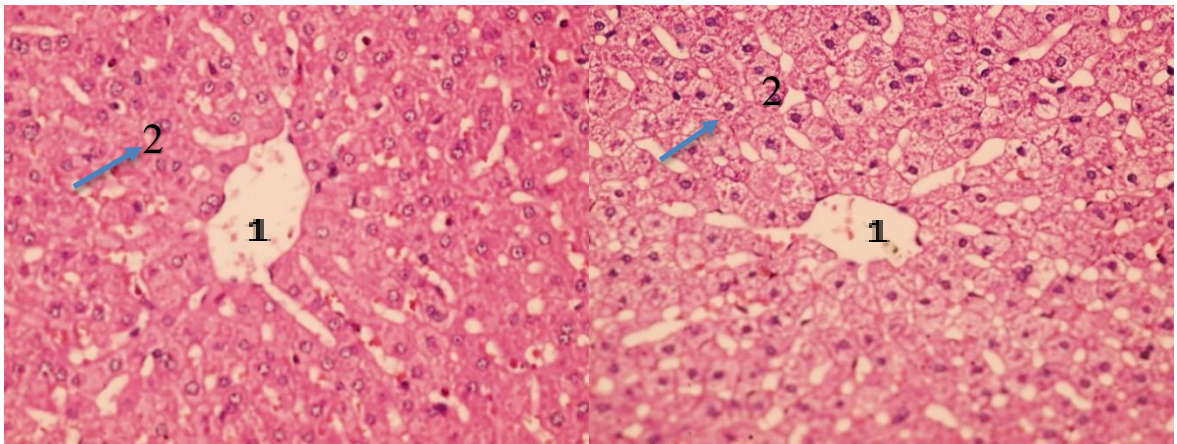
❖ *Hình thái vi thể gan thỏ:*

Kết quả kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan thỏ được thực hiện ở 3 thỏ/lô được trình bày trong hình 3.1 sau:



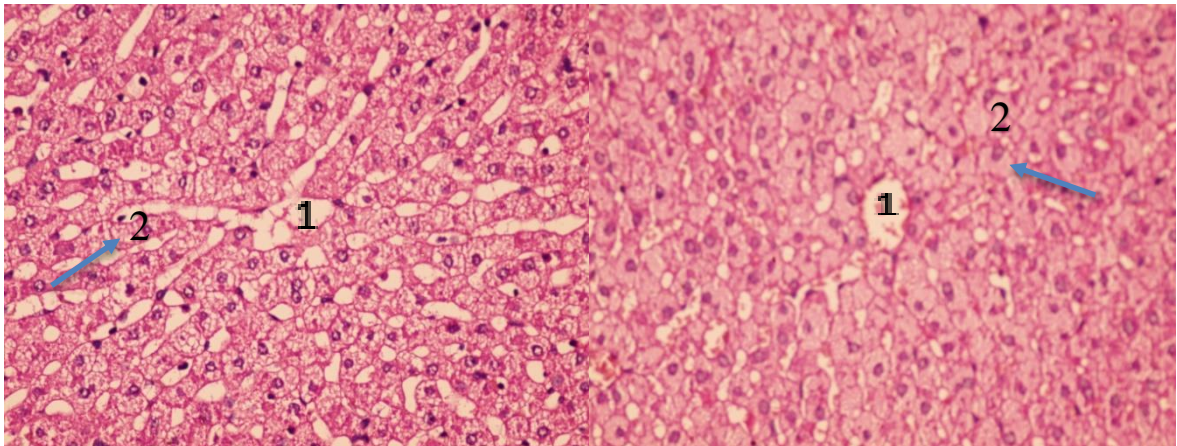
Hình thái vi thể gan thỏ lô chúng (thỏ số 1)
Tế bào gan thoái hóa nhẹ (HE x 400)

Hình thái vi thể gan thỏ lô chúng (thỏ số 3)
Tế bào gan bình thường (HE x 400)



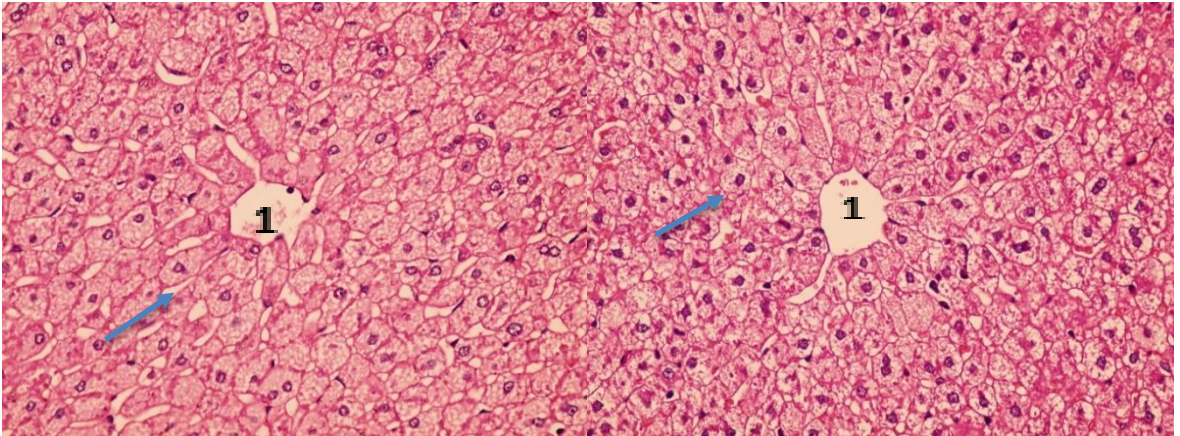
Hình thái vi thể gan thỏ lô chúng (thỏ số 5)
Tế bào gan bình thường (HE x 400)

Hình thái vi thể gan thỏ lô thứ 1 (thỏ số 13)
Tế bào gan bình thường (HE x 400)



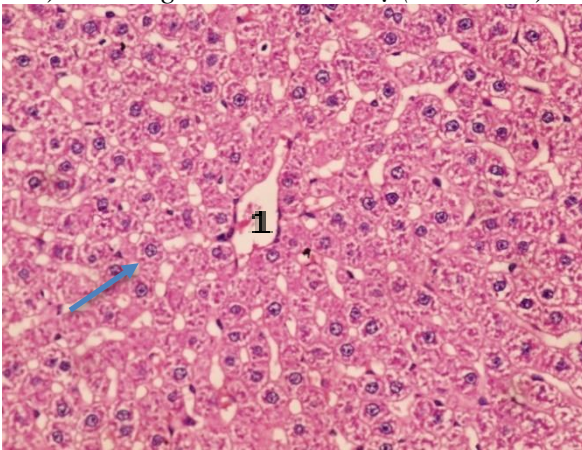
Hình thái vi thể gan thỏ lô thứ 1 (thỏ số 19)
Tế bào gan thoái hóa nhẹ (HE x 400)

Hình thái vi thể gan thỏ lô thứ 1 (thỏ số 16)
Tế bào gan bình thường (HE x 400)



Hình thái vi thể gan thỏ lô thứ 2 (thỏ số 24) Tế bào gan thoái hóa nhẹ (HE x 400)

Hình thái vi thể gan thỏ lô thứ 2 (thỏ số 25) Tế bào gan thoái hóa nhẹ (HE x 400)



Hình thái vi thể gan thỏ lô thứ 2 (thỏ số 27) Tế bào gan bình thường (HE x 400)

Ghi chú:

1. Tĩnh mạch trung tâm tiêu thụ
2. Tế bào gan;

Tế bào gan được nhuộm HE x 400
(Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần)

Hình 3.1. Hình thái vi thể gan thỏ sau 90 ngày uống chế phẩm thử Andiabet

Nhận xét:

Kết quả sau 90 ngày uống Andiabet liên tục cho thấy: Trên các tiêu bản vi thể gan: cấu trúc gan không bị đảo lộn. Tĩnh mạch trung tâm tiêu thụ gan và vùng khoảng cửa không bị xơ hóa, không xâm nhập tế bào viêm, không tăng sinh ống mật. Tế bào gan bình thường: có kích thước đều, không có ổ hoại tử viêm, bào tương bắt màu hồng mịn, nhân tế bào hình tròn, rõ. Một số tế bào gan thoái hóa nhẹ: bào tương của các tế bào thoái hóa có các hốc sáng nhỏ, một số tế bào mất nhân. Tuy nhiên không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể gan giữa lô dùng chế phẩm thử với lô chứng.

3.1.2.4. Đánh giá chức năng thận thỏ

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của Andibet đến chức năng thận thỏ

| Chỉ tiêu | | Lô chứng (n =10) | Lô thử 1 (n =10) | Lô thử 2 (n =10) | p _{C-T1} | p _{C-T2} |
|------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Creatinin (mg/dl) | t ₀ | 1,06 ± 0,10 | 1,06 ± 0,08 | 1,03 ± 0,09 | > 0,05 | > 0,05 |
| | t ₁ | 1,06 ± 0,08 | 1,05 ± 0,08 | 1,04 ± 0,08 | | |
| | t ₂ | 1,05 ± 0,08 | 1,06 ± 0,08 | 1,05 ± 0,08 | | |
| | t ₃ | 1,04 ± 0,08 | 1,08 ± 0,09 | 1,04 ± 0,07 | | |

Nhận xét:

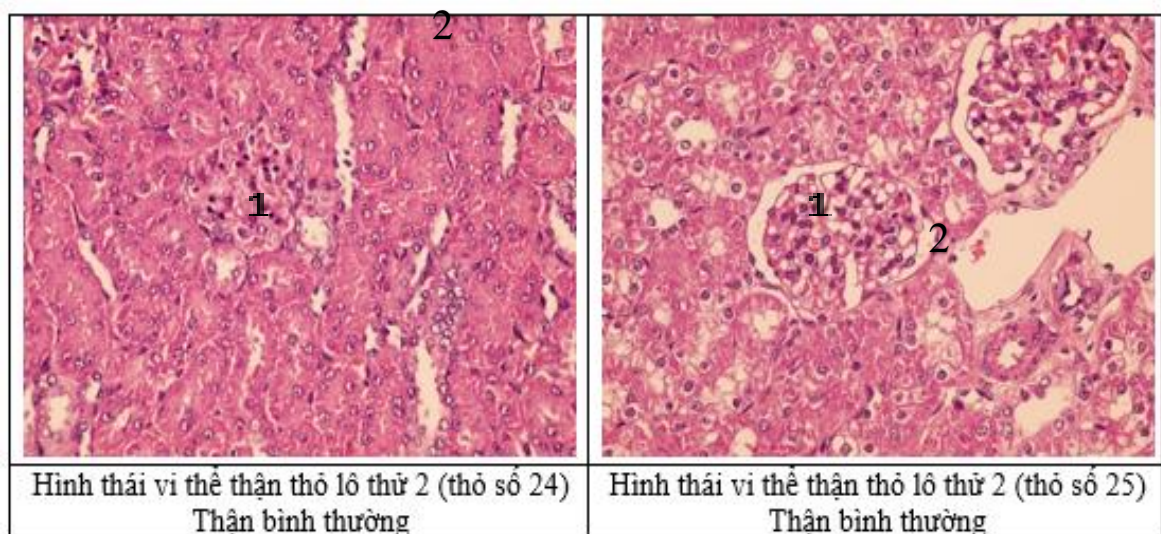
Bảng 3.6 cho thấy: xét nghiệm đánh giá chức năng thận (creatinin máu) ở cả 2 lô thử 1 và lô thử 2 đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng, được so sánh ở tất cả các thời điểm trước và sau khi uống thuốc thử ($p > 0,05$).

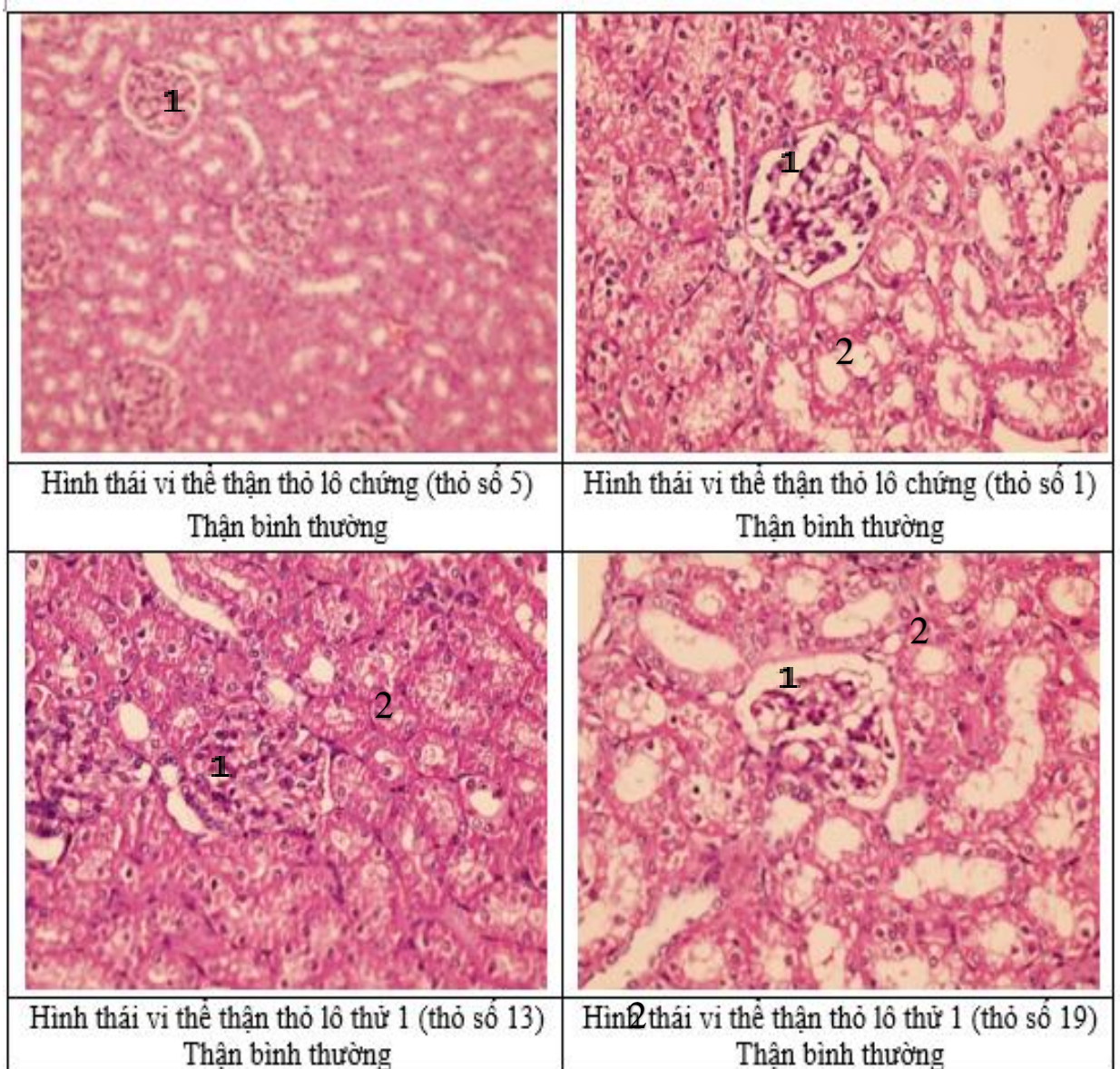
❖ **Quan sát đại thể thận thỏ:**

Không thấy có sự bất thường về hình dạng bên ngoài, về màu sắc, sự thay đổi bệnh lý về mặt đại thể của thận thỏ sau 90 ngày uống chế phẩm thử.

❖ **Hình thái vi thể thận thỏ:**

Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể thận của 3 thỏ/lô. Kết quả được trình bày trong hình 3.2 là đại diện cho từng lô thỏ:





Hình 3.2. Hình thái vi thể thận thỏ sau 90 ngày uống chế phẩm thử Andiabet

Ghi chú: 1. Cầu thận bình thường; 2. Ống thận bình thường; Tất cả các tiêu bản được nhuộm HE x 400 (Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần)

Nhận xét:

Trên tiêu bản vi thể thận: cầu thận có hình thái bình thường, không tăng sinh tế bào. Các tế bào ống thận không hoại tử. Mô đệm không xâm nhập viêm, không xơ hóa. Không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể thận giữa lô thử và lô chĩnh.

3.2. TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU VÀ MỘT SỐ CƠ CHẾ TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU CỦA VIÊN ANDIABET TRÊN THỰC NGHIỆM

3.2.1. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabeta trên chuột nhắt trắng bình thường.

Chuột nhắt trắng bình thường được chia ngẫu nhiên vào 4 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được uống nước cất hoặc thuốc thử liên tục trong 2 tuần. Định lượng nồng độ glucose máu tại 3 thời điểm: chưa uống thuốc (t_0); sau uống thuốc thử 1 tuần (t_1) và sau uống thuốc thử 2 tuần (t_2). Kết quả được trình bày bảng 3.7.

Bảng 3.7. Nồng độ glucose máu của chuột nhắt trắng bình thường sau 2 tuần uống chế phẩm thử Andiabeta.

| Lô chuột (n = 10) | Nồng độ glucose máu mmol/l ($\bar{X} \pm SD$) | | |
|---------------------------------|---|--------------|---------------|
| | T_0 | T_1 | T_2 |
| Lô 1: Chứng sinh học | 3,53 ± 0,72 | 4,99 ± 1,14 | 4,97 ± 0,92 |
| Lô 2: Gliclazid 80mg/kg | 3,55 ± 0,51 | 4,12 ± 0,58* | 3,95 ± 0,72** |
| % giảm so lô chứng | | ↓ 17,44 % | ↓ 20,52 % |
| Lô 3: Andiabeta 0,68g/kg | 3,34 ± 0,21 | 5,03 ± 0,25 | 4,26 ± 0,44* |
| % giảm so lô chứng | | - | ↓ 14,3 % |
| Lô 4: Andiabeta 2 g/kg | 3,40 ± 0,60 | 4,92 ± 0,79 | 4,12 ± 0,61* |
| % giảm so lô chứng | | ↓ 1,4 % | ↓ 17,1 % |

*p so với lô chứng: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.*

Nhận xét:

Kết quả bảng 3.7 cho thấy: nồng độ glucose máu ở tất cả các lô tại thời điểm T_0 (chuột đã được nhịn đói 16 giờ, chưa uống thuốc) đều tương đương nhau ($p > 0,05$). Sau 1 tuần uống thuốc thử (thời điểm T_1) chỉ có lô uống gliclazid liều 80 mg/kg làm hạ glucose máu 17,44 %, giảm rõ rệt so với lô chứng ($p < 0,05$). Sau 2 tuần liên tục uống thuốc thử (thời điểm T_2): mức

glucose máu ở lô gliclazid 80 mg/kg giảm 20,52% ($p < 0,01$), lô uống Andiabet liều 0,68g/kg giảm 14,3%, còn lô Andiabet liều 2g/kg giảm 17,1% so với lô chứng sinh học, có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3.2.2. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2.

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên vào 2 nhóm: nhóm chứng sinh học được nuôi bằng chế độ ăn bình thường (NFD - normal fat diet) và nhóm ăn béo được nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo (HFD - high fat diet) trong 8 tuần liên tục.

3.2.2.1. Thay đổi cân nặng chuột sau chế độ ăn giàu chất béo

Kết quả thu được về sự thay đổi cân nặng của chuột sau 4, 6 và 8 tuần ăn chế độ ăn giàu chất béo được trình bày trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Sự thay đổi cân nặng chuột tại các thời điểm nghiên cứu

| Thời gian | Trọng lượng (g) ($\bar{X} \pm SD$) | | p so lô 1 |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------|
| | Nhóm NFD (n = 10) | Nhóm HFD (n = 100) | |
| Bắt đầu nghiên cứu | 25,45 ± 0,98 | 26,09 ± 1,30 | > 0,05 |
| Sau 4 tuần | 29,60 ± 1,15*** | 37,17 ± 1,89*** | < 0,001 |
| % tăng | ↑ 16,3 | ↑ 42,5 | |
| Sau 6 tuần | 33,60 ± 1,43*** | 42,89 ± 1,93*** | < 0,001 |
| % tăng | ↑ 32,0 | ↑ 64,4 | |
| Sau 8 tuần | 35,90 ± 1,45*** | 48,47 ± 2,27*** | < 0,001 |
| % tăng | ↑ 41,1 | ↑ 85,8 | |

***: $p < 0,001$: So sánh với thời điểm trước nghiên cứu

Nhận xét:

Sau 4 tuần, 6 tuần và 8 tuần, trọng lượng chuột ở 2 nhóm đều tăng so với trước nghiên cứu. Nhóm ăn béo (chế độ ăn 40% năng lượng lipid + 55%

fructose) có mức tăng cân cao hơn hẳn so nhóm ăn chế độ bình thường tại cùng thời điểm. Cân nặng của chuột ở lô ăn chế độ ăn giàu chất béo sau 4 tuần tăng 42,5%, sau 6 tuần tăng 64,4% và sau 8 tuần tăng 85,8%, mức tăng cao rõ rệt so với lô chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$).

3.2.2.2. Thay đổi nồng độ glucose máu chuột sau gây đái tháo đường

Sau 8 tuần nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo, tất cả chuột được gây ĐTĐ typ 2 bằng cách tiêm STZ liều 100 mg/kg. Sự biến đổi nồng độ glucose máu tại các thời điểm trước và sau khi tiêm STZ 72 giờ được trình bày trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Sự biến đổi nồng độ glucose máu chuột sau 8 tuần ăn chế độ ăn giàu chất béo.

| <i>Thời gian</i> | Glucose máu (mmol/l) ($\bar{X} \pm SD$) | | p so lô 1 |
|------------------------------|---|----------------------------|------------------|
| | Nhóm NFD (n=10) | Nhóm HFD (n=100) | |
| Bắt đầu nghiên cứu | 5,37 ± 0,56 | 5,56 ± 1,02 | > 0,05 |
| Sau 8 tuần | 5,77 ± 0,67 | 6,32 ± 0,93 | > 0,05 |
| % thay đổi | ↑ 7,4 | ↑ 13,7 | |
| Sau tiêm STZ 72 ^h | 5,98 ± 0,92 | 17,09 ± 6,33*** | < 0,001 |
| % thay đổi | ↑ 11,4 | ↑ 207,4 | |

***: $p < 0,001$: p so với trước nghiên cứu; ($\Delta\Delta\Delta$): $p < 0,001$: p so với thời điểm sau 8 tuần

Nhận xét:

Nồng độ glucose máu ở tất cả các thời điểm nghiên cứu của chuột ở nhóm NFD thay đổi không có sự khác biệt. Sau khi ăn chế độ ăn giàu chất béo 8 tuần, nồng độ glucose máu của chuột ở nhóm HFD có xu hướng tăng (13,7%) cao hơn so với nồng độ glucose máu của chuột nhóm chứng (7,4%), nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 72 giờ tiêm STZ, nồng độ glucose máu ở nhóm HFD đã tăng cao rõ rệt (207,4%) so với nhóm chứng (tăng 11,4%) ($p < 0,001$) và so với thời điểm trước khi tiêm STZ ($p < 0,001$).

3.2.2.3. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2.

Gây ĐTĐ typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo và tiêm STZ liều 100 mg/kg. Sau đó, chuột ĐTĐ typ 2 được cho uống thuốc thử liên tục trong 2 tuần. Để thấy rõ hơn tác dụng hạ glucose máu của Andiabet trên chuột gây mô hình ĐTĐ typ 2, từ thí nghiệm này, chúng tôi lựa chọn thêm mức liều trung gian Andiabet 1g/kg. Tác dụng HGM của Andiabet trên chuột gây ĐTĐ typ 2 tại 3 thời điểm t_0 (chưa uống thuốc), t_1 (sau 1 tuần uống thuốc), t_2 (sau 2 tuần uống thuốc), được thể hiện trong bảng 3.10.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của viên nang lên nồng độ glucose máu của chuột nhắt trắng ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống thuốc

| <i>Lô chuột (n=10)</i> | Nồng độ glucose máu mmol/l ($\bar{X} \pm SD$) | | |
|--------------------------------|---|----------------------|----------------------|
| | T₀ | T₁ | T₂ |
| Lô 1: Chứng sinh học | 5,54 ± 0,86 | 5,51 ± 0,81 | 5,46 ± 0,46 |
| Lô 2: Chứng bệnh | 17,88 ± 6,23 | 18,38 ± 4,46 | 18,38 ± 4,39 |
| Lô 3: Gliclazid 80mg/kg | 17,36 ± 5,26 | 14,18 ± 5,23* | 13,83 ± 3,45** |
| % giảm so lô chứng bệnh | | ↓ 22,9 % | ↓ 24,8 % |
| Lô 4: Andiabet 0,68g/kg | 17,89 ± 6,3 | 13,99 ± 3,61* | 16,71 ± 4,46 |
| % giảm so lô chứng bệnh | | ↓ 23,9 % | ↓ 9,1% |
| Lô 5: Andiabet 1g/kg | 19,23 ± 6,3 | 17,53 ± 3,61 | 11,83 ± 3,91** |
| % giảm so lô chứng bệnh | | ↓ 4,6 % | ↓ 35,6 % |
| Lô 6: Andiabet 2g/kg | 18,04 ± 5,27 | 11,69 ± 3,78** | 14,84 ± 5,01* |
| % giảm so lô chứng bệnh | | ↓ 36,4 % | ↓ 19,3 % |

p so với lô chứng bệnh: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Nhận xét:

Sau 1 tuần uống thuốc thử, Andiabet liều 0,68 g/kg và liều 2g/kg/ngày đã làm hạ glucose máu so với lô chứng bệnh gây ĐTĐ, mức hạ lần lượt là

23,9% và 36,4%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và $p < 0,01$. Sau 2 tuần uống thuốc thử Andiabet liều 1g/kg/ngày đã làm hạ glucose máu rõ so với lô chứng bệnh, mức hạ tới 35,6% ($p < 0,01$), tác dụng này tương đương với gliclazid 80mg/kg/ngày.

3.2.2.4. Tác dụng hạ lipid máu của viên Andiabet trên chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2.

Để có thêm bằng chứng gián tiếp về tác dụng giảm kháng insulin, bước đầu tìm hiểu cơ chế hạ glucose máu của Andiabet, không chỉ nồng độ glucose máu được định lượng, mà các chỉ số lipid máu tại thời điểm t_2 (sau 2 tuần uống thuốc thử) cũng được định lượng để đánh giá tác dụng hạ lipid máu của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng ĐTĐ typ 2. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.11.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của viên Andiabet lên nồng độ lipid máu của chuột nhắt trắng ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống thuốc

| Lô chuột (n=10) | Nồng độ lipid máu mmol/l ($\bar{X} \pm SD$) | | | |
|-------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | TC | TG | HDL-C | LDL-C |
| Lô 1: Chứng sinh học. | 2,75 \pm 0,55 | 0,50 \pm 0,17 | 1,40 \pm 0,11 | 1,12 \pm 0,40 |
| Lô 2: Chứng bệnh | 3,85 \pm 0,56 ^{ΔΔΔ} | 0,89 \pm 0,28 ^{ΔΔΔ} | 1,79 \pm 0,22 ^{ΔΔΔ} | 1,64 \pm 0,47 ^{ΔΔΔ} |
| Lô 3: Gliclazid 80mg/kg | 3,86 \pm 0,52 | 0,81 \pm 0,18 | 1,89 \pm 0,31 | 1,60 \pm 0,63 |
| Lô 4: Andiabet 0,68g/kg | 3,70 \pm 0,61 | 0,81 \pm 0,22 | 2,29 \pm 0,21 ^{***} | 1,05 \pm 0,66 ^{***} |
| Lô 5: Andiabet 1g/kg | 3,63 \pm 0,38 | 0,9 \pm 0,13 | 2,07 \pm 0,16 ^{**} | 1,15 \pm 0,32 ^{**} |
| Lô 6: Andiabet 2g/kg | 3,23 \pm 0,50 ^{**} | 0,62 \pm 0,16 ^{**} | 2,15 \pm 0,21 ^{***} | 0,81 \pm 0,43 ^{***} |

p so với lô chứng sinh học: ^{ΔΔΔ}: $p < 0,001$; *p* so với lô chứng bệnh: ^{*}: $p < 0,05$; ^{**}: $p < 0,01$; ^{***}: $p < 0,001$. Cholesterol toàn phần (TC), triglyceride (TG)

Nhận xét:

Andiabet ở tất cả các mức liều, sau khi uống liên tục 2 tuần đã làm hạ nồng độ LDL-C và làm tăng nồng độ HDL-C so với lô chứng bệnh, sự khác

biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Ngoài ra Andiabet liều 2g/kg/ngày uống liên tục trong 2 tuần làm giảm rõ nồng độ TC, TG so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$).

Chuột ĐTĐ typ 2, sau khi uống thuốc thử Andiabet trong 2 tuần được mổ lấy gan, tụy để đánh giá cân nặng, quan sát hình ảnh đại thể và vi thể ngẫu nhiên 30% số chuột mỗi lô. Kết quả trên cân nặng gan, tụy chuột và kết quả giải phẫu bệnh của chuột gây ĐTĐ typ 2 được trình bày trong các bảng 3.12; 3.13; bảng 3.14; 3.15 và các hình 3.3; 3.4; hình 3.5; 3.6.

3.2.2.5. Ảnh hưởng của viên Andiabet trên cân nặng gan chuột gây đái tháo đường typ 2.

Bảng 3.12. Cân nặng gan của chuột ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống thuốc

| Lô chuột (n =10) | Trọng lượng gan (g) ($\bar{X} \pm SD$) | Tỷ lệ % gan so cân nặng ($\bar{X} \pm SD$) | p so lô 1 |
|--------------------------------|--|--|--------------------|
| Lô 1: Chứng sinh học | 1,87 ± 0,39 | 4,26 ± 0,78 | |
| Lô 2: Chứng bệnh | 2,31 ± 0,40 | 5,23 ± 0,86 | p < 0,01 |
| Lô 3: Gliclazid 80mg/kg | 2,37 ± 0,39 | 5,21 ± 1,50 | p < 0,01 |
| <i>p so lô chứng bệnh</i> | <i>p > 0,05</i> | <i>p > 0,05</i> | |
| Lô 4: Andiabet 0,68g/kg | 2,23 ± 0,12 | 5,32 ± 0,67 | P < 0,01 |
| <i>p so lô chứng bệnh</i> | <i>p > 0,05</i> | <i>p > 0,05</i> | |
| Lô 5: Andiabet 1g/kg | 2,25 ± 0,36 | 4,61 ± 0,74 | p > 0,05 |
| <i>p so lô chứng bệnh</i> | <i>p > 0,05</i> | <i>p > 0,05</i> | |
| Lô 6: Andiabet 2g/kg | 2,17 ± 0,44 | 5,05 ± 1,00 | p > 0,05 |
| <i>p so lô chứng bệnh</i> | <i>p > 0,05</i> | <i>p > 0,05</i> | |

Nhận xét:

Cân nặng gan ở các lô chứng bệnh, lô gliclazid và lô Andiabet 0,68 g/kg/ngày cao hơn rõ rệt so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ($p < 0,01$). Cân nặng gan ở tất cả các lô uống Andiabet đều có xu hướng

giảm so với lô chứng bệnh nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2.6. Ảnh hưởng của viên Andiabet trên cân nặng tụy chuột gây đái tháo đường typ 2.

Bảng 3.13. Cân nặng tụy của chuột ĐTD typ 2 sau 2 tuần uống thuốc

| Lô chuột (n =10) | Cân nặng tụy (g) ($\bar{X} \pm SD$) | Tỷ lệ % tụy so cân nặng ($\bar{X} \pm SD$) | P so lô 1 |
|-------------------------|--|---|-----------|
| Lô 1: Chứng sinh học | 0,20 \pm 0,06 | 0,46 \pm 0,12 | |
| Lô 2: Chứng bệnh | 0,19 \pm 0,02 | 0,43 \pm 0,06 | p > 0,05 |
| Lô 3: Gliclazid 80mg/kg | 0,20 \pm 0,05 | 0,44 \pm 0,10 | p > 0,05 |
| p so lô chứng bệnh | p > 0,05 | p > 0,05 | |
| Lô 4: Andiabet 0,68g/kg | 0,20 \pm 0,04 | 0,46 \pm 0,07 | p > 0,05 |
| p so lô chứng bệnh | p > 0,05 | p > 0,05 | |
| Lô 5: Andiabet 1 g/kg | 0,20 \pm 0,04 | 0,42 \pm 0,11 | p > 0,05 |
| p so lô chứng bệnh | p > 0,05 | p > 0,05 | |
| Lô 6: Andiabet 2 g/kg | 0,19 \pm 0,04 | 0,45 \pm 0,09 | p > 0,05 |
| p so lô chứng bệnh | p > 0,05 | p > 0,05 | |

Nhận xét:

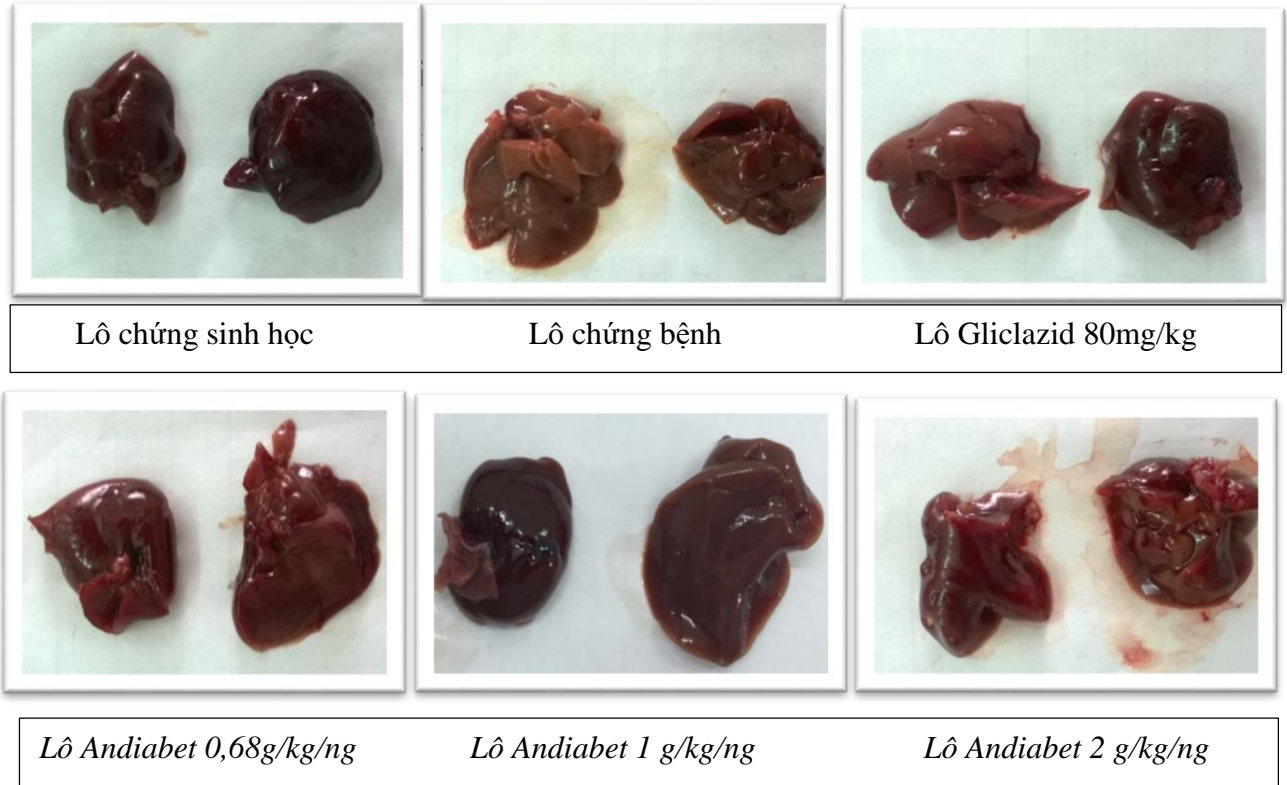
Cân nặng tụy ở các lô chứng bệnh, lô uống gliclazid và lô uống Andiabet ở tất cả các liều đều tương tự như lô chứng sinh học, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2.2.7. Thay đổi về mô bệnh học.

Song song với việc so sánh cân nặng gan và tụy của các lô chuột thực nghiệm, tiến hành đánh giá đại thể và mô bệnh học của gan và tụy của chuột ở các lô khác nhau.

❖ Quan sát đại thể gan

Hình ảnh đại thể gan chuột nhắt trắng ở các lô nghiên cứu được trình bày trong hình 3.3.



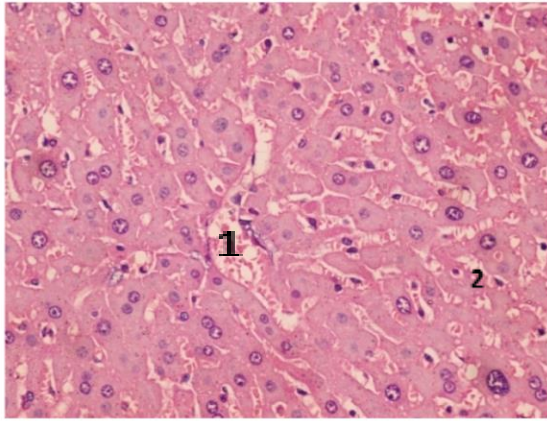
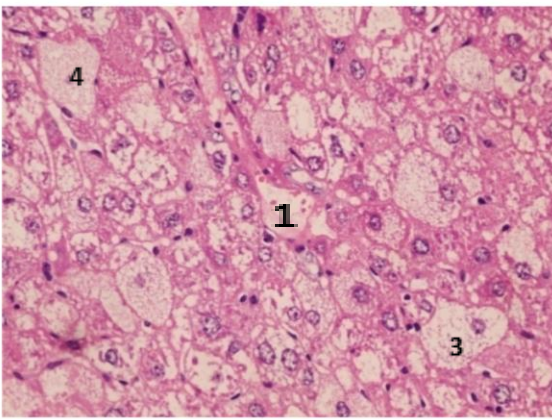
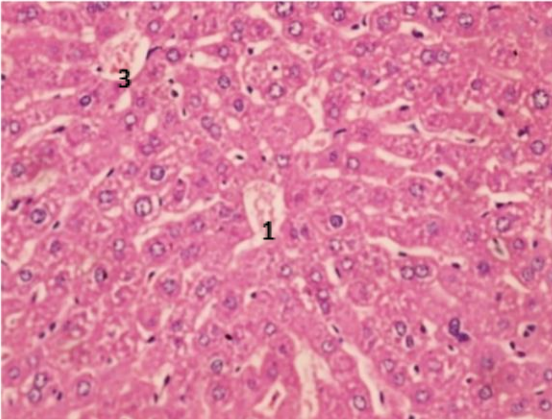
Hình 3.3. Hình ảnh đại thể thể gan chuột sau 2 tuần uống thuốc thử

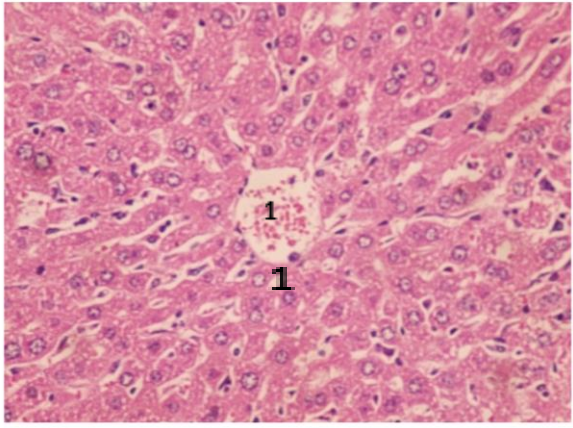
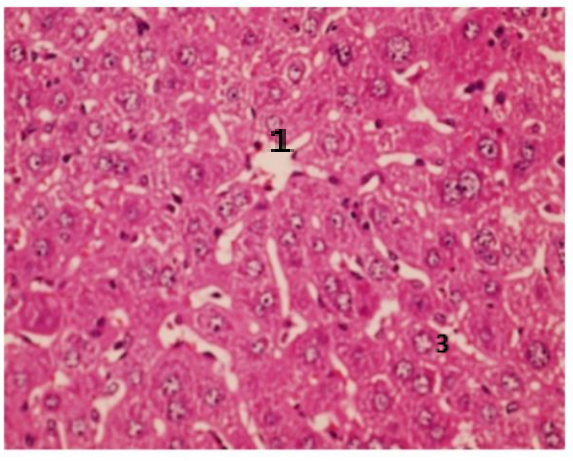
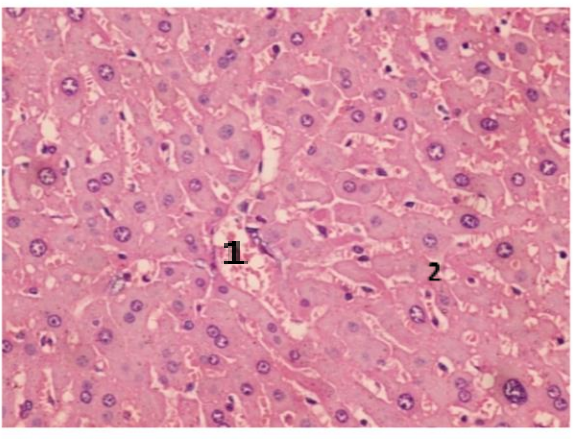
Nhận xét:

Lô chứng sinh học (NFD + nước cất) có màu hồng sẫm, đồng đều về màu sắc. Mật độ mô chắc và đồng đều. Gan chuột ở các lô tiêm STZ đều có màu sắc bạc, kém đều hơn so với lô chứng sinh học. Mật độ mô có phần lỏng lẻo so với lô chứng sinh học.

❖ *Quan sát vi thể gan*

Bảng 3.14. Vi thể gan chuột sau 2 tuần uống thuốc thử

| Lô nghiên cứu | Hình thái vi thể gan chuột sau 2 tuần uống thuốc | Nhận xét |
|--------------------------------------|---|---|
| Lô 1: Chứng sinh học |  | 3/3 mẫu bệnh phẩm gan bình thường: tế bào gan kích thước đều, không có ổ hoại tử viêm. Tĩnh mạch trung tâm không xung huyết. Bào tương tế bào bắt màu hồng mịn, nhân tế bào tròn, rõ. <i>Đại diện: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 2) (HE x 400)</i> |
| Lô 2: Chứng bệnh |  | 3/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nặng: tế bào gan sưng phồng, có các hốc sáng to, bào tương sáng, một số tế bào mất nhân, có nhiều ổ tế bào thoái hóa mỡ. <i>Đại diện: Hình ảnh vi thể gan chuột lô chứng bệnh (chuột số 18) (HE x 400)</i> |
| Lô 3: Gliclazid 80mg/kg |  | 3/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ: bào tương các tế bào gan có ít các hốc sáng nhỏ <i>- Đại diện: Hình ảnh vi thể gan chuột lô uống gliclazid 80mg/kg (chuột số 28) (HE x 400)</i> |

| Lô nghiên cứu | Hình thái vi thể gan chuột sau 2 tuần uống thuốc | Nhận xét |
|---------------------------------------|---|--|
| Lô 4: Andiabet 0,68 g/kg |  | <p>- 3/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ: bào tương các tế bào gan có ít các hốc sáng nhỏ</p> <p><i>Đại diện: Hình ảnh vi thể gan chuột lô uống Andiabet liều 0,68 g/kg (chuột số 35) (HE x 400)</i></p> |
| Lô 5: Andiabet 1 g/kg |  | <p>1/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ: bào tương các tế bào gan có ít các hốc sáng nhỏ. 2/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ vừa: bào tương các tế bào gan có các hốc sáng không đều, tế bào gan tăng kích thước. <i>Đại diện: Hình ảnh vi thể gan chuột lô uống Andiabet liều 1 g/kg (chuột số 86) (HE x 400)</i></p> |
| Lô 6: Andiabet 2g/kg |  | <p>- 3/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ: bào tương các tế bào gan có ít các hốc sáng nhỏ.</p> <p><i>Đại diện: Hình ảnh vi thể gan chuột lô uống Andiabet liều 2 g/kg (chuột số 39) (HE x 400)</i></p> |

Ghi chú: 1. Tĩnh mạch trung tâm tiểu thùy; 2. Tế bào gan bình thường; 3. Tế bào gan thoái hóa nhẹ; 4. Tế bào gan thoái hóa vừa; (HE x 400: Nhuộm Hematoxylin - Eosin, độ phóng đại 400 lần)

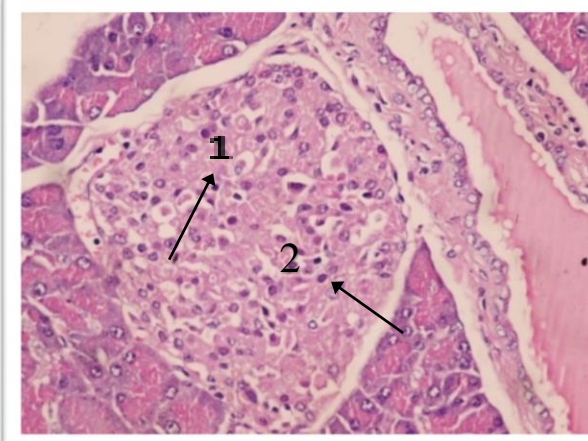
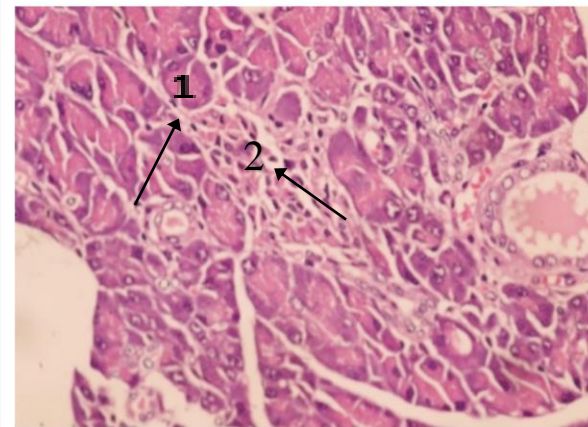
Nhận xét: Ở các lô uống Andiaet: 2/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ: bào tương các tế bào gan có ít các hốc sáng nhỏ. 1/3 mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ vừa: bào tương các tế bào gan có các hốc sáng không đều, tế bào gan tăng kích thước, được so sánh với lô chứng bệnh, 100% mẫu bệnh phẩm có tình trạng thoái hóa mỡ nặng: tế bào gan sưng phồng, có các hốc sáng to, bào tương sáng, một số tế bào mất nhân, có nhiều ổ tế bào thoái hóa mỡ.

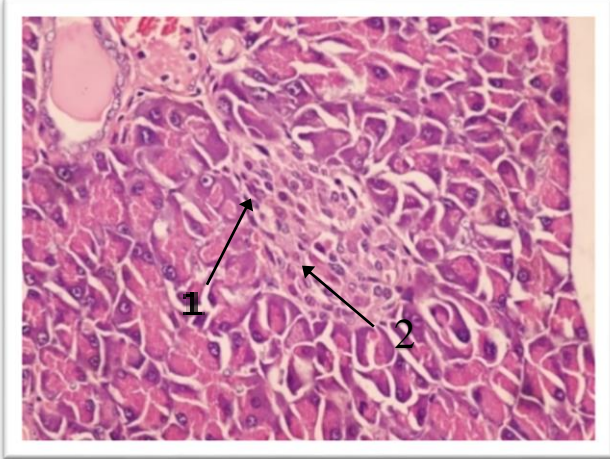
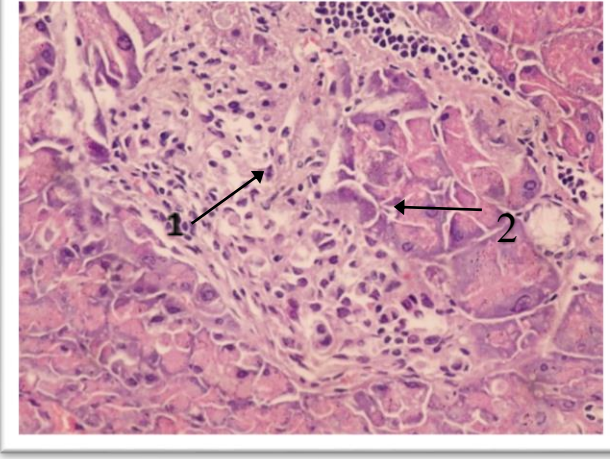
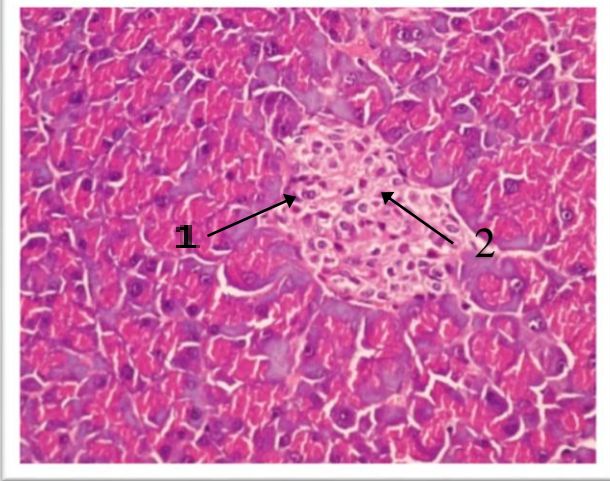
❖ *Quan sát đại thể tụy*

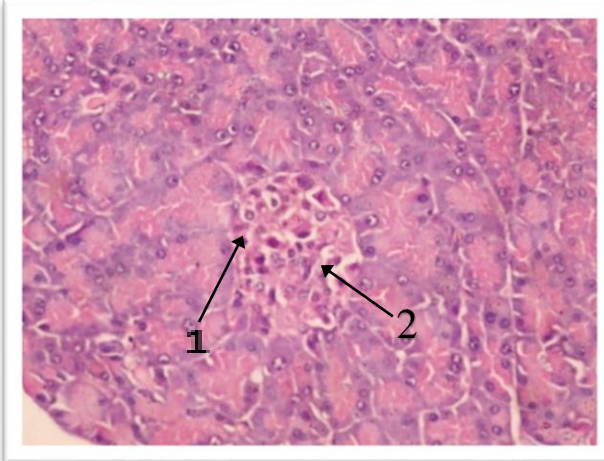
Nhận xét: Sau 2 tuần uống Andiaet, tụy ở tất cả các lô chuột đều có màu hồng nhạt, mật độ dai và chắc, không xung huyết, không thấy tổn thương đại thể.

❖ *Quan sát vi thể tụy*

Bảng 3.15. Vi thể tụy chuột sau 2 tuần uống thuốc thử

| Lô | Hình ảnh vi thể tụy sau 2 tuần uống | Nhận xét |
|--|---|---|
| <p>Lô 1: Chứng sinh học</p> |  | <p>- 3/3 mẫu bệnh phẩm tụy có cấu trúc bình thường: Mật độ tiểu đảo tụy bình thường. Các tế bào tiểu đảo có hình thái và kích thước bình thường, phân bố đều, không thấy tổn thương.</p> <p><i>Hình ảnh đại diện vi thể tụy chuột lô chứng sinh học (chuột số 1) (HE x 400)</i></p> |
| <p>Lô 2: Chứng bệnh</p> |  | <p>- 3/3 mẫu bệnh phẩm tụy bị thoái hóa: mật độ tiểu đảo tụy giảm. Đảo tụy biến dạng, giảm về kích thước, tế bào tiểu đảo tụy thoái hóa, teo lại.</p> <p><i>Hình ảnh đại diện vi thể tụy chuột lô chứng bệnh (chuột số 15) (HE x 400)</i></p> |

| Lô | Hình ảnh vi thể tụy sau 2 tuần uống | Nhận xét |
|--|---|--|
| <p>Lô 3: Gliclazid 80mg/kg</p> |  | <p>- 1/3 mẫu bệnh phẩm tụy có cấu trúc gần như bình thường</p> <p>- 2/3 mẫu bệnh phẩm tụy có hiện tượng thoái hóa nhẹ các tế bào đảo tụy, tiểu đảo tụy giảm nhẹ về kích thước, mật độ tiểu đảo ít hơn so với bình thường</p> <p><i>Hình ảnh đại diện vi thể tụy chuột lô gliclazid 80mg/kg, (chuột 27)(HE x 400)</i></p> |
| <p>Lô 4: Andiabet 0,68 g/kg</p> |  | <p>- 3/3 mẫu bệnh phẩm tụy có hiện tượng thoái hóa các tế bào đảo tụy, tiểu đảo tụy giảm nhẹ về kích thước, mật độ tiểu đảo ít hơn so với bình thường.</p> <p>Hình ảnh đại diện vi thể tụy chuột lô uống Andiabet 0,68 g/kg/ngày (chuột số 38) (HE x 400)</p> |
| <p>Lô 5: Andiabet 1 g/kg</p> |  | <p>- 2/3 mẫu bệnh phẩm tụy có hiện tượng thoái hóa. Một số tế bào đảo tụy, tiểu đảo tụy kích thước gần như bình thường.</p> <p>- 1/3 mẫu bệnh phẩm tụy có hiện tượng thoái hóa nhẹ các tế bào đảo tụy, tiểu đảo tụy giảm nhẹ về kích thước, mật độ tiểu đảo ít hơn so với bình thường</p> <p><i>Hình ảnh đại diện vi thể tụy chuột lô uống Andiabet 1 g/kg/ngày (chuột số 85) (HE x 400)</i></p> |

| Lô | Hình ảnh vi thể tụy sau 2 tuần uống | Nhận xét |
|-----------------------------------|---|---|
| Lô 6: Andiabet 2g/kg |  | <p>- 3/3 mẫu bệnh phẩm tụy có hiện tượng thoái hóa các tế bào đảo tụy, tiểu đảo tụy giảm nhẹ về kích thước, mật độ tiểu đảo ít hơn so với bình thường.</p> <p><i>Hình thái vi thể tụy chuột lô uống Andiabet liều 2g/kg/ngày (chuột số 47) (HE x 400)</i></p> |

Ghi chú: 1. Tế bào tụy; 2. Đảo tụy; (HE x 400: Nhuộm Hematoxylin – Eosin, độ phóng đại 400 lần)

Nhận xét:

Ở các lô uống Andiabet, 100% mẫu bệnh phẩm tụy có hiện tượng thoái hóa các tế bào đảo tụy, tiểu đảo tụy giảm nhẹ về kích thước, mật độ tiểu đảo ít hơn so với bình thường, được so sánh với lô chứng bệnh 100% mẫu bệnh phẩm tụy bị thoái hóa: mật độ tiểu đảo tụy giảm. Đảo tụy biến dạng, giảm về kích thước, tế bào đảo tụy thoái hóa, teo lại.

3.2.3. Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống glucose / sucrose / tinh bột của Andiabet.

3.2.3.1. Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu của Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường.

❖ Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống glucose của Andiabet.

Chuột nhắt trắng bình thường được uống thuốc thử trong 14 ngày liên tục. Ngày thứ 15 cho chuột uống glucose liều 2 g/kg. Định lượng glucose máu tại các thời điểm trước khi uống, 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi uống glucose. Kết quả được trình bày ở bảng 3.16 và hình 3.4.

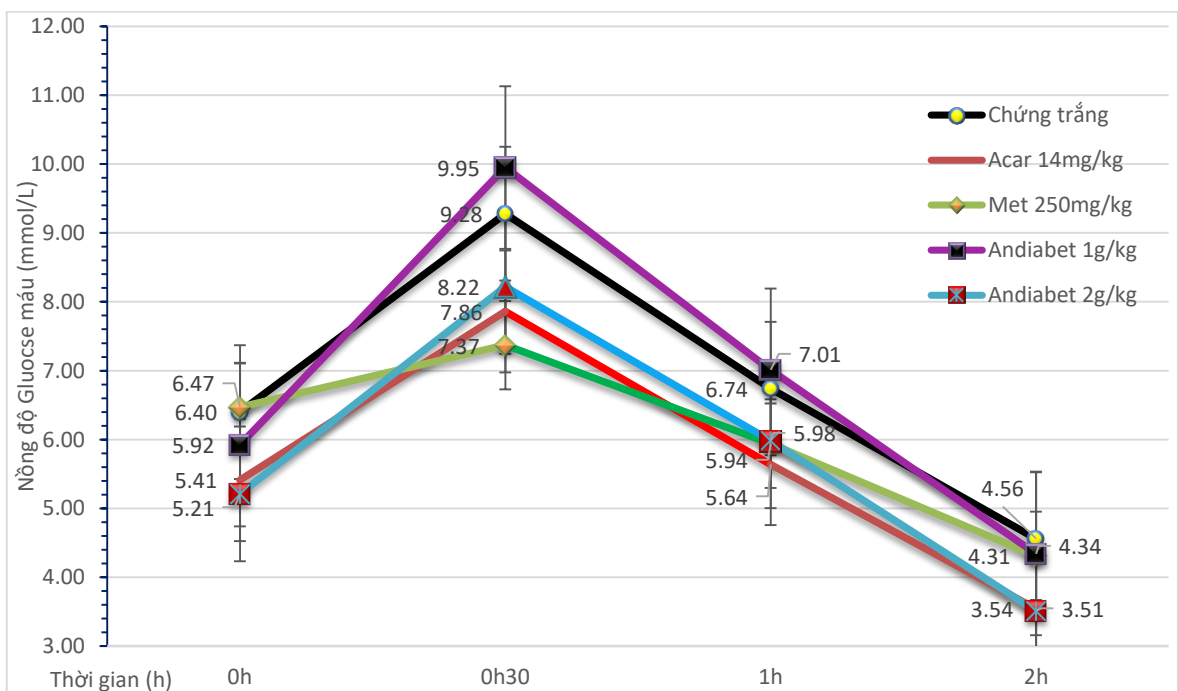
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống glucose (2g/kg) ở chuột bình thường

| Lô chuột (n =10) | PBG (mmol/L) | % giảm PBG | AUC (mmol/L) | % giảm AUC |
|--------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| Chuột Bình thường | | | | |
| Lô chứng trắng | 9,28 ± 2,15 | | 13,58 ± 3,05 | |
| Lô acarbose 14 mg/kg | 7,86 ± 0,99 | 15,3 | 11,33 ± 1,58 | 16,57 |
| Lô metformin 250 mg/kg | 7,37 ± 1,13* | 20,58 | 11,95 ± 1,23 | 12 |
| Lô Andiabet 1 g/kg | 9,95 ± 1,87 | - | 13,88 ± 2,55 | - |
| Lô Andiabet 2 g/kg | 8,22 ± 1,90 | 11,4 | 11,65 ± 1,99 | 14,2 |

p so với lô chứng: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nhận xét: Metformin liều 250 mg/kg làm hạ PBG 20,58% làm giảm AUC có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,05$). Acarbose liều 14 mg/kg và cả 2 lô uống Andiabet đều không làm thay đổi PBG và AUC có ý nghĩa so với lô chứng trắng ($p > 0,05$).

Đồ thị biểu diễn sự thay đổi nồng độ glucose máu của chuột nhất trắng bình thường trong test dung nạp glucose đường uống được thể hiện tại hình 3.4



Hình 3.4. Ảnh hưởng của andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống glucose (2g/kg) trên chuột nhắt trắng bình thường

Nhận xét:

Sau khi tiến hành test dung nạp glucose trên chuột nhắt trắng bình thường, đỉnh tăng glucose máu ở tất cả các lô đều rơi vào thời điểm 30 phút sau uống glucose, sau đó nồng độ glucose máu giảm dần ở các thời điểm 60 phút và 120 phút. Acarbose 14 mg/kg không làm hạ glucose máu ở tất cả các thời điểm. Lô metformin 250 mg/kg gây hạ glucose máu có ý nghĩa so lô chứng trắng ($p < 0,05$) ở 2 thời điểm 30 phút và 120 phút sau uống glucose. Lô Andiabet 2g/kg cũng giảm nồng độ glucose máu có ý nghĩa so lô chứng trắng uống nước cất ($p < 0,05$) ở thời điểm 60 phút và 120 phút. Như vậy Andiabet liều cao có ảnh hưởng phần nào đến sự hấp thu glucose ở ruột non.

❖ *Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống sucrose của Andiabet.*

Thí nghiệm làm tương tự như test dung nạp glucose. Chuột nhắt trắng bình thường được uống thuốc thử trong 14 ngày liên tục. Ngày thứ 15 cho chuột uống sucrose liều 4 g/kg. Kết quả được trình bày ở bảng 3.16 và hình 3.5.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống sucrose (4g/kg) ở chuột bình thường

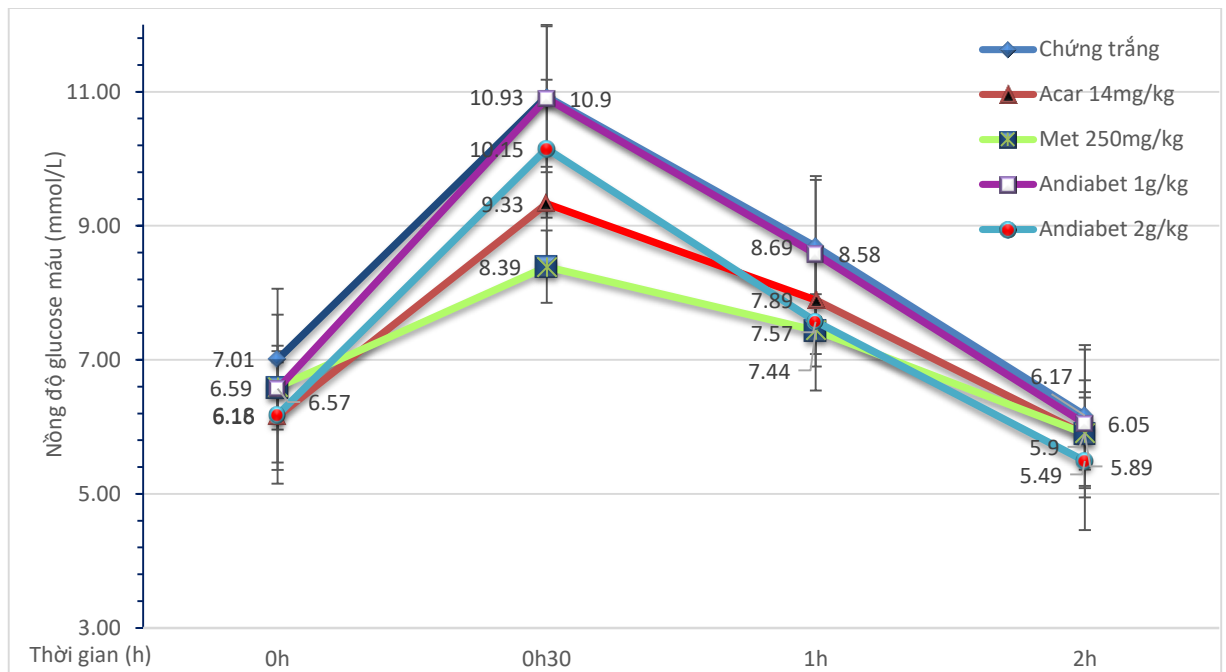
| Lô chuột (n =10) | PBG (mmol/L) | % giảm PBG | AUC (mmol/L) | % giảm AUC |
|--------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| Chuột Bình thường | | | | |
| Lô chứng | 10,93 ± 1,29 | | 16,82 ± 1,98 | |
| Lô acarbose 14mg/kg | 9,33 ± 1,52* | 16,47 | 15,07 ± 1,15* | 10,40 |
| Lô metformin 250mg/kg | 8,39 ± 2,43* | 23,24 | 14,37 ± 1,69* | 14,57 |
| Lô Andiabet 1g/kg | 10,90 ± 1,44 | 0,27 | 16,55 ± 2,09 | 1,60 |
| Lô Andiabet 2g/kg | 10,15 ± 1,29 | 2,9 | 15,05 ± 1,49* | 10,52 |

*p so với lô chứng: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$*

Nhận xét:

Trên chuột bình thường: acarbose liều 14 mg/kg và metformin liều 250 mg/kg đều làm hạ PBG và AUC có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,05$). Lô Andiabet 1g/kg và 2g/kg không làm hạ PBG và chỉ có Andiabet 2g/kg làm hạ AUC có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,05$).

Đồ thị biểu diễn sự thay đổi nồng độ glucose máu của chuột nhất trắng bình thường sau 14 ngày uống mẫu thử trong test dung nạp sucrose bằng đường uống được thể hiện trong hình 3.5.



Hình 3.5 Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống sucrose (4g/kg) trên chuột bình thường.

Nhận xét:

Ở chuột bình thường, acarbose 14 mg/kg và metformin 250 mg/kg ức chế đỉnh tăng glucose máu tại thời điểm 30 phút, có ý nghĩa so với lô chứng trắng ($p < 0,05$). Các lô uống Andiabet không ức chế được đỉnh tăng glucose máu. Sau đó tại thời điểm 60 phút, chỉ còn lô metformin 250mg/kg và lô Andiabet 2g/kg gây hạ glucose máu có ý nghĩa so với lô chứng trắng ($p < 0,05$).

❖ *Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống tinh bột của Andiabet.*

Thí nghiệm làm tương tự như test dung nạp glucose. Chuột nhắt trắng bình thường được uống thuốc thử trong 14 ngày liên tục. Ngày thứ 15 cho chuột uống tinh bột liều 6 g/kg. Kết quả được trình bày ở bảng 3.18 và hình 3.6.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2h uống tinh bột khoai (6g/kg) ở chuột bình thường.

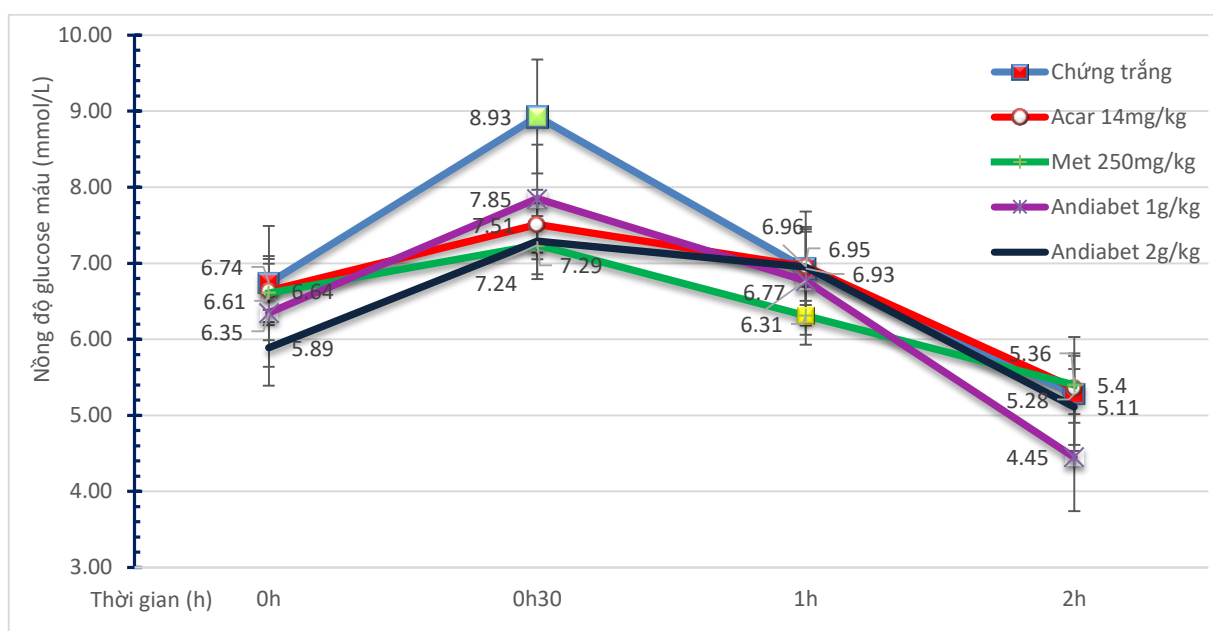
| Lô chuột (n =10) | PBG (mmol/L) | % giảm PBG | AUC (mmol/L) | % giảm AUC |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Chuột Bình thường | | | | |
| Lô chứng trắng | 8,93 ± 1,52 | | 13,99 ± 1,47 | |
| Lô acarbose 14mg/kg | 7,51 ± 0,98* | 15,9 | 13,32 ± 0,83 | 4,79 |
| Lô metformin 250mg/kg | 7,24 ± 0,37* | 18,92 | 12,71 ± 1,39 | 9,15 |
| Lô Andiabet 1g/kg | 7,85 ± 1,12 | 12,09 | 12,82 ± 1,61 | 8,36 |
| Lô Andiabet 2g/kg | 7,29 ± 1,27* | 18,36 | 12,88 ± 1,62 | 7,93 |

*p so với lô chứng: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001*

Nhận xét:

Trên nhóm chuột bình thường: Cả 3 lô uống acarbose, metformin và Andiabet 2g/kg đều ức chế PBG so với lô chứng trắng ($p < 0,05$). Cả 4 lô uống Acarbose, Metformin, Andiabet 1g và 2g/kg đều không làm giảm AUC có ý nghĩa so với lô chứng.

Đồ thị biểu diễn sự thay đổi nồng độ glucose máu của chuột nhắt trắng bình thường sau 14 ngày uống mẫu thử trong test dung nạp tinh bột bằng đường uống được thể hiện trong hình 3.6.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống tinh bột (6g/kg) trên chuột bình thường.

Nhận xét:

Trên chuột nhắt trắng bình thường: sau 2 tuần liên tục uống thuốc thử, tiến hành cho chuột uống tinh bột liều 6g/kg thể trọng, nhận thấy nồng độ glucose máu của tất cả các lô tại các thời điểm theo dõi: 30 phút, 60 phút và 120 phút đều không có sự thay đổi so với lô chứng ($p < 0,05$). Tại thời điểm 30 phút, các lô uống acarbose 14mg/kg; metformin 250mg/kg và Andiabet 2g/kg đã làm hạ đỉnh tăng glucose máu một cách có ý nghĩa so với lô chứng trắng ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu của Andiabet trên chuột nhắt trắng gây ĐTD typ 2.

❖ Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống glucose của Andiabet.

Chuột ĐTD typ 2 được uống thuốc thử trong 14 ngày liên tục. Ngày thứ 15 cho chuột uống glucose liều 2 g/kg. Định lượng glucose máu tại các thời điểm trước khi uống, 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi uống glucose.

Kết quả được trình bày ở bảng 3.19 và hình 3.7.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của Andiaabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống glucose (2g/kg) ở chuột gây ĐTD typ 2

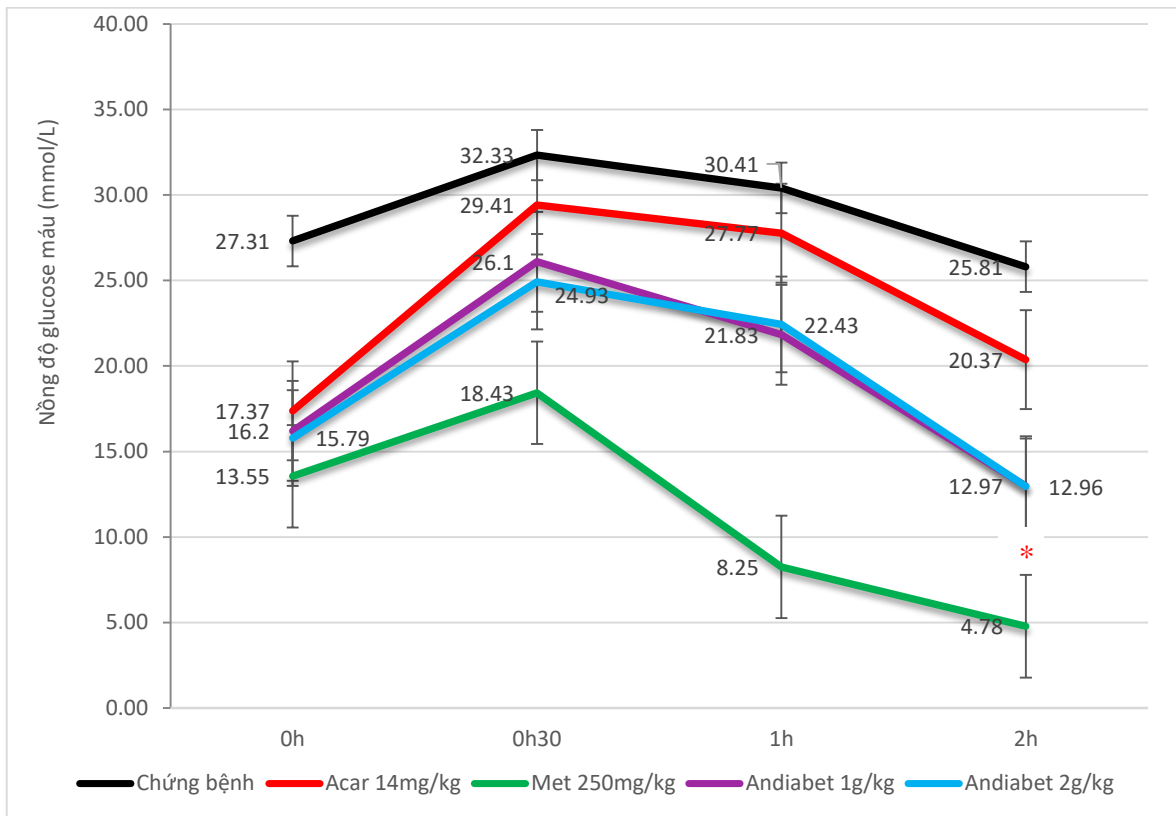
| Lô chuột (n =10) | PBG (mmol/L) | % giảm PBG | AUC (mmol/L) | % giảm AUC |
|----------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| Chuột gây ĐTD typ 2 | | | | |
| Lô chứng bệnh | 32,33 ± 1.01 | | 58,71 ± 7,61 | |
| Lô acarbose 14 mg/kg | 29,41 ± 5,50 | 9,03 | 50,06 ± 10,84 | 14,73 |
| Lô metformin 250 mg/kg | 18,43 ± 5,21** | 42,99 | 21,69 ± 6,31*** | 63,05 |
| Lô Andiaabet 1 g/kg | 26,10 ± 4,15* | 19,27 | 39,96 ± 9,87* | 31,94 |
| Lô Andiaabet 2 g/kg | 24,93 ± 4,05* | 22,89 | 39,71 ± 7,56** | 32,36 |

*p so với lô chứng: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001*

Nhận xét:

Trên nhóm chuột gây ĐTD typ 2: Hai lô uống thuốc thử Andiaabet 1g/kg và 2g/kg đã làm giảm PBG có ý nghĩa so lô chứng bệnh, mức hạ PBG lần lượt là 19,27 % và 22,89 % ($p < 0,05$). Đồng thời 2 lô Andiaabet 1g/kg và 2g/kg cũng làm hạ AUC lần lượt là 31,94 % và 32,36 % ($p < 0,01$), mức hạ này thấp hơn so lô chứng dương uống metformin có mức hạ PBG là 43% ($p < 0,01$) và AUC là 63% ($p < 0,001$). Còn lô acarbose 14 mg/kg không làm giảm PBG và AUC ($p > 0,05$).

Đồ thị biểu diễn sự thay đổi nồng độ glucose máu của chuột nhất ĐTD typ 2 sau 14 ngày uống mẫu thử trong test dung nạp glucose đường uống được thể hiện trong hình 3.7.



Hình 3.7. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống glucose (2g/kg) trên chuột nhắt gây ĐTD typ 2.

Nhận xét:

Chuột gây ĐTD typ 2, sau 2 tuần liên tục uống thuốc thử, nồng độ glucose máu của tất cả các lô đều giảm so với lô chứng bệnh, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Nhưng lô acarbose 14mg/kg không làm hạ glucose máu có ý nghĩa ở các thời điểm 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi uống glucose so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$). Ngược lại, lô metformin 250mg/kg gây hạ glucose máu mạnh nhất so lô chứng bệnh ($p < 0,01$ và $p < 0,001$) ở tất cả các thời điểm 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi uống glucose. Còn 2 lô Andiabet 1g/kg và 2g/kg cũng gây hạ glucose máu một cách có ý nghĩa so với lô chứng bệnh ở tất cả các thời điểm ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

❖ **Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống sucrose của Andiabet.**

Thí nghiệm làm tương tự như test dung nạp glucose. Chuột nhắt ĐTD

kiểu typ 2 được uống thuốc thử trong 14 ngày liên tục. Ngày thứ 15 cho chuột uống sucrose liều 4 g/kg. Kết quả được trình bày ở bảng 3.20 và hình 3.8.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của Andiaabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2 giờ uống sucrose (4g/kg) ở chuột gây ĐTĐ typ 2

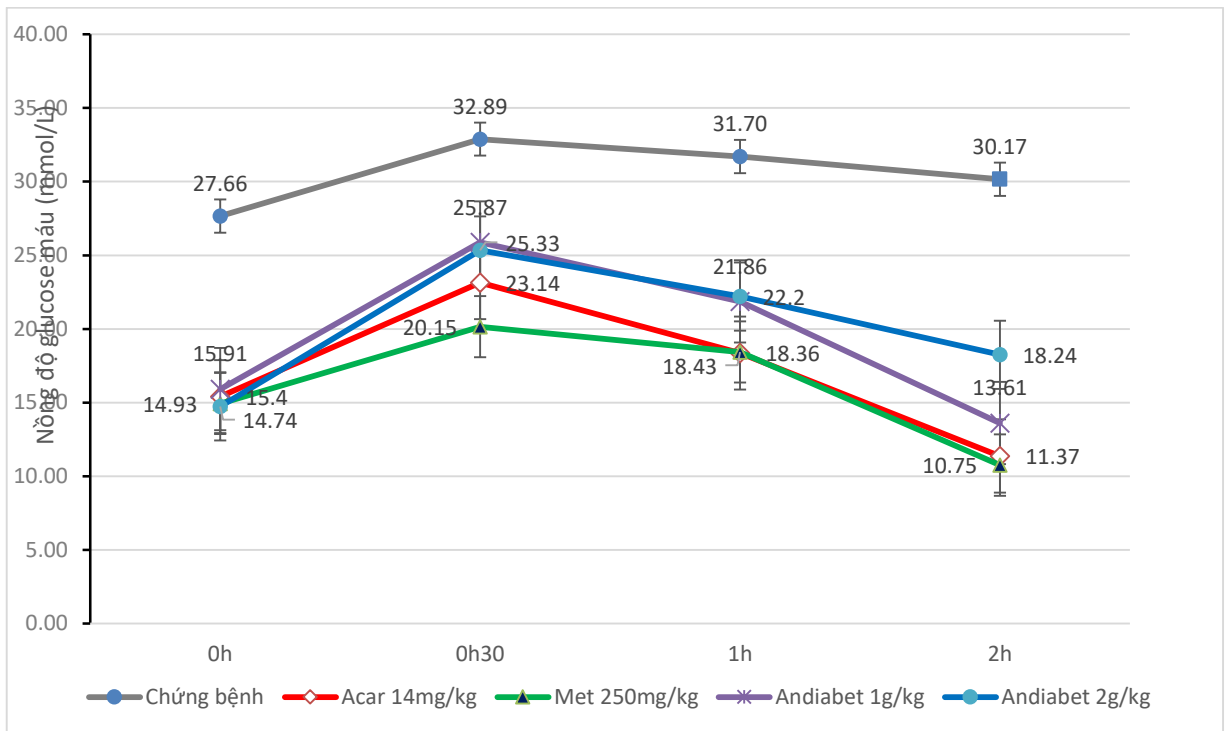
| Lô chuột (n =10) | PBG (mmol/L) | % giảm PBG | AUC (mmol/L) | % giảm AUC |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Chuột gây ĐTĐ typ 2 | | | | |
| Lô chứng bệnh | 32,89 ± 1,10 | | 66,22 ± 7,89 | |
| Lô acarbose 14mg/kg | 23,14 ± 6,57* | 29,64 | 34,88 ± 10,45*** | 47,32 |
| Lô metformin 250mg/kg | 20,15 ± 9,54* | 38,74 | 32,96 ± 15,73*** | 50,22 |
| Lô Andiaabet 1g/kg | 25,87 ± 7,71 | 21,34 | 40,11 ± 14,74** | 39,43 |
| Lô Andiaabet 2g/kg | 25,33 ± 4,97* | 22,98 | 42,12 ± 8,92** | 36,39 |

*p so với lô chứng: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001*

Nhận xét:

Trên nhóm chuột ĐTĐ typ 2: acarbose 14 mg/kg, metformin 250 mg/kg và Andiaabet 2g/kg đều ức chế PBG có ý nghĩa so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Trong khi đó Andiaabet 1g/kg không ức chế được PBG. Tuy nhiên, tất cả các lô đều làm giảm AUC có ý nghĩa so với lô chứng bệnh: lô acarbose giảm 47,32% ($p < 0,001$); lô metformin giảm 50,22% ($p < 0,001$), còn lô andiaabet 1g và 2g/kg giảm thấp hơn lần lượt là 39,43 % và 36,39 % ($p < 0,01$).

Đồ thị biểu diễn sự thay đổi nồng độ glucose máu của chuột nhất ĐTĐ typ 2 sau 14 ngày uống mẫu thử trong test dung nạp sucrose đường uống được thể hiện trong hình 3.8.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống sucrose (4g/kg) trên chuột gây ĐTĐ typ 2.

Nhận xét:

Chuột gây ĐTĐ typ 2, sau 2 tuần liên tục uống thuốc thử, nồng độ glucose máu của tất cả các lô uống thuốc thử đều giảm so với lô chứng bệnh, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Các lô uống acarbose 14mg/kg, metformin 250mg/kg và Andiabet 2g/kg đều ức chế đỉnh tăng glucose máu PBG tại thời điểm 30 phút ($p < 0,05$) và tác dụng hạ glucose máu mạnh và kéo dài đến các thời điểm 60 phút và 120 phút sau khi uống sucrose, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Lô Andiabet 1g/kg không gây hạ glucose máu rõ rệt so với lô chứng bệnh tại thời điểm 30 phút và 60 phút, nhưng gây hạ glucose máu rõ sau 120 phút uống sucrose so với lô chứng bệnh ($p < 0,001$).

❖ Tác dụng ức chế dung nạp glucose máu sau uống tinh bột của Andiabet

Thí nghiệm làm tương tự như test dung nạp glucose. Chuột nhắt ĐTĐ

kiểu typ 2 được uống thuốc thử trong 14 ngày liên tục. Ngày thứ 15 cho chuột uống tinh bột liều 6 g/kg. Kết quả được trình bày ở bảng 3.21 và hình 3.9.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của Andiabet trên PBG và AUC glucose máu sau 2h uống tinh bột khoai (6g/kg) ở chuột gây ĐTĐ typ 2.

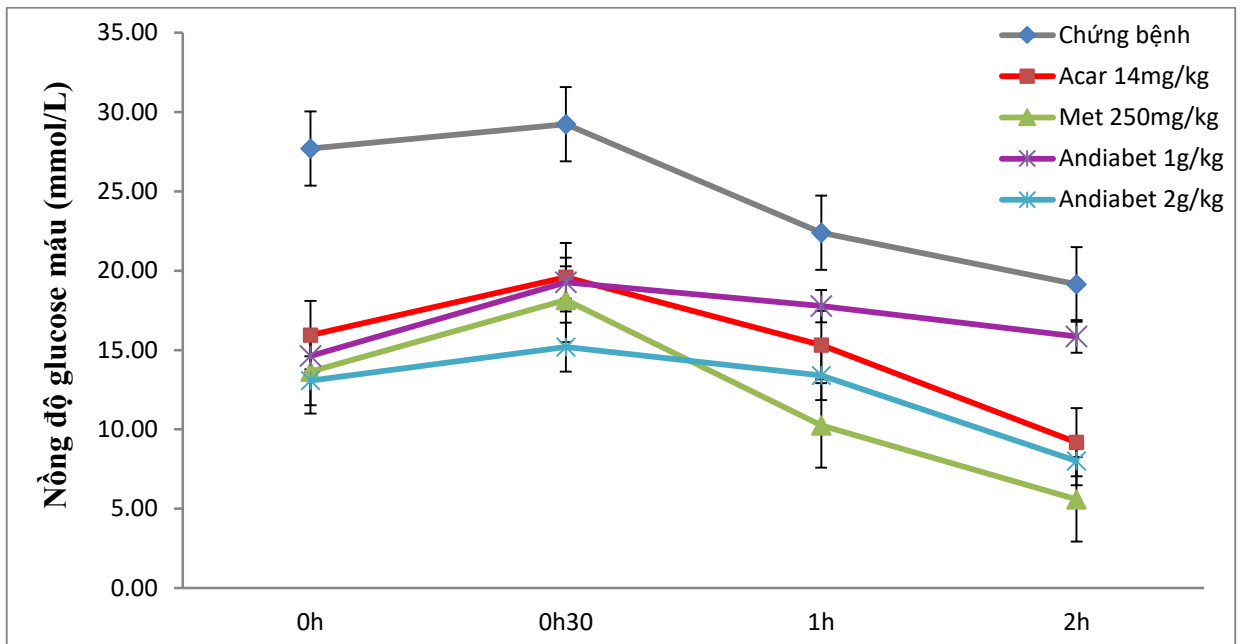
| Lô chuột (n =10) | PBG (mmol/L) | % giảm PBG | AUC (mmol/L) | % giảm AUC |
|----------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| Chuột gây ĐTĐ typ 2 | | | | |
| Lô chứng bệnh | 29,24 ± 4,14 | | 47,92 ± 6,16 | |
| Lô acarbose 14mg/kg | 19,59 ± 8,49 | 33,03 | 29,86 ± 1,28* | 37,69 |
| Lô metformin 250mg/kg | 18,16 ± 3,73** | 37,89 | 22,90 ± 4,69** | 52,21 |
| Lô Andiabet 1g/kg | 19,26 ± 11,12 | 34,13 | 36,33 ± 2,27 | 24,18 |
| Lô Andiabet 2g/kg | 15,18 ± 4,19*** | 48,08 | 24,94 ± 6,81** | 47,95 |

*p so với lô chứng: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001*

Nhận xét:

Trên nhóm chuột ĐTĐ typ 2: Hai lô metformin và andiabet 2g/kg đã ức chế PBG một cách có ý nghĩa so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). AUC của 3 lô acarbose, metformin và Andiabet 2g/kg đã giảm có ý nghĩa so với lô chứng bệnh. Tỷ lệ % giảm AUC của 3 lô lần lượt là: 37,69% ($p < 0,05$), 52,21% ($p < 0,01$) và 47,95% ($p < 0,01$).

Đồ thị biểu diễn sự thay đổi nồng độ glucose máu của chuột nhất ĐTĐ typ 2 sau 14 ngày uống mẫu thử trong test dung nạp tinh bột đường uống được thể hiện trong hình 3.9.



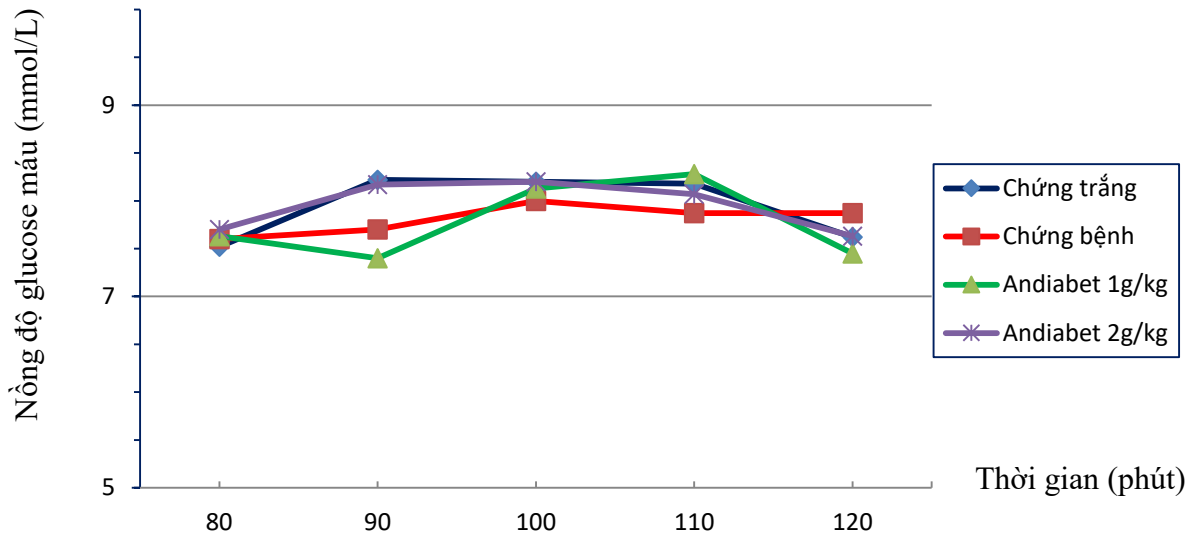
Hình 3.9. Ảnh hưởng của Andiabet lên nồng độ glucose máu tại các thời điểm sau khi uống tinh bột (6g/kg) trên chuột gây ĐTD typ 2.

Nhận xét:

Trên chuột nhất gây ĐTD typ 2: sau 2 tuần uống thuốc thử, trước khi tiến hành test dung nạp tinh bột, định lượng nồng độ glucose máu cho thấy: cả 4 lô acarbose 14mg/kg, metformin 250mg/kg và andiabet 1g/kg và 2g/kg đều làm hạ glucose máu so với lô chứng bệnh, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và $p < 0,01$. Chỉ có lô metformin 250mg/kg và Andiabet 2g/kg gây hạ glucose máu có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$ và $p < 0,01$) tại các thời điểm 30 phút và 120 phút.

3.2.4. Ảnh hưởng của Andiabet đến mức kháng insulin của chuột nhất gây đái tháo đường typ 2.

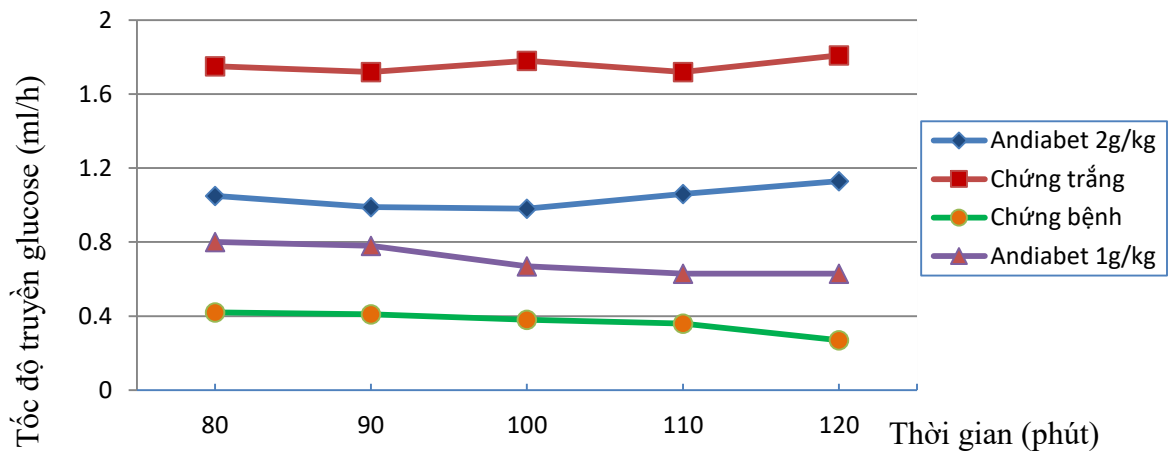
Chuột ĐTD typ 2 được uống thuốc thử hoặc nước cất trong 2 tuần liên tiếp. Ngày thứ 15 tiến hành kỹ thuật “kẹp duy trì glucose ổn định-tăng insulin máu” gọi tắt là kỹ thuật “kẹp insulin - đấng glucose” để đánh giá mức độ kháng insulin. Kết quả được trình bày tại hình 3.10 và 3.11



Hình 3.10. Nồng độ glucose máu trong test kẹp insulin – đặng glucose ở chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2.

Nhận xét:

Hình 3.10: Nồng độ glucose máu của cả 4 lô được duy trì ổn định trong khoảng 7.5 - 8.3 mmol/L suốt thời gian kẹp từ phút 80-120.



Hình 3.11. Tốc độ truyền glucose trong test kẹp insulin – đặng glucose ở chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2.

Nhận xét:

Tốc độ truyền glucose máu giảm dần từ lô chứng trắng, xuống lô andipabet 2g/kg, Andipabet 1g/kg và thấp nhất ở lô chứng bệnh.

Chương 4. BÀN LUẬN

Với mong muốn tạo ra một sản phẩm điều trị ĐTĐ hiệu quả, có nguồn gốc từ thảo dược, công ty Traphaco đã bào chế viên nang cứng Andiabet. Chế phẩm Andiabet là sự kết hợp của ba loại dược liệu Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu. Để có thể đưa viên Andiabet vào sử dụng trong điều trị hỗ trợ bệnh nhân ĐTĐ typ 2, việc nghiên cứu tính an toàn cũng như các tác dụng dược lý và làm rõ một số cơ chế tác dụng của viên Andiabet trên thực nghiệm là cần thiết. Sau đây là những bàn luận, đánh giá về các mô hình thực nghiệm và kết quả nghiên cứu tính an toàn và tác dụng hạ glucose máu của Andiabet trên thực nghiệm.

4.1. VỀ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ BÁN TRƯỜNG DIỄN CỦA ANDIABET

Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn là bước đầu tiên quan trọng và cần thiết để có thể tiến hành thử nghiệm một chế phẩm mới trên người.

4.1.1. Về độc tính cấp của Andiabet

Andiabet gồm 3 dược liệu là Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu. Các nghiên cứu về độc tính cấp của từng dược liệu đều nhận định: các dược liệu này thực sự an toàn cho động vật thực nghiệm [93]. Nghiên cứu của Barun Kanti Saha và cộng sự đã chỉ ra rằng dịch chiết nước nóng lá Bằng lăng nước liều 400-800mg/kg không gây chết và không có biểu hiện nhiễm độc cấp trên chuột nhắt trắng [86]. Theo Phùng Thanh Hương, chuột nhắt trắng uống cao chiết lá Bằng lăng nước liều từ 20g/kg đến 400g/kg trong 72 giờ không có biểu hiện ngộ độc, không có chuột chết [76]. Còn khi nghiên cứu độc tính cấp của Giảo cổ lam, Đào Văn Phan, Nguyễn Khánh Hoà nhận thấy cao khô Giảo cổ lam liều 15g/kg không gây chết chuột nhắt trắng và chuột không có biểu hiện nhiễm độc cấp [136]. Chiranthanut N và cộng sự cũng thử nghiệm độc tính cấp đường uống của dịch chiết nước Giảo cổ lam đã được chuẩn hóa chứa 6% gypenosid. Chuột cống Sprague-Dawley cái được cho uống một liều duy nhất

5000 mg/kg dịch chiết Giảo cổ lam, theo dõi thấy không có chuột nào chết cũng như không có bất cứ dấu hiệu nhiễm độc nào xảy ra [153]. Miura T và cộng sự cho thấy Tri mẫu không độc vì chuột nhắt uống Tri mẫu liều 900mg/kg không có bất cứ biểu hiện kích thích, bất thường nào ($LD_{50} > 900\text{mg/kg}$) [138]. Bùi Thị Quỳnh Nhung thử độc tính cấp của Vinabetes (dạng cao mềm chứa dịch chiết nước của Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu) đã xác định LD_{50} của Vinabetes trên chuột nhắt trắng là 42,98 g/kg [48].

Trong thử nghiệm của chúng tôi, chuột nhắt trắng được cho uống chế phẩm thử Andiabet với liều tăng dần đến liều 44,25 g/kg cân nặng chuột, không thấy có sự thay đổi bất thường nào, không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ (bảng 3.1). Đây là thể tích tối đa có khả năng dung nạp nhưng không có chuột nào chết. Vì vậy chưa xác định được LD_{50} của Andiabet bằng đường uống theo phương pháp Lichfield -Wilcoxon [148]. Andiabet có độ an toàn tương đối cao vì tỷ lệ giữa liều dung nạp tối đa (44,25 g/kg) so với liều điều trị (liều bắt đầu có tác dụng hạ glucose máu theo đường uống của Andiabet là 0,68 g/kg chuột nhắt) là 66:1. Do đó có thể đề xuất liều Andiabet uống thử trên người từ 0,45 g/kg – 4,4 g/kg/ngày (trong khoảng 1/100-1/10 liều dung nạp tối đa). Hàm lượng dược chất có trong 01 viên nang cứng Andiabet là 533mg (gồm 200 mg Bằng lăng nước, 200 mg Giảo cổ lam và 133 mg Tri mẫu). Như vậy suy ra liều dùng tối đa trên người là 8 viên/ngày, ngoại suy ra liều trên chuột nhắt trắng là 1g/kg/ngày (tính hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12 và người trưởng thành khoảng 50 kg). Trên thực nghiệm, chúng tôi đã thăm dò thấy liều bắt đầu có tác dụng hạ glucose máu theo đường uống của Andiabet là 0,68 g/kg chuột nhắt. Vì vậy, trong nghiên cứu tiếp theo chúng tôi sử dụng 3 liều Andiabet là: liều 0,68g/kg (liều tương đương liều lâm sàng); liều 1g/kg (liều gấp 1,5 lần liều lâm sàng) và liều 2 g/kg (liều gấp 3 lần liều lâm sàng).

4.1.2. Về độc tính bán trường diễn của Andiabet

Vinabetes là dạng cao mềm có thành phần tương tự Andiabet đã được nghiên cứu về độc tính bán trường diễn trên thỏ trong 4 tuần với 2 liều 1,8 g/kg/ngày và 3,6 g/kg/ngày. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy Vinabetes tuy không ảnh hưởng đến tình trạng chung, sự gia tăng thể trọng thỏ, chức năng hệ thống tạo máu, chức năng gan, cấu trúc và chức năng thận thỏ, nhưng trên vi thể có tổn thương tế bào gan ở các mức độ khác nhau. Do tổn thương này không trùng hợp với sự thay đổi các chỉ số sinh hóa nên chưa khẳng định chắc chắn được tổn thương trên cấu trúc gan [48]. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Andiabet với thời gian kéo dài hơn nhằm tìm kiếm những tổn thương do độc tính của thuốc gây ra. Theo WHO nghiên cứu độc tính bán trường diễn đường uống trên động vật gặm nhấm với liều lặp lại trong thời gian 90 ngày sẽ cung cấp những thông tin về các độc tính chính, chỉ ra các cơ quan đích bị tổn thương và khả năng tích lũy thuốc, cũng như có thể xác định mức độ tác dụng có hại không quan sát được của chế phẩm thử, thiết lập các tiêu chí an toàn cho người sử dụng [115]. Căn cứ hướng dẫn thử độc tính bán trường diễn các thuốc từ dược liệu của WHO, chúng tôi tiến hành đánh giá độc tính bán trường diễn của chế phẩm thử trên thỏ trong 90 ngày liên tục với 2 liều: Andiabet liều 0,21 g/kg/ngày (tương đương liều dự kiến dùng trên người) và Andiabet liều 0,64 g/kg/ngày (tương đương liều gấp 3 lần liều dự kiến dùng trên người). Độc tính của thuốc (nếu có) sẽ ảnh hưởng đến tình trạng toàn thân, ảnh hưởng đến một số chức năng và hình thái cấu trúc của các cơ quan chính trong cơ thể. Từ kết quả thực nghiệm cho thấy:

4.1.2.1. Tình trạng chung và sự thay đổi cân nặng cơ thể thỏ:

Trong suốt thời gian 90 ngày uống thuốc, theo dõi thấy các thỏ vẫn tỉnh táo, nhanh nhẹn, ăn, uống và các hoạt động khác vẫn bình thường. Về cân nặng, sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống chế phẩm thử, cân nặng của thỏ ở các lô điều trị bằng Andiabet đều tăng so với trước nghiên cứu và không có sự khác

biệt so với lô chứng ($p > 0,05$), (bảng 3.2). Thỏ dùng trong nghiên cứu là thỏ đã trưởng thành, trên 3 tháng tuổi, đạt cân nặng ổn định từ 2-2,5 kg, vì thế cân nặng duy trì ở mức độ trên là hoàn toàn phù hợp với sinh lý phát triển. Nếu cân nặng của thỏ giảm đi hoặc thể trạng chung thay đổi trong quá trình nghiên cứu thì có thể là hậu quả của sự tác động tiêu cực của thuốc thử [147]. Như vậy bước đầu cho thấy Andiabet không ảnh hưởng đến quá trình hoạt động và tăng trưởng bình thường của thỏ.

4.1.2.2. Ảnh hưởng của Andiabet đến chức năng tạo máu:

Máu là một tổ chức quan trọng có liên quan mật thiết với mọi cơ quan trong cơ thể. Về mặt bệnh lý, máu chịu ảnh hưởng của tất cả các cơ quan đó, nhưng đồng thời cũng phản ánh tình trạng riêng của cơ quan tạo máu. Nếu thuốc có ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu thì trước hết các thành phần của máu sẽ bị thay đổi. Theo WHO, đánh giá được càng nhiều thông số của máu càng có khả năng đánh giá chính xác độc tính của thuốc [147]. Vì vậy, để đánh giá ảnh hưởng của Andiabet đến cơ quan tạo máu, các xét nghiệm về số lượng hồng cầu, lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu của thỏ thí nghiệm được tiến hành tại các thời điểm 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày sau uống chế phẩm thử.

Kết quả bảng 3.3 và bảng 3.4 cho thấy: số lượng hồng cầu, lượng hemoglobin, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu của các thỏ ở cả 2 lô thử uống Andiabet liều tương đương lâm sàng 0,21g/kg/ngày và liều gấp 3 lâm sàng 0,64g/kg/ngày đều không có sự khác biệt so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống chế phẩm thử. Điều này cho thấy Andiabet không có độc tính với cơ quan tạo máu.

4.1.2.3. Ảnh hưởng của Andiabet đến chức năng gan thỏ

Nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc đối với hệ thống gan mật là rất cần thiết

khi đánh giá độc tính của thuốc, nhất là các thuốc dùng dài ngày, vì gan là cơ quan chuyển hóa thuốc. Để đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan, 2 enzym thường được định lượng là AST (SGOT) và ALT (SGPT). Sự gia tăng hoạt độ các enzym này thường gắn liền với sự huỷ hoại tế bào gan do độc tính của thuốc.

Kết quả cho thấy sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống Andiabet ở cả 2 mức liều, hoạt độ AST và ALT không tăng cao trong huyết thanh (bảng 3.5), không có sự khác biệt so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống chế phẩm thử. Điều này chứng tỏ chế phẩm thử không gây tổn thương cho tế bào gan.

Các chức năng khác của gan có thể được đánh giá gián tiếp thông qua một số xét nghiệm như: nồng độ bilirubin toàn phần, nồng độ albumin, nồng độ cholesterol toàn phần trong máu thỏ [154]. Kết quả ở bảng 3.5 đã chứng minh Andiabet liều 0,21 g/kg/ngày và liều 0,64 g/kg/ngày không làm ảnh hưởng đến chức năng gan, không có sự khác biệt so với lô chứng và so sánh giữa các thời điểm trước và sau khi uống chế phẩm thử ($p > 0,05$).

Nhằm đánh giá trực tiếp tổn thương tại gan, tất cả các thử thực nghiệm (gồm lô chứng và 2 lô thử) sau 90 ngày uống Andiabet đều được mổ để quan sát hình ảnh đại thể của gan cũng như các cơ quan: tim, phổi, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá. Quan sát cho thấy không có sự thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể tại tất cả các cơ quan đó. Tuy nhiên, tất cả các mẫu bệnh phẩm gan thỏ đều được gửi đến Trung tâm nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư để làm xét nghiệm vi thể. Kết quả kiểm tra ngẫu nhiên 30% cấu trúc vi thể gan thỏ ở mỗi lô cho thấy: lô chứng và lô thử 1 có 1 mẫu (trong 3 mẫu bệnh phẩm) tế bào gan có hiện tượng thoái hóa nhẹ. Lô thử 2 có 2 mẫu (trong 3 mẫu bệnh phẩm) tế bào gan có hiện tượng thoái hóa nhẹ (Hình 3.1). Tuy có một vài tổn thương nhẹ ở cấu trúc vi thể gan thỏ lô thử 1 và lô thử 2, nhưng không có sự khác biệt so

với lô chứng. Các biến đổi nhỏ này cũng chưa đủ để gây ra những thay đổi về sinh hóa chức năng gan. Tuy nhiên trong quá trình dùng thuốc dài ngày cần chú ý theo dõi chức năng gan và nên thận trọng với những bệnh nhân có tiền sử bệnh lý về gan.

4.1.2.4. Ảnh hưởng của Andiabet đến chức năng thận thỏ

Thận là cơ quan bài tiết của cơ thể, rất dễ bị tổn thương bởi các chất độc nội sinh và ngoại sinh. Do đó, khi đưa thuốc vào cơ thể, thuốc được thải trừ qua thận có thể gây độc, làm tổn thương thận, từ đó ảnh hưởng chức năng lọc cầu thận. Vì thế xét nghiệm cơ bản để đánh giá chức năng lọc của cầu thận thường được sử dụng là xét nghiệm creatinin máu [154].

Trong thực nghiệm của chúng tôi, sau 30 ngày, 60 ngày và 90 ngày uống Andiabet, nồng độ creatinin không có sự khác biệt so với lúc trước dùng thuốc (bảng 3.6), chứng tỏ Andiabet không ảnh hưởng chức năng lọc cầu thận.

Đồng thời, quan sát không thấy có thay đổi nào về mặt đại thể thận thỏ cũng như các kết quả xét nghiệm vi thể thận thỏ cho thấy không có sự khác biệt về cấu trúc vi thể thận giữa 2 lô thử dùng chế phẩm thử Andiabet và lô chứng: cấu trúc vi thể của biểu mô thận, tế bào ống lượn gần hoàn toàn bình thường, tương tự như lô chứng, không thấy có các biểu hiện của tổn thương (hình 3.2). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với xét nghiệm đánh giá chức năng thận: creatinin máu bình thường.

Các tác giả khác khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn của từng dược liệu riêng rẽ cũng cho các kết quả tương tự: Phùng Thanh Hương nghiên cứu độc tính bán trường diễn của dịch chiết lá Bằng lăng nước liều 4,55 g và liều 13,65 g dược liệu khô/kg đường uống trên thỏ sau 4 tuần không làm thay đổi tình trạng chung, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, thận thỏ [66]. Đào Văn Phan và cộng sự nhận thấy thỏ uống dịch chiết Giao cổ lam liều 400 g/kg trong 2 tháng không có sự thay đổi về chức phận cơ bản của gan, thận

[136]. Khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn của dịch chiết nước Giảo cổ lam đã được chuẩn hóa chứa 6% gypenosid, Chiranthanut N và cộng sự đã cho chuột cống uống dịch chiết với liều 1000 mg/kg/ngày trong 90 ngày, sau đó theo dõi thêm 28 ngày nữa sau 90 ngày điều trị. Kết quả là dịch chiết Giảo cổ lam không gây tử vong hay có bất kỳ sự bất thường nào ở chuột. Mặc dù một số xét nghiệm huyết học và sinh hóa máu (như bạch cầu trung tính, monocyte, glucose, và mức phosphatase kiềm huyết thanh) có sự khác biệt về mặt thống kê so với nhóm chứng, tuy nhiên những giá trị này vẫn nằm trong phạm vi bình thường [153].

Như vậy kết quả thử độc tính bán trường diễn trong nghiên cứu này cho thấy Andiabet liều 0,21 g/kg/ngày và liều 0,64 g/kg/ngày không gây độc cho thỏ sau 90 ngày liên tục uống thuốc. Kết quả này cũng loại trừ sự nghi ngờ của Bùi Thị Quỳnh Nhung về tổn thương vi thể gan thỏ khi nghiên cứu độc tính bán trường diễn của Vinabetes [48]. Kết quả nghiên cứu này hứa hẹn cho việc sử dụng chế phẩm thử trên người. Điều này có cơ sở thực tế vì Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu đều được biết đến như là những loại thảo dược an toàn, đã được sử dụng rộng rãi trong dân gian mà không thấy phản ứng bất lợi nào.

4.2. TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU VÀ MỘT SỐ CƠ CHẾ TÁC DỤNG HẠ GLUCOSE MÁU CỦA VIÊN ANDIABET TRÊN THỰC NGHIỆM

4.2.1. Tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet trên chuột nhắt trắng bình thường.

Một số nghiên cứu đã đưa ra nhận định Giảo cổ lam, Bằng lăng nước và Tri mẫu có khả năng làm hạ glucose máu trên chuột bình thường. Đào Văn Phan và cộng sự nghiên cứu dịch chiết cồn toàn phần của Giảo cổ lam nhận thấy: Giảo cổ lam có tác dụng hạ glucose máu yếu trên chuột nhắt trắng bình thường, nhưng lại có tác dụng khá mạnh trên chuột có đường huyết cao [136]. Noberg A., Nguyễn Khánh Hòa và cs (2004) [112] đã chứng minh Phanosit

một saponin damaran mới, chiết xuất từ cây Giảo cổ lam có tác dụng làm hạ glucose máu trên chuột cống bình thường khi cho uống liều 40 mg/kg và khẳng định tác dụng đó là do kích thích tuyến tụy bài tiết insulin. Phùng Thanh Hương nghiên cứu về tác dụng hạ glucose máu của Bằng lăng nước thấy: dịch chiết ethanol liều tương đương 18,2 g dược liệu khô/kg cho chuột nhắt trắng bình thường uống sau 4 giờ đã làm hạ glucose máu là 35,01% [66]. Còn Đào Văn Phan, Nguyễn Khánh Hoà, Nguyễn Duy Thuần thấy dịch chiết ethanol của Tri mẫu 1500 mg/kg đường uống có tác dụng làm hạ glucose máu trên chuột nhắt trắng sau 4 giờ [136]. Nguyễn Thị Hương Giang nghiên cứu Mangiferin chiết xuất từ Tri mẫu nhận thấy Mangiferin liều 100mg/kg làm hạ glucose máu 15,56% ($p > 0,05$) và liều 200mg/kg làm hạ glucose máu là 23,85% ($p < 0,05$) so với lô chứng và tác dụng này kéo dài trên 7 giờ ở chuột nhắt trắng bình thường sau 7 ngày uống thuốc liên tục [143].

Như vậy trong các nghiên cứu riêng rẽ nói trên, dịch chiết của Giảo cổ lam, Bằng lăng nước và Tri mẫu, cũng như các hoạt chất chính trong các dược liệu đó đều thể hiện tác dụng hạ glucose máu trên chuột bình thường, sau 4 giờ uống thuốc và sau uống liên tục 7 ngày, mức hạ glucose máu dao động nhiều trong khoảng từ 15-35% và phụ thuộc liều dùng. Cũng như vậy khi cho chuột nhắt trắng uống cao mềm Vinabetes (hỗn hợp dịch chiết của Giảo cổ lam, Bằng lăng nước và Tri mẫu) trong 4 tuần liên tục với liều 4,5 g/kg và 9 g/kg, sau 2 tuần nồng độ glucose máu giảm lần lượt là 18,7 % và 22,7 %, còn sau 4 tuần nồng độ glucose máu giảm rõ rệt lần lượt là 34 % và 44% [56].

Tương tự như vậy, kết quả từ bảng 3.7 cho thấy viên Andiabet có tác dụng hạ glucose máu trên chuột nhắt trắng bình thường. Sau 2 tuần liên tục uống chế phẩm thử, mức hạ glucose máu so với lô chứng của Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày là 14,3% và của Andiabet liều 2 g/kg/ngày là 17,1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Gliclazid làm hạ glucose máu ở cả 2 thời

điểm xét nghiệm là sau 1 tuần và 2 tuần uống thuốc, với mức hạ glucose máu từ 17,44 – 20,52 %. Gliclazid là một thuốc điều trị ĐTD typ 2 thuộc nhóm sulfonylurea, thế hệ 2 làm hạ glucose máu theo cơ chế chính là kích thích tuyến tụy bài tiết insulin [15], do vậy được sử dụng làm chứng dương trong thí nghiệm này. Có thể nhận thấy Andiabet làm hạ glucose máu yếu hơn so với gliclazid trên chuột nhất trắng bình thường, vì cả 3 loại thảo dược Giảo cổ lam, Bằng lăng nước và Tri mẫu đều chứa nhiều hoạt chất với các cơ chế hạ glucose máu khác nhau, không chỉ đơn thuần kích thích tuyến tụy tăng bài tiết insulin như gliclazid, mà có thể còn tác động hạ glucose máu theo nhiều cơ chế khác như làm tăng nhạy cảm của mô đích với insulin, ức chế gan tân tạo glucose, tăng tổng hợp glycogen ... và các tác dụng đó lại không thể hiện trên chuột nhất trắng bình thường. Do đó cần tiếp tục nghiên cứu tác dụng hạ glucose máu của Andiabet trên mô hình gây ĐTD typ 2.

4.2.2. Tác dụng HGM của viên Andiabet trên chuột nhất trắng gây ĐTD typ 2.

4.2.2.1. Mô hình gây ĐTD typ 2 trên chuột nhất trắng và kết quả của mô hình.

Nhìn chung một thuốc điều trị ĐTD muốn được sử dụng trên lâm sàng trước hết phải có các bằng chứng chứng minh có tác dụng trên động vật thực nghiệm. Dựa vào cơ chế bệnh sinh của bệnh ĐTD typ 2, nhiều mô hình tăng đường huyết (mô hình ĐTD thực nghiệm) đã được tạo ra để đánh giá ảnh hưởng của thuốc.

Hai đặc trưng chính của ĐTD typ 2 là kháng insulin và suy giảm khả năng bài tiết insulin của tế bào β đảo tụy [29], trong đó kháng insulin được coi là khiếm khuyết ban đầu hoặc là khiếm khuyết chính trong ĐTD typ 2 [15]. Kháng insulin còn là nguyên nhân gián tiếp dẫn đến suy giảm khả năng tiết insulin của tế bào β đảo tụy (do các tế bào β phải tăng tiết insulin bù trừ hiện

tượng kháng insulin). Kháng insulin có thể do rất nhiều nguyên nhân như rối loạn chức năng dẫn truyền thần kinh trung ương, tăng glucagon, ... nhưng nguyên nhân chính dẫn đến tăng biểu hiện của các yếu tố gây kháng insulin là do di truyền hoặc do mắc phải, trong đó chế độ ăn giàu chất béo, giàu đường dẫn đến thừa cân, béo phì (đặc biệt béo phì khu vực trung tâm) là nguyên nhân quan trọng nhất [6], [10].

Béo phì có liên quan đến kháng insulin và là một trong những đặc điểm chính của bệnh ĐTĐ typ 2. Cơ chế chủ yếu là do giải phóng các acid béo tự do và sau đó là các cytokine viêm từ mô mỡ. Các nghiên cứu đã chỉ ra rõ ràng rằng những người bị béo phì, bệnh ĐTĐ typ 2 và bệnh ĐTĐ typ 2 kèm béo phì đều có nồng độ acid béo tự do trong huyết tương tăng cao. Không chỉ mức acid béo tự do trong huyết tương tăng cao ở bệnh béo phì; mà tổng lượng acid béo tự do cũng tăng lên. Tăng tổng lượng acid béo tự do chủ yếu là do tăng phân giải lipid (lipolysis) từ các mô mỡ, để chống lại tác dụng ức chế thoái hóa lipid và làm tăng nhạy cảm với các hormone phân giải lipid của insulin. Rất nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng mối liên kết quan trọng giữa bệnh béo phì, kháng insulin và ĐTĐ typ 2 chính là các acid béo tự do. Chính sự gia tăng lượng acid béo tự do trong huyết tương đã làm giảm hoạt động của insulin và là yếu tố nguy cơ cho sự phát triển bệnh ĐTĐ typ 2 [155], [156].

Ở bệnh nhân béo phì, hình thái và chức năng tế bào mỡ đều thay đổi, tế bào mỡ trở nên kém nhạy cảm với insulin. Tác dụng ức chế thoái hóa lipid của insulin bị giảm sút cùng với một số thay đổi khác dẫn đến tăng nồng độ acid béo tự do. Ngoài ra, các tế bào mỡ còn tiết ra các adipokin, các yếu tố này ảnh hưởng đến chuyển hóa glucose, chuyển hóa lipid, sự bài tiết và tác dụng của insulin. Cụ thể về 3 con đường phân tử liên quan trực tiếp đến phát triển kháng insulin ở bệnh nhân béo phì đã được trình bày trong phần tổng quan (trang 12- 15).

Vì thế, gần đây các nhà khoa học đã phát triển mô hình ĐTĐ typ 2 mới

bằng cách kết hợp chế độ ăn giàu chất béo với tiêm STZ liều thấp trên động vật thực nghiệm. Mô hình này có cơ chế gần giống với cơ chế bệnh sinh của phần lớn bệnh nhân ĐTĐ typ 2 (do 85% bệnh nhân ĐTĐ typ 2 thừa cân, béo phì và có sự tích lũy quá mức các chất béo trong cơ thể, đặc biệt vùng bụng [157]). Mô hình này cũng đã mô phỏng được diễn biến của bệnh ĐTĐ typ 2 ở người với các biểu hiện đặc trưng như béo phì, tăng glucose máu, tăng insulin nhẹ hoặc bình thường, tăng cholesterol và triglycerid máu, ...[158]. Chuột gây béo phì bằng phương pháp này có nhiều đặc điểm giống với béo phì ở người như tăng kháng insulin, tăng leptin ngoại vi và trung tâm, làm mất biểu hiện của các adipokin (đặc biệt adiponectin và resistin), tăng biểu hiện mRNA của GLUT₂ và α -glucosidase [158].

Nguyên tắc tiến hành cơ bản là cho chuột ăn chế độ ăn giàu chất béo (thành phần chất béo chiếm khoảng 40-60% calo) trong thời gian dài (1-2 tháng) để gây tình trạng kháng insulin, sau đó gây viêm đảo tụy bằng tiêm STZ liều thấp. Bằng cách đó gây tăng glucose máu mạn tính và tiến triển ĐTĐ typ 2 tương tự ở người.

Ưu điểm: Bất chước tiến triển tự nhiên, tạo ra kháng insulin với những biểu hiện tương tự người: tăng lipid máu, insulin máu lúc đầu tăng sau đó giảm dần, glucose máu tăng cao, thay đổi biểu thị 1 số gen quan trọng trong chuyển hóa: adiponectin, leptin, PPAR γ , UCP2. Hơn nữa STZ liều thấp ít gây tác dụng độc hại trên các cơ quan khác. Thời gian động vật bị bệnh kéo dài và ổn định do đó thích hợp để nghiên cứu các thuốc đòi hỏi thời gian dài. Giá trị kinh tế cao, sử dụng rộng rãi hơn mô hình ĐTĐ do di truyền.

Nhược điểm: Thời gian nuôi kéo dài để đạt được tình trạng kháng insulin. Cần khảo sát để có mức liều STZ phù hợp với động vật nghiên cứu.

Tại Việt Nam, nhiều tác giả đã áp dụng mô hình gây ĐTĐ typ 2 trên động vật thực nghiệm bằng cách kết hợp chế độ ăn giàu chất béo với tiêm STZ

liều thấp theo mô hình của Srinivasan như Bùi Thị Quỳnh Nhung [56], Đỗ Thị Nguyệt Quế [47], hay Nguyễn Thị Thanh Hà [159].... Theo Srinivasan khi cho chuột công ăn chế độ ăn 58% chất béo trong 2 tuần, kết hợp với STZ liều 35 mg/kg đã làm tăng trọng lượng, tăng glucose, triglycerid, và cholesterol máu một cách rõ rệt so với nhóm chứng [149]. Tuy nhiên tỷ lệ chất béo trong khẩu phần ăn, thời gian nuôi béo, liều STZ gây tổn thương tế bào β bao nhiêu là tối ưu, vẫn còn là câu hỏi còn chưa được thống nhất giữa các nghiên cứu.

Bùi Thị Quỳnh Nhung [56] đã nghiên cứu hoàn thiện mô hình gây ĐTĐ typ 2 trên chuột cống trắng với khẩu phần ăn chứa 40% lipid trong 10 tuần, kết hợp tiêm STZ 50 mg/kg. Kết quả đã làm tăng rõ rệt trọng lượng chuột (67,7 - 72,6%), glucose máu (60%), cholesterol toàn phần máu (25,9%) và triglycerid máu (33%) tương tự như nghiên cứu của Srinivasan [149].

Nguyễn Thị Thanh Hà [159] đã áp dụng có cải tiến mô hình của Srinivasan trên chuột nhắt trắng. Chuột được nuôi trong 9 tuần bằng chế độ ăn giàu chất béo (chứa ~ 40% lipid) và bổ sung siro fructose 55% vào khẩu phần ăn của chuột dựa theo mô hình của Rivera [150]. Tác giả cũng lý giải rằng tỷ lệ 58% lipid trong khẩu phần ăn do Srinivasan cung cấp không phù hợp với các chủng chuột của Việt Nam, nên sau 2 tuần chuột bỏ ăn và gầy sút. Vì thế khẩu phần ăn được điều chỉnh, trong đó tỷ lệ lipid ~ 40% là phù hợp và hàm lượng fructose 55% được thêm vào tương tự như một số nghiên cứu khác bổ sung fructose 60% ([158]).

Nhiều nghiên cứu cho thấy chế độ ăn giàu fructose là một trong những nguyên nhân chính góp phần vào sự phát triển thừa cân, béo phì, kháng insulin, ĐTĐ typ 2, cũng như hội chứng chuyển hóa [158]. Fructose là một loại đường đơn được chuyển hóa chủ yếu ở gan để sinh năng lượng, sự dư thừa fructose sẽ làm tăng quá trình tổng hợp triglycerid tại gan, ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa glucose và lipid. Nồng độ triglycerid cao trong máu do chế độ ăn giàu chất

béo làm tăng số lượng và quá trình oxy hóa các acid béo tự do. Sự gia tăng quá trình oxy hóa các acid béo làm giảm quá trình oxy hóa glucose, giảm sự thu nhận và sử dụng glucose ở cơ vân dẫn đến tình trạng kháng insulin [150]. Các nghiên cứu đều nhận định: mô hình kết hợp giữa chế độ ăn giàu chất béo và hàm lượng fructose cao sẽ làm gia tăng tình trạng béo phì và kháng insulin, ngoài ra gây xơ gan, gây viêm, stress lưới nội bào, rối loạn chức năng nội mô và lipoapoptosis. Trong khi viêm chỉ ở mức tối thiểu và không thấy xơ hóa gan ở động vật ăn nhiều chất béo đơn thuần [158]. Dữ liệu từ các nghiên cứu này gợi ý sự kết hợp giữa chế độ ăn giàu chất béo và hàm lượng fructose cao phù hợp để gây tình trạng kháng insulin.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hà cho thấy: sau khi ăn chế độ ăn 40% lipid + 55% fructose trong 9 tuần, cân nặng của chuột nhắt đã tăng 123,43% so với trước nghiên cứu và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với lô chuột ăn chế độ ăn bình thường ($p < 0,05$). Sau 2 tuần tiêm STZ liều 100mg/kg, nồng độ glucose máu, nồng độ cholesterol, triglycerid, LDL-C của lô chuột ĐTD typ 2 vẫn tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học [159]. Sau khi so sánh và nhận thấy kết quả này cũng tương tự như kết quả từ các nghiên cứu khác [158], Nguyễn Thị Thanh Hà khẳng định đã áp dụng thành công mô hình của Srinivasan và Rivera trên chuột nhắt trắng, đã tạo ra được mô hình chuột nhắt béo phì, kháng insulin và tăng glucose máu, có đặc điểm giống với cơ chế bệnh sinh của bệnh ĐTD typ 2 ở người, có thể áp dụng mô hình này cho việc nghiên cứu các thuốc điều trị ĐTD typ 2 ở Việt Nam.

Thiếu sót của mô hình này như tác giả ghi nhận là đã không định lượng nồng độ insulin máu để khẳng định tình trạng kháng insulin trên chuột gây béo phì bằng chế độ ăn, do những khó khăn về kinh phí. Tác giả Đỗ Thị Nguyệt Quế [47] đã khắc phục thiếu sót này khi gây mô hình ĐTD typ 2 trên chuột cống trắng bằng chế độ ăn giàu chất béo (30,22% lipid) trong 10 tuần, sau đó

tiêm STZ liều 50 mg/kg cân nặng chuột cống. Bên cạnh việc định lượng nồng độ glucose máu, nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid huyết thanh, tác giả cũng đánh giá mức độ kháng insulin của chuột thông qua việc định lượng insulin huyết thanh và đánh giá trực tiếp mức kháng insulin của chuột cống thực nghiệm qua thí nghiệm “kẹp insulin đẳng glucose”.

Qua nghiên cứu và tiến hành thử nghiệm, chúng tôi cũng nhận thấy mô hình gây ĐTĐ typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo là phù hợp cho việc sàng lọc tác dụng dược lý của các thuốc chống ĐTĐ typ 2 mới được phát triển, thực phẩm chức năng và các dược liệu có nguồn gốc tự nhiên trong điều kiện Việt nam. Do đó chúng tôi cũng áp dụng mô hình này trong nghiên cứu của mình. Chuột nhắt trắng chủng Swiss được nuôi bằng chế độ ăn chứa 42,89% chất béo no, siro fructose 55% được trộn thêm trong thức ăn (bảng 2.1). Sau 8 tuần liên tục ăn chế độ ăn giàu chất béo, chuột được tiêm STZ liều 100mg/kg cân nặng chuột nhắt. Liều STZ được sử dụng để kết hợp cùng chế độ ăn béo gây mô hình ĐTĐ typ 2 cũng rất khác nhau giữa các nghiên cứu, liều này phụ thuộc vào chế độ ăn và sự đáp ứng của từng chủng chuột [158]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn liều STZ 100mg/kg, tương tự liều STZ mà một số tác giả trong nước đã thực hiện trên cùng chủng chuột ở Việt Nam. Đó là các nghiên cứu của Bùi Thị Quỳnh Nhung [56] và Đỗ Thị Nguyệt Quế [47] nghiên cứu trên chuột cống trắng, sử dụng STZ liều 50 mg/kg và Nguyễn Thị Thanh Hà [159] nghiên cứu trên chuột nhắt trắng, sử dụng liều STZ 100 mg/kg (cũng tương đương liều 50 mg/kg trên chuột cống). Liều này cũng đã được chứng minh là liều không gây ĐTĐ mà chỉ tạo ra tình trạng tiền ĐTĐ, hay còn gọi là rối loạn bài tiết insulin của tuyến tụy [46], [66], [143]. Chính vì thế khi kết hợp chế độ ăn béo phì gây kháng insulin với tiêm STZ liều thấp đã tạo ra được mô hình chuột ĐTĐ typ 2 trên thực nghiệm. Những kết quả nghiên cứu sau sẽ thể hiện rõ hơn hiệu quả của mô hình:

♦ *Kết quả sự thay đổi cân nặng chuột.*

Kết quả bảng 3.8 cho thấy: Lô chuột ăn thức ăn giàu chất béo (chế độ ăn 40% năng lượng là lipid + 55% fructose) có mức tăng cân cao hơn rõ rệt so lô chứng sinh học tại cùng thời điểm. Cụ thể mức tăng cân sau 4 tuần, 6 tuần và 8 tuần của chuột ở lô ăn béo lần lượt là 42,5%; 64,4% và 85,8%, đều tăng gấp 1,3 lần lô chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$). Kết quả này tương tự nghiên cứu của Bùi Thị Quỳnh Nhung [56] trên chuột cống trắng, sau 10 tuần trọng lượng chuột ở lô ăn béo tăng 67,7 - 72,6%, còn Nguyễn Thị Thanh Hà nuôi chuột nhắt trắng trong 9 tuần thấy trọng lượng chuột ở lô ăn béo tăng 123,43%, cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên sau 8 tuần nuôi béo chuột nhắt trong thí nghiệm của chúng tôi đã đạt đến cân nặng trung bình là 48,47 g (bảng 3.8) gần tương đương trọng lượng của chuột nuôi béo 9 tuần trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hà là 51,05 g [159]. Một báo cáo tổng quan đã nhận định: hầu hết các mô hình kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo đều được phát triển trong giai đoạn từ 4 - 12 tuần, để tạo ra sự đề kháng insulin tương tự như cơ chế bệnh sinh ở người [158]. Do đó, chúng tôi rút ngắn thời gian gây mô hình xuống 8 tuần, ngắn hơn tương đối so với các mô hình khác và nhìn nhận, đánh giá các kết quả đạt được của mô hình như sau:

♦ *Kết quả định lượng nồng độ glucose máu.*

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng chế độ ăn giàu chất béo làm tăng tính kháng insulin nhưng không gây tăng glucose máu hoặc gây ĐTĐ [66], [149]. Điều này cũng phù hợp với thực tế lâm sàng là không phải bệnh nhân béo phì nào cũng mắc ĐTĐ typ 2. Do đó để gây ĐTĐ typ 2 cho chuột, sau khi gây kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo cần sử dụng thêm một tác nhân gây tổn thương nhẹ tế bào β đảo tụy, làm giảm khả năng tiết insulin của các tế bào này và STZ liều thấp là một tác nhân như thế.

Theo kết quả từ bảng 3.9: nồng độ glucose máu của chuột ở lô ăn thức

ăn giàu chất béo trong 8 tuần có xu hướng tăng so với nồng độ glucose máu của chuột ăn thức ăn bình thường (tăng 13,7%), nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 72 giờ tiêm STZ liều 100 mg/kg, nồng độ glucose máu ở lô ăn béo đã tăng cao rõ rệt là 17,09 mmol/l, tăng 207,4% so với trước nghiên cứu ($p < 0,001$) và so với lô chứng ($p < 0,001$). Như vậy, sau khi nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo, chỉ cần dùng liều STZ thấp (100 mg/kg chuột nhất) đã gây được tình trạng tăng glucose máu tương tự với đặc điểm giai đoạn sau của ĐTĐ typ 2.

Còn ở bảng 3.10 cho thấy: trên chuột gây ĐTĐ typ 2, gliclazid liều 80 mg/kg, đã làm hạ glucose máu rõ rệt so với lô chứng bệnh (chuột ĐTĐ uống nước cất), mức hạ trong khoảng 22,9 % - 24,8 % ($p < 0,01$). Gliclazid là một sulfonyleurea có tác dụng kích thích tuyến tụy bài tiết insulin, được sử dụng làm chứng dương trong thí nghiệm này, đã chứng tỏ với liều STZ 100 mg/kg tụy chuột mới chỉ bị phá hủy một phần, vẫn còn khả năng đáp ứng với các kích thích tiết insulin.

♦ *Kết quả định lượng một số chỉ số lipid máu.*

Kết quả trình bày tại bảng 3.11 cho thấy: các chuột lô chứng bệnh có chế độ ăn giàu chất béo trong 8 tuần kết hợp tiêm STZ liều 100 mg/kg đã bị ĐTĐ typ 2, biểu hiện tình trạng rối loạn lipid máu rất rõ rệt: nồng độ cholesterol toàn phần, triglyceride huyết thanh và các chỉ số HLD-C, LDL-C đều tăng cao so với chuột ăn chế độ ăn bình thường ($p < 0,001$).

Để khẳng định thêm về mô hình gây ĐTĐ typ 2, chúng tôi tiến hành mổ chuột lấy gan và tụy vào thời điểm 2 tuần sau tiêm STZ, quan sát đánh giá tổn thương đại thể và làm giải phẫu vi thể.

♦ *Kết quả sự thay đổi mô bệnh học gan chuột.*

Quan sát đại thể gan chuột ở các lô, dễ dàng nhận thấy gan chuột ĐTĐ có màu bạc hơn, không đồng đều về màu sắc và mật độ mô có phần lỏng lẻo

so với lô chứng sinh học (hình 3.3). Khi cân gan chuột cũng nhận thấy gan chuột ĐTĐ typ 2 nặng hơn 23,5 % so với gan chuột bình thường (bảng 3.12). Cân nặng gan tăng lên có thể do chế độ ăn béo phì gây tình trạng gan nhiễm mỡ. Kết quả giải phẫu bệnh vi thể đã chứng minh nhận định trên là đúng. Ở lô chứng bệnh 1/3 mẫu bệnh phẩm quan sát có tình trạng thoái hóa mỡ vừa: tế bào gan tăng kích thước, sưng phồng, bào tương tế bào có hốc sáng không đều và 2/3 mẫu bệnh phẩm có hiện tượng thoái hóa mỡ nhẹ: bào tương có các hốc sáng nhỏ được so sánh với lô chứng sinh học có 100% mẫu bệnh phẩm gan bình thường (bảng 3.14). Kết quả này khá giống kết quả của Nguyễn Thị Thanh Hà [159], tuy nhiên theo tác giả báo cáo: 100% mẫu bệnh phẩm gan của lô chứng bệnh đều có hiện tượng thoái hóa mỡ nặng nề, có thể do thời gian nuôi béo dài hơn dẫn đến tình trạng nhiễm mỡ nặng nề hơn. Rất tiếc, chúng tôi chưa đánh giá được phần trăm nhiễm mỡ của gan. Gan nhiễm mỡ trong mô hình ĐTĐ typ 2 là hậu quả của chế độ ăn giàu chất béo và của sự đề kháng insulin dẫn đến tình trạng tăng triglycerid cao. Đây cũng là một đặc điểm hay gặp trên bệnh nhân ĐTĐ typ 2 béo phì.

♦ *Kết quả sự thay đổi mô bệnh học tụy chuột.*

Quan sát đại thể cũng như khi cân tụy đều cho thấy trọng lượng tụy ở lô chứng bệnh và lô chứng sinh học (bảng 3.13) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy có thể thấy tiêm STZ liều thấp 100mg/kg đã không gây tổn thương tụy nặng nề như ĐTĐ typ 1. Nhưng kết quả giải phẫu bệnh vi thể lô chứng bệnh cho thấy: 100% mẫu bệnh phẩm tụy bị thoái hóa, mật độ đảo tụy giảm, đảo tụy biến dạng, giảm kích thước, tế bào đảo tụy thoái hóa, teo lại được so sánh với lô chứng sinh học: 100% mẫu bệnh phẩm có cấu trúc bình thường (bảng 3.15). Tuy nhiên, phương pháp nhuộm sử dụng trong nghiên cứu này chưa thể phân biệt cụ thể các tế bào β và α , nên chưa đánh giá được mức độ tổn thương đặc hiệu lên tế bào β của mô hình. Kết quả này phù

hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác [66], [159] cũng như phù hợp với hình ảnh vi thể tụy của bệnh nhân ĐTĐ typ 2 trên lâm sàng: các tiểu đảo tụy biến dạng và phân bố lộn xộn, số lượng tế bào β giảm, thay vào đó là sự xâm lấn của các đám amyloid.

Kết luận: Như vậy bằng chế độ ăn giàu chất béo trong 8 tuần kết hợp với tiêm STZ liều 100mg/kg, chúng tôi đã gây được mô hình ĐTĐ typ 2 trên chuột nhắt trắng. Chuột có các đặc điểm béo phì, kháng insulin, nồng độ glucose máu tăng, rối loạn lipid máu, có tổn thương vi thể là thoái hóa mỡ tế bào gan và thoái hóa đảo tụy, phù hợp để đánh giá tác dụng dược lý của các chế phẩm thử.

4.2.2.2. Tác dụng hạ glucose máu của Andiabet trên chuột nhắt trắng gây đái tháo đường typ 2

Trên chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2, sau 1 tuần uống thuốc thử, Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày và liều 2 g/kg/ngày đã gây hạ glucose máu lần lượt 23,9% và 35,6% so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Sau 2 tuần uống thuốc thử, Andiabet liều 1 g và 2 g/kg/ ngày có tác dụng hạ glucose máu tối đa ~36% so với lô chứng bệnh, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ (bảng 3.10) và cao hơn mức hạ glucose máu của gliclazid 80 mg/kg/ngày. Gliclazid là thuốc kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin để làm giảm nồng độ glucose máu: sau 1 tuần mức hạ là 22,9% và sau 2 tuần mức hạ là 24,8%, sự khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$ và $p < 0,01$).

Andiabet liều 1g/kg/ngày là liều trung gian mới được bổ sung trong thí nghiệm này vì: khi thử tác dụng hạ glucose máu trên chuột nhắt trắng bình thường, chúng tôi đã sử dụng 2 mức liều: Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày là liều tương đương liều có tác dụng trên lâm sàng và Andiabet liều 2 g/kg/ngày là liều gấp 3 lần liều có tác dụng trên lâm sàng, nhưng kết quả từ bảng 3.10 cho thấy Andiabet cả 2 mức liều đều thể hiện tác dụng hạ glucose máu kém trên chuột nhắt trắng bình thường, trong đó Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày gây hạ glucose

máu là 14,3% sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Mặt khác, kết quả nghiên cứu về độc tính cấp cho biết liều dung nạp tối đa của Andiabet là 44,25 g/kg và liều Andiabet được đề xuất uống thử trên người từ 0,45 g/kg – 4,4 g/kg/ngày (trong khoảng 1/100-1/10 liều dung nạp tối đa). Hàm lượng dược chất có trong 01 viên nang cứng Andiabet là 533mg (gồm 200 mg Bàng lãg nước, 200 mg Giảo cổ lam và 133 mg Tri mẫu). Suy ra liều dùng tối đa trên người là 8 viên/ngày, ngoại suy ra liều trên chuột nhắt trắng là 1g/kg/ngày (tính hệ số ngoại suy trên chuột nhắt là 12 và người trưởng thành khoảng 50 kg). Điều đáng chú ý ở đây là Andiabet liều 1g/kg/ngày không thể hiện rõ tác dụng hạ glucose máu sau 1 tuần uống chế phẩm thử, nhưng sau 2 tuần lại gây hạ glucose máu rất tốt, mức hạ tới 35,6% với $p < 0,01$ so với lô chứng bệnh. Mặc dù đã rà soát, kiểm tra, loại bỏ các sai số có thể gặp trong nghiên cứu, nhưng chúng tôi cũng chưa lý giải được vì sao Andiabet liều 1g/kg/ngày sau 1 tuần chưa thể hiện tác dụng hạ glucose máu rõ mà sau 2 tuần uống chế phẩm thử lại biểu hiện tác dụng hạ glucose máu rất tốt.

Trên thực tế, đối với bệnh nhân ĐTD typ 2 có rối loạn tiết insulin, kháng insulin và rối loạn chuyển hóa lipid thì để cải thiện tình trạng này bệnh nhân thường phải dùng thuốc trong thời gian dài. Bên cạnh đó các thuốc có nguồn gốc thảo dược cũng thể hiện tác dụng chậm hơn so với các thuốc có nguồn gốc tổng hợp hóa dược. Nhưng đối với chuột gây ĐTD bằng STZ, nồng độ glucose máu thường chỉ ổn định sau khi tiêm STZ 72 giờ và kéo dài trong khoảng 10 - 14 ngày sau đó [54], có nghiên cứu cho rằng thời gian này chỉ từ 8 - 10 ngày. Đây cũng là thời gian thích hợp để thử tác dụng dược lý của thuốc [54]. Vì thế, trong nghiên cứu này thời gian lựa chọn cho chuột uống chế phẩm thử Andiabet là 2 tuần. Có thể do STZ 100mg/kg chỉ gây tổn thương nhẹ đảo tụy nên sau thời gian 2 tuần này tụy chuột có khả năng phục hồi và điều chỉnh lại nồng độ glucose máu. Từ kết quả của nghiên cứu này, nhận thấy Andiabet liều 1g/kg/ngày có tác

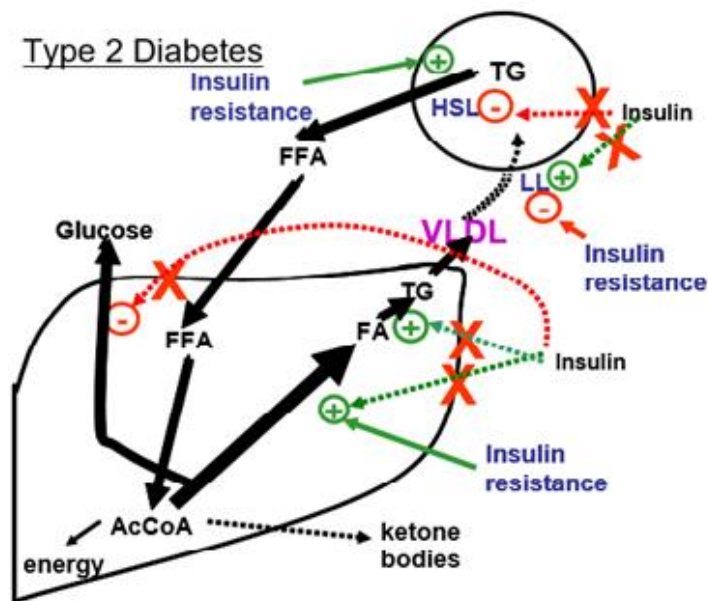
dụng hạ glucose máu tốt hơn liều 0,68 g/kg/ngày sau 2 tuần điều trị nên chúng tôi lựa chọn 2 mức liều 1g/kg/ngày và 2g/kg/ngày cho thí nghiệm tiếp theo.

Mức hạ glucose máu trong nghiên cứu này tương đương mức hạ glucose máu của Giáo cổ lam liều 1000 mg/kg/ngày trong nghiên cứu của Đào Văn Phan [136]. Trong nghiên cứu của Phùng Thanh Hương, dịch chiết lá Bằng lăng nước liều 10 g/kg/ngày, cho chuột cống ĐTĐ typ 2 uống liên tục trong 20 ngày đã làm hạ glucose máu ~ 20% so với lô chứng ($p < 0,05$) [66]. Còn Hong H cho biết dịch chiết lá Bằng lăng nước chứa 1% acid corosolic, sau khi cho chuột nhắt ĐTĐ typ 2 tự phát chủng C57BLKsJ uống trong 4 tuần đã làm hạ glucose máu 26% [4]. Còn Phạm Hữu Điền nhận thấy Giáo cổ lam liều 500mg/kg/ngày và liều 1000mg/kg/ngày có tác dụng hạ glucose máu trên chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2, mức hạ tương ứng là 22% và 36% [146]. Nguyễn Trọng Thông nghiên cứu Vinabetes (gồm GCL+ BLN+TM) trên chuột cống trắng gây ĐTĐ typ 2, liều 3 g/kg/ngày trong 2 tuần, cho kết quả nồng độ glucose máu giảm 44% [49]. Vinabetes có cùng công thức kết hợp, nhưng lại có tác dụng hạ glucose máu mạnh hơn Andiabet có thể do: (1) liều cao hơn: Vinabetes liều 3 g/kg/ngày trên chuột cống trắng tương đương liều 6 g/kg/ngày trên chuột nhắt trắng, tức là gấp 6-7 lần liều dùng trên lâm sàng của Andiabet. (2) dạng bào chế khác: Vinabetes là dạng cao nước bào chế trong phòng thí nghiệm, còn Andiabet là dạng viên nang cứng bào chế theo quy trình công nghiệp; (3) đáp ứng trên chuột cống khác với đáp ứng trên chuột nhắt. Như vậy Andiabet (dạng kết hợp của 3 loại dược liệu GCL, BLN và TM) có tác dụng hạ glucose máu cao hơn và liều thấp hơn so với dùng riêng rẽ từng dược liệu.

4.2.2.3. Tác dụng hạ lipid máu của Andiabet trên chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2.

Bình thường insulin có vai trò hoạt hóa enzyme lipoprotein lipase chuyển VLDL-C thành các acid béo dự trữ trong mô mỡ. Mặt khác, insulin cũng ức

chế sự thủy phân chất béo trong mô mỡ, do ức chế enzyme lipase nội bào (HSL: Hormon-sensitive lipase) xúc tác phản ứng thủy phân triglycerides, nên làm giảm lượng acid béo tự do trong huyết thanh [10], [155]. Vì vậy, ở bệnh nhân ĐTD typ 2 có sự thiếu hụt insulin và kháng insulin, dẫn đến giảm hoạt động của enzyme lipoprotein lipase (LL) trong mô mỡ (và cơ), kết quả là giảm sự phân hủy lipoprotein, làm tăng nồng độ VLDL-C. Đồng thời, do các tế bào mỡ kháng insulin, tức là kháng lại tác dụng ức chế thủy phân lipid của insulin; sự kháng này làm enzym lipase (HSL) được hoạt hóa, tăng phân giải chất béo dẫn đến làm tăng nồng độ các acid béo tự do và glycerol trong huyết thanh. Do đó, các acid béo tự do cạnh tranh với glucose để đi vào các quá trình β oxi hoá, gây ra tích tụ acetyl CoA. Acetyl CoA không đi vào chu trình tricarboxylic mà được chuyển thành cholesterol và thể ceton. Đồng thời khi lượng acid béo tự do tại gan tăng cao, chúng được este hóa thành triglycerides và phospholipids và được tiết ra dưới dạng các lipoprotein mật độ rất thấp (VLDL-C) hoặc thể ceton. Như vậy, tăng triglycerid rõ rệt, kèm theo giảm HDL-C có liên quan đến chứng béo phì, xảy ra ở nhiều bệnh nhân ĐTD typ 2 (hình 4.1) [156], [160].



Hình 4.1. Rối loạn chuyển hóa trong bệnh ĐTD typ 2 [160]

Tóm lại, rối loạn chuyển hóa lipid đặc trưng trong ĐTĐ typ 2 là tăng tổng hợp acid béo và triglycerid trong gan, tăng cholesterol toàn phần, giảm HDL-C và xuất hiện các phân tử VLDL-C nặng và nhỏ trong huyết tương. Thực tế trong nghiên cứu này, bằng chế độ ăn giàu chất béo kết hợp tiêm STZ liều thấp chúng tôi đã tạo ra những chuột ĐTĐ typ 2 có rối loạn lipid rõ để đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm thử Andiabet trên mô hình đó. Bảng 3.10 cho thấy: chuột lô chứng bệnh có nồng độ cholesterol, triglyceride và LDL-C huyết thanh tăng cao rõ rệt ($p < 0,001$) so với lô chứng sinh học (chuột ăn chế độ bình thường, không tiêm STZ). Trong cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 2, có sự tương quan đáng kể giữa kháng insulin với khả năng thu nạp glucose, nồng độ insulin huyết thanh, tốc độ bài tiết VLDL-triglyceride và nồng độ triglyceride huyết thanh [156]. Do đó, những thuốc điều trị ĐTĐ typ 2 nào có tác dụng điều chỉnh các rối loạn lipid, sẽ góp phần giảm tính kháng insulin, giảm nồng độ glucose máu, nâng cao hiệu quả điều trị ĐTĐ.

Nghiên cứu này cũng nhận thấy: sau khi uống liên tục 2 tuần Andiabet ở tất cả các mức liều đã làm hạ nồng độ LDL-C và làm tăng nồng độ HDL-C một cách rõ rệt so với lô chứng bệnh, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,001$), trong khi đó lô uống gliclazid 80mg/kg/ngày không làm thay đổi nồng độ LDL-C và HDL-C so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$). Ngoài ra, Andiabet liều 2g/kg/ngày uống liên tục trong 2 tuần đã làm giảm nồng độ cholesterol toàn phần là 16,1% và nồng độ triglycerid huyết thanh là 30,3% so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$) (bảng 3.10). nhưng Andiabet liều thấp 0,68 và 1 g/kg/ngày chưa làm hạ nồng độ cholesterol toàn phần và triglycerid huyết thanh có ý nghĩa sau 2 tuần điều trị. Có thể lý giải là thời gian cho chuột uống chế phẩm thử còn ngắn. Vinabetes (dạng cao mềm, có cùng công thức kết hợp như Andiabet) sau 2 tuần uống thuốc liên tục cũng chưa thể hiện được tác dụng hạ lipid máu [48]. Ngay cả những thuốc y học hiện đại điều trị rối loạn lipid máu hiệu quả như

nhóm Statin cũng cần thời gian tối thiểu 4 tuần mới thể hiện tác dụng [161]. Chính vì thế, khi nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu của từng loại dược liệu, trên động vật thực nghiệm, các tác giả cũng thiết kế thời gian điều trị tương đối dài: Suzuki và CS cho chuột nhắt cái béo phì KK-Ay/Ta Jcl ăn thức ăn chứa 5% dịch chiết nước lá Bằng lăng nước trong 12 tuần [162]. Kimura Y và CS đã nghiên cứu tác dụng hạ lipid máu của Giảo cổ lam trên chuột cống Wistar được nuôi bằng chế độ ăn giàu chất béo và lượng đường cao trong 7 tuần [108]. Còn Jang Y.J gây béo cho chuột cống bằng chế độ ăn giàu lipid, sau đó chuột được điều trị bằng dịch chiết toàn phần của Giảo cổ lam trong 4 tuần [122]. Giảo cổ lam cũng đã được thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân ĐTĐ typ 2, thời gian thử nghiệm trong các nghiên cứu đều kéo dài 2 tháng trở lên [108]. Kết quả thu được từ các nghiên cứu riêng rẽ trên từng loại dược liệu cũng cho thấy: Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu rẽ đều có tác dụng hạ lipid máu khá tốt, nồng độ cholesterol toàn phần, triglycerid huyết thanh và LDL giảm, HDL tăng, tương tự như kết quả trong nghiên cứu này. Những thành phần chính có hoạt tính hạ lipid máu đã được báo cáo là các saponin, còn gọi là các gypenosids trong Giảo cổ lam, acid corosolic trong Bằng lăng nước và MF trong Tri mẫu [108].

4.2.2.4. Thay đổi mô bệnh học gan, tụy chuột của viên Andiabet trên chuột nhắt đái tháo đường typ 2.

Về gan: mặc dù sau 2 tuần điều trị cân nặng gan lô uống Andiabet không giảm so với lô chứng bệnh, nhưng không thấy tổn thương về mặt đại thể (bảng 3.11; hình 3.3). Qua kết quả giải phẫu bệnh vi thể, chúng tôi nhận thấy sự biến đổi tích cực về mặt cấu trúc gan, tình trạng thoái hóa mỡ của các tế bào gan được cải thiện so với lô chứng bệnh. Lô gliclazid liều 80mg/kg thì 1/3 mẫu bệnh phẩm gan có cấu trúc gần như bình thường và 2/3 mẫu chỉ có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ. Còn ở các lô điều trị bằng Andiabet các liều 0,68; 1 và 2

g/kg/ngày các mẫu bệnh phẩm gan có tình trạng thoái hóa mỡ nhẹ và vừa, giảm hẳn so với lô chứng bệnh có 100% mẫu bệnh phẩm thoái hóa nặng (bảng 3.14). Tình trạng thoái hóa mỡ tế bào gan của các chuột lô chứng bệnh, có thể giải thích là do chuột được gây ĐTD typ 2 có kháng insulin, rối loạn lipid máu nên làm giảm thanh thải lipoprotein và tăng lượng acid béo tự do vào gan, tăng tổng hợp triglyceride. Triglycerid có thể lắng đọng ở gan gây thoái hóa mỡ và kháng insulin ở gan, lắng đọng ở cơ gây kháng insulin cơ, lắng đọng ở tế bào β của đảo tụy là nguyên nhân làm giảm khả năng tiết insulin [13]. Cải thiện được tình trạng này có thể do điều trị bằng Andiabet đã cải thiện được tình trạng kháng insulin, làm giảm nồng độ cholesterol, triglyceride huyết thanh, giảm lắng đọng triglyceride ở gan.

Về tụy: quan sát đại thể, chúng tôi không phát hiện thấy tổn thương tụy của tất cả các lô chuột. Cân nặng tụy chuột sau 2 tuần uống thuốc cũng không khác biệt so với lô chứng bệnh (bảng 3.13). Trên kết quả vi thể, cả lô uống gliclazid 80 mg/kg và lô uống Andiabet đều tương tự nhau: 1/3 mẫu bệnh phẩm có cấu trúc gần như bình thường. Còn trên tiêu bản tụy chuột uống Andiabet, các đảo tụy thoái hóa nhẹ, giảm nhẹ về mật độ và kích thước, nhưng tình trạng đảo tụy được cải thiện, không thoái hóa nặng nề và teo nhỏ như lô chứng bệnh (bảng 3.15). Như vậy có thể khẳng định tình trạng tụy bắt đầu được cải thiện so với lô chứng bệnh, tác dụng này có thể giải thích do sự cải thiện tình trạng kháng insulin, qua đó làm giảm gánh nặng cho tụy, giúp tụy dần phục hồi. Khi cấu trúc tụy phục hồi, lượng insulin sẽ tăng lên, điều chỉnh nồng độ glucose máu về trạng thái bình thường.

Như vậy, tác dụng tốt trên nồng độ glucose máu và nồng độ lipid máu của viên Andiabet đã được thể hiện chân thực qua hình ảnh đại thể và vi thể gan, tụy của các lô chuột uống Andiabet. Tóm lại, nghiên cứu này đã chứng minh được Andiabet có khả năng cải thiện các thông số sinh hóa của quá trình

chuyển hóa glucose và lipid, ngăn ngừa sự phát triển gan nhiễm mỡ ở chuột nhất gây ĐTĐ typ 2 sau 2 tuần uống Andiabet.

4.2.3. Về khả năng ức chế dung nạp glucose của viên Andiabet sau uống glucose/sucrose/ tinh bột trên chuột nhất trắng bình thường và chuột gây đái tháo đường typ 2.

4.2.3.1. Về mô hình.

Glucose ngoại sinh là một trong những nguồn quan trọng nhất cung cấp glucose cho cơ thể. Nguồn năng lượng này được cung cấp thông qua lượng glucid có chứa trong thức ăn. Thức ăn chứa glucid của người bao gồm tinh bột, glycogen, cellulose, disaccharid và các monosaccharid. Ngoại trừ cellulose, các glucid được các enzyme đặc hiệu trong dịch tiêu hóa thủy phân để tạo ra các sản phẩm cuối cùng là các monosaccharid để dễ dàng hấp thu vào máu [154]. Sau khi vào đường tiêu hóa, các polysaccharide (tinh bột) được phân cắt thành các oligosaccharid (ví dụ: sucrose, maltose, lactose) bởi các enzyme tiêu hóa trong nước bọt cùng với enzyme α -amylase của tuyến tụy tiết ra. Sau đó, các saccharide này được tiêu hóa tiếp thành các monosaccharid (ví dụ: glucose, fructose, galactose) có thể hấp thu vào máu bởi enzyme α -glucosidase trong niêm mạc ruột của niêm mạc ruột. Chỉ có glucose mới được vận chuyển tích cực qua niêm mạc ruột đi vào máu và được vận chuyển đến các tế bào biểu mô trong cơ thể. Khi nồng độ glucose máu tăng sẽ kích thích tế bào β đảo tụy tiết insulin làm tăng thu nạp glucose từ máu vào trong tế bào [163]. Ở những người mắc bệnh ĐTĐ, có sự thiếu hụt insulin và/hoặc giảm hoạt động của insulin thì khả năng kích thích dung nạp glucose từ máu vào tế bào của insulin bị suy giảm [164]. Do đó, sau một bữa ăn giàu carbohydrate thì khả năng kiểm soát đường huyết ổn định rất khó khăn vì cơ thể đã giảm đáp ứng với insulin được giải phóng ra. Điều này dẫn đến tích lũy glucose trong máu và dẫn đến tình trạng tăng glucose máu sau ăn ở bệnh nhân ĐTĐ [164].

Việc kiểm soát tăng glucose máu sau ăn có thể đạt được bằng cách tác động đến các quá trình sinh lý: (1) làm chậm quá trình tiêu hóa các carbohydrate thành các monosaccharid bằng việc ức chế các enzyme phân hủy carbohydrate. Nếu quá trình này diễn ra chậm thì sẽ làm chậm quá trình hấp thu glucose từ ruột vào máu, từ đó hạn chế sự tăng đỉnh glucose máu sau ăn. (2) tăng cường hấp thu các monosaccharid từ niêm mạc ruột vào máu nhờ các chất vận chuyển glucose tại ruột non. (3) kích thích bài tiết insulin từ tế bào β đảo tụy và tăng đáp ứng của receptor insulin làm tăng dung nạp glucose từ máu vào trong tế bào [165].

Do đó, để đánh giá khả năng kiểm soát tăng glucose máu sau ăn của viên Andibet, chúng tôi tiến hành các test dung nạp glucose, dung nạp sucrose và dung nạp tinh bột trên chuột nhắt trắng bình thường và chuột nhắt gây ĐTD typ 2. Do đặc điểm tiêu hóa và hấp thu của các glucid này tại ruột non khác nhau nên các test dung nạp glucose, sucrose, tinh bột được dùng với ý nghĩa khác nhau. Test dung nạp glucose là một test được sử dụng để đánh giá sự đáp ứng của receptor insulin với sự tăng glucose ngoại sinh, gián tiếp đánh giá tình trạng kháng insulin [166]. Test này thường được sử dụng trên lâm sàng và trong các nghiên cứu để chẩn đoán bệnh đái tháo đường, đánh giá tình trạng kháng insulin, suy giảm chức năng của tế bào β đảo tụy. Đặc biệt đây là test duy nhất được dùng để xác định được tình trạng rối loạn dung nạp glucose [167]. Khác với glucose, tinh bột dưới tác dụng của enzyme α -amylase sẽ bị thủy phân thành các oligosaccharid, sau đó nhờ enzyme α -glucosidase, các oligosaccharid mà chủ yếu là các disaccharid sẽ bị thủy phân đến sản phẩm cuối cùng có thể hấp thu được là các monosaccharid. Sau đó các monosaccharid này được hấp thu sẽ làm tăng nồng độ glucose máu sau ăn. Người ta đã chứng minh rằng hoạt động của α -amylase tuyến tụy ở trong ruột non tương quan với sự gia tăng nồng độ glucose sau bữa ăn. Do đó làm chậm quá trình tiêu hóa tinh bột bằng cách

ức chế các enzym như α -amylase sẽ đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát bệnh ĐTĐ. Vì vậy, test dung nạp tinh bột được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử lên hoạt động của enzyme α -amylase và α -glucosidase do vai trò tiêu hóa tinh bột của 2 enzyme này. Đường sucrose cũng là một disaccharid, dưới tác dụng của enzym α -glucosidase (sucrase) sẽ bị thủy phân thành glucose và fructose. Vì thế, ức chế enzym α -glucosidase sẽ làm giảm hấp thu glucose, làm giảm nồng độ glucose máu sau ăn. Nên test dung nạp sucrose được dùng để đánh giá sự ảnh hưởng của thuốc thử lên enzyme α -glucosidase do vai trò tiêu hóa sucrose của enzyme này tại ruột non.

Dựa trên cơ sở thuốc có tác dụng ức chế hấp thu glucose sau ăn sẽ làm hạ glucose máu so với lô chứng, để đánh giá khả năng ức chế tăng glucose máu sau ăn của viên andiabet, chúng tôi đã thực hiện đồng thời cả 3 test dung nạp glucose, sucrose và tinh bột theo đường uống trên chuột nhắt trắng bình thường và chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2. Mô hình này đến nay chưa được triển khai tại các phòng thí nghiệm trong nước.

Trong nghiên cứu này, bên cạnh việc so sánh với lô chứng trắng (ở nhóm chuột bình thường) và lô chứng bệnh (ở nhóm chuột gây ĐTĐ typ 2) chỉ uống nước cất, chúng tôi đã chọn 2 thuốc để làm đối chứng (chứng dương) là acarbose 14 mg/kg/ngày và metformin 250mg/kg/ngày.

Acarbose là một tetrasacharide chống đái tháo đường, với cơ chế tác dụng ức chế enzym α -glucosidase ở tế bào biểu mô niêm mạc ruột non làm chậm tiêu hóa và hấp thu carbohydrate, đặc biệt là sucrose. Kết quả là glucose máu tăng chậm hơn sau khi ăn, giảm nguy cơ tăng glucose máu mà không kích thích bài tiết insulin ở người ĐTĐ không phụ thuộc insulin [168]. Với cơ chế tác dụng như vậy và dựa trên nhiều nghiên cứu khác nhau, acarbose với mức liều 14 mg/kg/ngày phù hợp để được lựa chọn làm thuốc đối chứng trong nghiên cứu để đánh giá khả năng ức chế tăng glucose máu của thuốc thử sau

khi cho chuột uống một lượng glucose, sucrose và tinh bột.

Metformin là thuốc chống tăng glucose máu (antihyperglycemia), không gây HGM (hypoglycemia) thậm chí ở liều cao, không kích thích giải phóng insulin từ tuyến tụy. Thuốc tác dụng chủ yếu ngoài tụy. Thuốc làm tăng nhạy cảm insulin ở gan và các mô ngoại vi (cơ xương, tế bào mỡ), làm giảm nồng độ glucose máu cả lúc đói và sau bữa ăn. Metformin làm giảm sản xuất 25-40% glucose ở những bệnh nhân ĐTD typ 2 do làm giảm tân tạo glucose ở gan. Mặc dù ức chế quá trình tân tạo glucose được xem là vai trò chính của metformin, nhưng các dữ liệu lâm sàng cho thấy metformin làm tăng vận chuyển glucose vào tất cả các mô trong cơ thể thông qua vai trò của insulin và tăng sử dụng glucose 20-50%. Metformin làm chậm quá trình hấp thu glucose ở ruột [27], [28]. Với cơ chế tác dụng như vậy và dựa trên nhiều nghiên cứu khác nhau, metformin liều 250 mg/kg/ngày là phù hợp, được lựa chọn làm thuốc đối chứng thứ 2 trong nghiên cứu cùng với acarbose 14mg/kg/ngày, để đánh giá khả năng ức chế tăng glucose máu của thuốc thử sau khi cho chuột uống một lượng glucose, sucrose và tinh bột.

4.2.3.2. Khả năng ức chế dung nạp glucose của *Andiabet* sau uống glucose.

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm test DNG trên chuột nhắt trắng bình thường và chuột nhắt gây ĐTD typ 2. Cơ sở của test, nghiệm pháp dung nạp glucose là khi cho 1 lượng lớn đường vào trong cơ thể, nồng độ glucose trong máu sẽ tăng lên nhanh chóng. Lúc này hệ thống điều hòa glucose máu sẽ được huy động để làm hạ glucose máu xuống. Tuyến tụy sẽ tăng bài tiết insulin, gan tăng tổng hợp glycogen và các cơ quan khác (cơ, tổ chức mỡ) tăng thu nhập glucose vào trong tế bào, để nhanh chóng hạ thấp glucose máu. Vì vậy ở những cơ thể bình thường, nồng độ glucose máu sẽ tăng cao vọt lên nhanh chóng ngay sau khi uống, đạt đỉnh glucose máu thường 30 phút sau khi uống và dần trở lại bình thường sau khi uống 120 phút. Còn ở những bệnh nhân ĐTD hoặc có rối

loạn dung nạp glucose (tiền ĐTĐ) nồng độ glucose máu sẽ tăng cao, kéo dài và sau 120 phút chưa trở lại được mức glucose máu bình thường.

Trong test dung nạp glucose, acarbose liều 14 mg/kg/ngày không ức chế đỉnh tăng glucose máu PBG và không làm giảm AUC glucose máu sau uống glucose 2 g/kg so với lô chứng ở cả 2 nhóm chuột bình thường và chuột gây ĐTĐ typ 2 ($p > 0,05$). Điều này phù hợp với cơ chế tác dụng của acarbose, không ảnh hưởng đến khả năng hấp thu glucose sau ăn của cơ thể. Acarbose đã được chứng minh là ức chế α -glucosidase trong biểu mô niêm mạc ruột non, làm giảm sự tăng glucose máu sau bữa ăn và cải thiện sự suy giảm chuyển hóa glucose mà không thúc đẩy bài tiết insulin ở bệnh nhân ĐTĐ typ 2 [28]. Trong khi đó, metformin 250 mg/kg/ngày đã ức chế đỉnh tăng glucose máu: trên chuột nhắt trắng bình thường PBG giảm 20,58% ($p < 0,05$) và trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2 thì PBG giảm 43% ($p < 0,01$), đồng thời làm giảm AUC glucose máu đến 63% so với lô chứng bệnh ($p < 0,001$) (bảng 3.16 và bảng 3.19). Tác dụng hạ glucose máu của metformin thể hiện rõ trên những chuột ĐTĐ typ 2 có nồng độ glucose máu tăng cao, metformin đã làm hạ glucose máu rõ rệt tại tất cả các thời điểm sau uống glucose so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$ và $0,001$) (hình 3.7). Còn trên chuột nhắt trắng bình thường, metformin chỉ làm hạ glucose máu ở thời điểm 30 phút so với lô chứng trắng ($p < 0,05$) mà không làm hạ glucose máu tại các thời điểm khác khi nồng độ glucose máu đã giảm (hình 3.4). Kết quả này phù hợp với cơ chế làm tăng nhạy cảm với insulin, tăng vận chuyển glucose vào trong tế bào của metformin, nên không gây hạ glucose máu ở người bình thường [27]. Đối với Andiabet liều 1g và 2g/kg, trên nhóm chuột nhắt trắng bình thường, cả 2 lô đều không ức chế đỉnh tăng glucose máu và không làm giảm AUC glucose máu sau 120 phút uống glucose 2 g/kg cân nặng so với lô chứng trắng. Nhưng Andiabet ở cả 2 mức liều có hiệu quả rõ rệt trong việc hạ đáng kể đỉnh tăng glucose máu và giảm AUC so với lô chứng bệnh,

trên nhóm chuột nhất gây ĐTĐ typ 2, tác dụng tương tự như lô metformin, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$ và $p < 0,01$) (bảng 3.19). Cụ thể hơn, trong hình 3.4 trên chuột bình thường, Andiabet liều 2 g/kg/ngày chỉ làm hạ glucose máu có ý nghĩa ở thời điểm 120 phút ($p < 0,05$). Nhưng ở hình 3.7 trên chuột ĐTĐ typ 2, cả 2 mức liều Andiabet đều làm hạ glucose máu rõ rệt ở tất cả các thời điểm, tương đồng với tác dụng của metformin. Điều này chứng tỏ Andiabet liều 1g và 2 g/kg/ngày không ảnh hưởng đến sự hấp thu glucose ở ruột trên chuột nhất bình thường không có kháng insulin và rối loạn bài tiết insulin. Như vậy, chế phẩm thử Andiabet chỉ có tác dụng cải thiện test dung nạp glucose trong điều kiện nồng độ glucose máu tăng cao, trên nhóm chuột gây ĐTĐ typ 2, chứng tỏ thuốc có tác dụng chống tăng glucose máu (antihyperglycemia), chứ không gây hạ glucose máu (hypoglycemia).

Khả năng cải thiện test dung nạp glucose của Andiabet trên chuột gây ĐTĐ typ 2 có thể được giải thích là do ít nhất 1 trong 3 khả năng sau hay cả 3 khả năng sau:

- Andiabet kích thích tế bào β tuyến tụy bài tiết insulin và/hoặc cải thiện chức năng của tế bào β .
- Andiabet làm tăng nhạy cảm mô đích với insulin, do đó tăng vận chuyển glucose vào cơ và mô mỡ, cơ chế có thể giống như của metformin.
- Andiabet làm tăng tổng hợp glycogen ở gan và/hoặc ức chế phân hủy glycogen thành glucose.

Khi nghiên cứu cơ chế tác dụng HGM của từng loại thảo dược Bằng lăng nước, Giảo Cổ Lam và Tri mẫu các tác giả cũng đã phát hiện khả năng cải thiện test dung nạp glucose sau uống của từng vị riêng rẽ trên chuột bình thường và chuột ĐTĐ và cho thấy kết quả tương đồng trong một số nghiên cứu.

Nhiều nghiên cứu cho thấy: dịch chiết nước nóng của lá Bằng lăng nước không ức chế được sự tăng glucose máu trong test DNG ở chuột cống bình

thường [81], và chuột cống ĐTĐ sau 12 ngày điều trị [74]. Acid corosolic thành phần chính có tác dụng HGM của Bằng lăng nước, khi uống liều duy nhất 10 mg/kg không ảnh hưởng đến nồng độ glucose máu ở chuột nhắt bình thường chủng ddY sau khi uống glucose 1 g/kg [82]. Nhưng trái lại, Fukushima và cộng sự (2006) cũng công bố nghiên cứu thiết kế chéo, mù đôi, tiến hành trên 31 người tình nguyện khỏe mạnh. Mỗi người được uống 1 viên nang chứa 10 mg acid corosolic hoặc placebo 5 phút trước khi tiến hành làm nghiệm pháp dung nạp glucose. Kết quả cho thấy acid corosolic làm tăng dung nạp glucose, tác dụng thể hiện rõ nhất sau 90 phút uống [103].

Còn đối với Giảo cổ lam: các nghiên cứu đều thống nhất về khả năng cải thiện test dung nạp glucose của Giảo cổ lam trên chuột ĐTĐ typ 2. Samer Megalli và cộng sự (2006) thấy dịch chiết nước 90% gypenosid từ Giảo cổ lam liều 250 mg/kg dùng theo đường uống trong 2 tháng đã cải thiện đáng kể khả năng dung nạp glucose ở chuột cống ĐTĐ béo phì Zucker so với chuột cống bình thường trong khoảng thời gian 120 phút sau uống glucose 2 g/kg [115]. Phạm Thanh Kỳ (2010) [116] nghiên cứu dịch chiết cồn toàn phần của Giảo cổ lam trên chuột gây ĐTĐ bằng STZ nhận thấy: Trong nghiệm pháp DNG ở chuột nhắt trắng, liều uống 1000 mg/kg đã ức chế sự tăng đường huyết tới 55% (sau 30 phút) và 63% (sau 60 phút) so với nhóm chứng và kết luận: ngoài cơ chế làm tăng tiết insulin, Giảo cổ lam có thể còn làm tăng nhạy cảm của mô đích với insulin. Tương tự như vậy, Hung TM và cs (2009) nghiên cứu dịch chiết ethanol của trà Giảo cổ lam sản xuất tại Việt Nam, đã gợi ý cơ chế hạ glucose máu là do ức chế PTP1B, dẫn đến làm tăng nhạy cảm insulin và do đó cải thiện test DNG [118]. K. Yassin, V.T.T.Huyền và cs (2011) nghiên cứu dịch chiết 70% ethanol của Giảo cổ lam trên chuột cống ĐTĐ typ 2 chủng GK nhận thấy: liều 1600mg/kg dịch chiết Giảo cổ lam uống liên tục trong 3 tuần có tác dụng hạ glucose máu, cải thiện test DNG, giảm lượng glycogen gan

nhưng không ảnh hưởng đến tổng hợp glycogen, gợi ý cơ chế Giáo cỏ lam làm tăng nhạy cảm với insulin của gan do ức chế tân tạo glucose [117].

Các nghiên cứu về tác dụng hạ glucose máu của Tri Mẫu cho thấy: Seihin-kanro-to (SK) là hỗn hợp thảo dược chứa thân rễ tri mẫu cũng có khả năng cải thiện test DNG ở chuột ĐTĐ di truyền KK-Ay, sau khi uống liên tục 5 tuần [135]. Mangiferin chiết xuất từ thân rễ Tri mẫu cũng cải thiện test DNG trên chuột tiền ĐTĐ [143]. Khi nghiên cứu tác dụng hạ glucose máu của 8 vị dược liệu Việt Nam, Nguyễn Khánh Hòa, Đào Văn Phan và các CS đã cho kết quả 2 vị thuốc: Giáo Cỏ Lam, Tri Mẫu liều 1000 mg/kg ức chế tăng glucose máu sau khi uống glucose liều 3g/kg trên chuột nhắt trắng bình thường [169]. Năm 2015, Zhenzhong Yang và cs đã nghiên cứu tác dụng chống ĐTĐ của hỗn hợp Xiao-Ke-An gồm có 8 loại thảo dược trong đó có dịch chiết nước của thân rễ Tri Mẫu nhận thấy hỗn hợp này có khả năng cải thiện tình trạng kháng insulin thông qua test dung nạp glucose [52].

Các kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi: Andiabet có khả năng cải thiện test DNG trên chuột có nồng độ glucose máu cao, ít thể hiện tác dụng trên chuột bình thường, gợi ý cơ chế hạ glucose máu do tăng nhạy cảm với insulin hơn là cơ chế kích thích bài tiết insulin từ tuyến tụy.

4.2.3.3. Khả năng ức chế dung nạp glucose của Andiabet sau uống sucrose.

Trong test dung nạp sucrose, trên chuột bình thường, nếu Andiabet 1g/kg chưa ngăn chặn được sự tăng glucose máu do uống sucrose liều 4 g/kg ở tất cả các thời điểm, thì sau 1 giờ Andiabet 2g/kg đã làm hạ glucose máu có ý nghĩa so lô chứng (hình 3.5). Như vậy, Andiabet liều 1g và 2 g/kg/ngày không ức chế được đỉnh tăng glucose máu trên chuột nhắt trắng bình thường, tuy nhiên sau 2 giờ uống sucrose liều 4 g/kg, lô Andiabet 2g/kg đã làm giảm AUC glucose máu có ý nghĩa thống kê so với lô chứng trắng là 10,52 % ($p < 0,05$). Trên chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2, Andiabet 1g/kg chưa ức chế được đỉnh tăng glucose máu,

tuy PBG giảm 21,34 % so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$). Chỉ có Andiabet 2g/kg ức chế được đỉnh tăng glucose máu, PBG giảm 22,98 % so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Nhưng cuối cùng cả 2 liều Andiabet đều gây hạ AUC lần lượt là 39,43% và 36,39% có ý nghĩa so với lô chứng ($p < 0,01$) (bảng 3.20). Thuốc đối chiếu acarbose 14 mg/kg/ngày thể hiện tác dụng ức chế tăng đỉnh glucose máu và làm giảm AUC glucose máu sau 2 giờ ăn sucrose liều 4 g/kg cân nặng, trên cả 2 nhóm chuột, một cách có ý nghĩa so với lô chứng. Trên chuột nhất trắng bình thường, PBG giảm 16,47 % ($p < 0,05$), AUC giảm 10,40 % ($p < 0,05$). Trên chuột gây ĐTD typ 2, PBG giảm 29,64 % ($p < 0,05$), AUC giảm 47,32 % ($p < 0,001$). Điều này khẳng định vai trò kiểm soát sự tăng nồng độ glucose máu sau ăn sucrose của acarbose với cơ chế ức chế enzyme α -glucosidase trong đường tiêu hóa. Bên cạnh đó, metformin 250mg/kg/ngày cũng làm hạ PBG 23,24% và hạ AUC 14,57% trên chuột nhất trắng bình thường ($p < 0,05$), còn trên chuột gây ĐTD typ 2 metformin làm giảm PBG 38,74 % ($p < 0,05$) và giảm mạnh AUC tới 50,52% ($p < 0,001$). Như vậy, trên chuột ĐTD typ 2, Andiabet 1g/kg chỉ gây hạ glucose máu muộn tại thời điểm 2 giờ sau uống sucrose ($p < 0,001$), nhưng Andiabet 2g/kg đã ức chế sự hấp thu glucose rõ tại tất cả các thời điểm, tác dụng tương tự như của acarbose 14mg/kg và metformin 250mg/kg/ngày (hình 3.8). Điều này thể hiện tác dụng hạ glucose máu phụ thuộc liều của Andiabet và vai trò kiểm soát sự tăng nồng độ glucose máu sau ăn sucrose của Andiabet có thể là do ức chế α -glucosidase tương tự acarbose hay làm tăng nhạy cảm giống như metformin, hay còn có cơ chế nào thêm ngoài 2 cơ chế này.

Tổng hợp kết quả từ các nghiên cứu về tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase, cải thiện test dung nạp sucrose và làm hạ glucose máu sau ăn của các dược liệu Bằng lăng nước, Giảo cổ lam và Tri mẫu cho thấy:

Dịch chiết lá Bằng lăng nước có tác dụng ức chế sucrase (nhận xét của

Suzuki Y [81]), acid corosolic uống liều duy nhất 10 mg/kg làm giảm mức glucose máu sau 60 phút uống sucrose 1 g/kg do tác dụng ức chế sự phân cắt sucrose thành monosaccarid (theo Shatoshi Takagi [82]). Hỗ trợ các nghiên cứu trong *in vivo*, các nghiên cứu trên *in vitro* cũng chứng minh dịch chiết của Bằng lăng nước cũng như acid corosolic có tác dụng ức chế α -glucosidase mạnh nhất $IC_{50} = 3.53 \mu\text{g/ml}$ [83]. Valoneaic acid dilacton: dẫn chất polyphenol trong dịch chiết aceton của lá Bằng lăng nước ức chế enzyme α -glucosidase, tác dụng ức chế phụ thuộc nồng độ hoạt chất [71].

Trong một nghiên cứu, Samer Megalli và cộng sự (2006) nhận thấy dịch chiết nước 90% gypenosid từ Giảo cổ lam liều 250 mg/kg dùng theo đường uống trong 2 tháng không ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase trong test dung nạp sucrose trên chuột cống bình thường và chuột ĐTD béo phì Zucker, mặc dù nghiên cứu sau đó trên *in vitro* đã khẳng định khả năng ức chế enzyme này của Giảo cổ lam [115]. Còn Fei Yang (2013) nghiên cứu trên *in vitro* thấy dịch chiết methanol của Giảo cổ lam có hoạt tính ức chế α -glucosidase (12,79%) tương tự như acarbose (13,26%), trong đó phân đoạn N-butanol, flavonoid có khả năng ức chế α -glucosidase mạnh hơn các saponin [120].

4.2.3.4. Khả năng ức chế dung nạp glucose của Andiabet sau uống tinh bột.

Trong test dung nạp tinh bột, trên chuột nhắt trắng bình thường, 3 lô acarbose 14mg/kg; metformin 250mg/kg và andiabet 2g/kg ức chế được đỉnh tăng glucose máu có ý nghĩa so với lô chứng trắng ($p < 0,05$), nhưng vẫn không làm thay đổi AUC glucose máu sau 2 giờ uống tinh bột 6 g/kg, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô chứng trắng ($p > 0.05$) (bảng 3.20). Còn trên chuột nhắt trắng gây ĐTD typ 2, acarbose 14mg/kg không ức chế được đỉnh tăng glucose máu, mặc dù làm giảm PBG 33,03 % so với lô chứng bệnh ($p > 0,05$), lô metformin 250mg/kg và Andiabet 2g/kg ức chế được đỉnh tăng glucose máu có ý nghĩa so với lô chứng bệnh, mức giảm PBG lần lượt là

37,89% với metformin ($p < 0,01$) và 48,08% với andiabet 2g/kg ($p < 0,001$). Như vậy, Andiabet 2g/kg ức chế đỉnh tăng glucose máu tốt hơn so với metformin 250mg/kg trong test tinh bột trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2. Tuy nhiên khi so sánh diện tích dưới đường cong glucose máu sau 2 giờ uống tinh bột 6 g/kg của các lô, ta thấy metformin 250mg/kg làm giảm AUC mạnh nhất là 52,21% ($p < 0,01$), sau đó đến Andiabet 2g/kg làm giảm AUC 47,95% ($p < 0,01$) rồi đến acarbose 14mg/kg làm giảm AUC 37,89% ($p < 0,05$) so với lô chứng bệnh. Lô Andiabet 1g/kg không làm thay đổi AUC có ý nghĩa so với lô chứng bệnh, AUC giảm 24,18% ($p > 0,05$) (bảng 3.21). Điều này cho thấy Andiabet có khả năng cải thiện test dung nạp tinh bột, phụ thuộc liều. Tác dụng hạ glucose máu của Andiabet 2g/kg trong test này tốt hơn so với tác dụng của acarbose 14mg/kg và metformin 250mg/kg có thể gợi ý khả năng Andiabet có tác dụng ức chế tăng glucose máu sau ăn, do ức chế các enzym α -glucosidase và/hoặc α -amylase, dẫn đến kéo dài thời gian tiêu hoá chung, gây chậm sự hấp thu glucose vào máu, do đó làm giảm mức tăng nhanh glucose máu sau bữa ăn. Ngoài ra, Andiabet cũng có thể có cơ chế làm tăng nhạy cảm với insulin, giống như metformin, làm tăng khả năng vận chuyển glucose vào trong tế bào đích, làm giảm đỉnh tăng glucose máu sau ăn và giảm AUC.

Kết quả trên của Andiabet phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Suzuki Y [81]: dịch chiết nước nóng lá Bằng lăng nước đã được chứng minh có tác dụng ức chế được sự tăng glucose máu khi cho chuột cống uống tinh bột và cơ chế là do ức chế tác dụng của các enzyme thủy phân như α -amylase, glucoamylase, isomaltase, maltase và sucrose.

Tóm lại rất nhiều nghiên cứu đã thực hiện riêng rẽ các test dung nạp glucose và/hoặc dung nạp sucrose và/hoặc dung nạp tinh bột trên các nhóm chuột nhắt bình thường và/hoặc chuột gây ĐTĐ, các test đó cũng được thực hiện riêng rẽ trên từng loại dược liệu. Kết quả của các nghiên cứu đó cho thấy:

Bằng lăng nước, Giáo cỏ Lam và Tri mẫu có khả năng cải thiện test dung nạp glucose, dung nạp sucrose và dung nạp tinh bột trên chuột có nồng độ glucose máu cao. Các cơ chế hạ glucose máu được ghi nhận là ức chế tăng glucose máu sau ăn do ức chế các enzym thủy phân polysaccharid, tăng nhạy cảm insulin, tăng vận chuyển glucose vào trong tế bào, tăng chuyển hóa glucose, phù hợp với nhận định của chúng tôi trong nghiên cứu này.

4.2.4. Ảnh hưởng của Andibet đến mức kháng insulin của chuột gây ĐTĐ typ 2.

Kháng insulin được xác định là giảm độ nhạy và/hoặc giảm đáp ứng với các tác dụng trên chuyển hóa của insulin. Đánh giá tính kháng insulin trong các mô hình động vật gặm nhấm cung cấp cái nhìn sâu hơn về cơ chế bệnh sinh của ĐTĐ typ 2 và hội chứng chuyển hóa [170]. Quy trình lựa chọn những test đánh giá chuyển hóa glucose trên chuột có thể thực hiện theo các bước sau: Bước đầu tiên là thực hiện các xét nghiệm sàng lọc sơ cấp. Xét nghiệm sàng lọc đơn giản nhất là đo nồng độ glucose máu và/hoặc insulin huyết thanh. Test sàng lọc tiếp theo là test dung nạp glucose (GTT), để gián tiếp đánh giá mức độ kháng insulin và/hoặc test dung nạp insulin (ITT) có thể được thực hiện thêm. Sau đó, nếu khả năng dung nạp glucose được cải thiện, do cải thiện tác dụng của insulin, thì “kẹp insulin đấng glucose” có thể được tiến hành để kiểm tra giả thuyết này. Kỹ thuật này có thể kết hợp với việc truyền các đồng vị glucose phóng xạ để xác định mức độ nhạy cảm của từng cơ quan với insulin [170].

Test dung nạp glucose là 1 mô hình gián tiếp đánh giá mức độ kháng insulin trong toàn bộ cơ thể. Mặc dù phương pháp này dễ áp dụng, gần giống với các quá trình sinh lý bình thường, nhưng khả năng dung nạp glucose của động vật thí nghiệm ngoài tính kháng insulin còn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác như:

- Khả năng tiết insulin của tuyến tụy: khi đưa glucose vào cơ thể sẽ kích thích

tụy tăng bài tiết insulin, đây là hạn chế lớn nhất của phương pháp này.

- Quá trình tân tạo glucose tại gan hay thải trừ glucose qua thận (khi nồng độ glucose máu cao vượt ngưỡng thận, glucose sẽ bị thải trừ ra ngoài). Hơn nữa test dung nạp glucose không xác định được mức độ nhạy cảm của từng cơ quan với insulin.

Kỹ thuật kẹp “duy trì glucose ổn định - tăng insulin máu” (Hyperinsulinemic- euglycemic clamp), gọi tắt là kỹ thuật “kẹp insulin đẳng glucose” được coi là “tiêu chuẩn vàng” để đánh giá mức độ kháng insulin, có thể khắc phục các hạn chế của phương pháp gián tiếp trên. Kẹp “insulin đẳng glucose” là một phương pháp tiêu chuẩn tham chiếu để đo độ nhạy cảm/kháng insulin ở người và động vật. Tuy nhiên, đây là một thủ thuật chuyên sâu đòi hỏi tốn thời gian và phức tạp về mặt kỹ thuật. Ở động vật gặm nhấm, việc thực hiện kẹp “insulin đẳng glucose” thậm chí còn khó khăn hơn ở người do kích thước cơ thể nhỏ, tổng khối lượng máu ít (~ 2 ml ở chuột nhắt), hạn chế lấy nhiều mẫu máu, trọng lượng cơ thể giảm đáng kể trước khi tiến hành kẹp, căng thẳng (stress) do gây mê và/hoặc phẫu thuật và một loạt các vấn đề về kỹ thuật khác [170].

Kỹ thuật “kẹp insulin đẳng glucose” được thực hiện lần đầu tiên năm 1979, bởi DeFronzo. Trong kỹ thuật này, động vật thí nghiệm được truyền insulin liên tục với tốc độ hằng định và ở mức cao, đồng thời truyền dung dịch glucose để duy trì nồng độ glucose máu trong giới hạn bình thường [152]. Khi nồng độ glucose máu trong giới hạn bình thường, glucose không bị thải trừ ra ngoài theo đường tiết niệu (toàn bộ lượng glucose máu sau khi lọc qua cầu thận sẽ được tái hấp thu trở lại máu tại ống thận nhờ cơ chế đồng vận chuyên với ion Na^+). Glucose cũng không bị chuyển hóa ở gan thành các chất chuyển hóa để đào thải ra ngoài (ở gan glucose được sử dụng làm năng lượng phục vụ trực tiếp cho các hoạt động của tế bào gan, hoặc được tổng hợp thành glycogen). Do vậy, khi glucose máu ở giới hạn bình thường, độ thanh thải glucose (hay độ

thanh thải chuyển hóa glucose) phản ánh trực tiếp mức độ dung nạp glucose của toàn bộ các cơ quan trong cơ thể.

Tuy nhiên bình thường khi truyền glucose, glucose máu sẽ tăng kích thích tuyến tụy tăng tiết insulin để đưa glucose máu về trạng thái bình thường. Việc truyền insulin liều cao cho động vật thí nghiệm nhằm hạn chế ảnh hưởng của insulin nội sinh do nồng độ insulin máu cao ức chế tụy sản xuất insulin đồng thời ức chế gan tân tạo glucose. Như vậy khi đưa nồng độ insulin tăng và duy trì ở mức cao, tốc độ truyền glucose tốc độ truyền glucose và tốc độ chuyển hóa glucose phản ánh mức độ gắn insulin vào các receptor ở mô ngoại vi. Mức độ nhạy cảm với insulin của tất cả các mô trong cơ thể được xác định thông qua khả năng tiêu thụ glucose của cơ thể trong điều kiện nồng độ glucose đạt trạng thái ổn định.

Quy trình tiến hành kỹ thuật “kẹp insulin đấng glucose” đã được mô tả chi tiết trên trang web Vanderbilt MMP (kèm theo video) [152]. Tóm tắt cách tiến hành thí nghiệm như sau: đầu tiên đặt catheter (ống thông tĩnh mạch cổ và động mạch cảnh). Một ống thông được luồn cố định vào tĩnh mạch cổ bên phải và ống thông thứ 2 được luồn cố định vào động mạch cảnh trái. Các đầu tự do của 2 ống thông được mở rộng và gắn cố định phía sau đầu. Sau phẫu thuật, chuột được nhốt riêng rẽ để phục hồi ít nhất 5-7 ngày. Theo dõi hàng ngày tình hình sức khỏe sau phẫu thuật của chuột (gồm trọng lượng, hoạt động, ăn, uống, tình trạng lành vết thương). Phẫu thuật coi là thất bại nếu sau 5 ngày, trọng lượng chuột giảm > 15 % ở những con chuột béo phì và > 10 % ở những con chuột lô chứng (chuột bình thường), chỉ số này được sử dụng như một tiêu chuẩn loại trừ. Sau phẫu thuật khoảng 5 -7 ngày, tiến hành kỹ thuật “kẹp insulin đấng glucose” trong 2 giờ, trên chuột cố gắng/nhất tỉnh, không bị cố định (trói, buộc) và không gây mê. Chuột đã được nhịn ăn qua đêm (18 giờ) hoặc đã được nhịn ăn trong 6 giờ. Đầu ống thông luồn vào tĩnh mạch cổ được nối với một Y

connector, trong đó 1 đường để truyền insulin liên tục với nồng độ cao và hằng định, một đường truyền glucose, được điều chỉnh định kỳ để “kẹp” duy trì nồng độ glucose máu ở trạng thái ổn định. Các mẫu máu được thu thập 10 phút/lần qua đầu ống thông luôn vào động mạch cảnh.

Kỹ thuật “kẹp insulin đẳng glucose” đã được nhiều tác giả trên thế giới áp dụng, tuy nhiên tại Việt Nam mới có tác giả Đỗ Thị Nguyệt Quế công bố việc sử dụng mô hình này trên chuột cống trắng gây kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo [47]. Các bước cơ bản tiến hành thí nghiệm được tóm tắt như sau: Chuột cống kháng insulin được nhịn đói 10-12 giờ trước khi tiến hành thí nghiệm và được gây mê bằng thiopental và xylazin (liều tương ứng là 40 mg/kg và 40mg/kg cân nặng). Bộc lộ tĩnh mạch đùi, đặt catheter, một bên đùi truyền insulin và một bên đùi truyền glucose. Tiêm màng bụng insulin cho chuột liều 30 UI/kg. Sau 30 phút, truyền insulin với liều 2,5mU/kg/phút. Duy trì tốc độ truyền insulin không đổi trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm đồng thời truyền glucose máu và điều chỉnh tốc độ truyền glucose để nồng độ glucose máu nằm trong khoảng 4,5 – 6 mmol/L (định lượng glucose máu 5 phút/lần để làm cơ sở điều chỉnh tốc độ truyền glucose). Chuột được sưởi ấm 30 phút trước khi truyền và trong suốt quá trình truyền dịch để tránh hạ nhiệt độ. Khi nồng độ glucose đã ổn định (thời điểm $t = 0$ phút), tiếp tục truyền glucose và insulin thêm 120 phút nữa. Lấy máu chuột vào 4 thời điểm $t = 90 - 100 - 110 - 120$ phút để xác định độ thanh thải glucose. Các mẫu máu được thu thập bằng cách cắt 1 cm từ chóp đuôi chuột [47].

Trong đề tài này, kỹ thuật “kẹp insulin đẳng glucose” trên chuột nhắt trắng gây ĐTĐ typ 2, là mô hình lần đầu tiên được chúng tôi thực hiện trong điều kiện Việt Nam. Chúng tôi cũng đã cải tiến một số kỹ thuật tiến hành như sau: Thay vì bộc lộ động mạch cảnh và tĩnh mạch cổ 2 bên để đặt ống thông cố định thì ống thông được luôn vào tĩnh mạch đuôi chuột nhắt, để đồng thời

truyền dung dịch insulin và dung dịch glucose. Chuột được lấy máu ở chóp đuôi để đo nồng độ glucose máu thay cho lấy máu động mạch cảnh. Chuột được nhịn ăn qua đêm (18 giờ), rồi mới tiến hành kỹ thuật “kẹp insulin đấng glucose” trong 2 giờ, thời gian “kẹp” được rút ngắn. Chuột nhốt trong cũi, nhưng tỉnh, không gây mê.

Thực hiện mô hình này chúng tôi nhận thấy có những ưu, nhược điểm sau:

- Kỹ thuật “kẹp insulin đấng glucose” trong nghiên cứu này được tiến hành trên chuột nhắt trắng gây ĐTD typ 2 bằng chế độ ăn giàu chất béo kết hợp tiêm STZ liều thấp với mục đích đánh giá ảnh hưởng của Andibet trên cùng mô hình chuột, tương đồng với mô hình test dung nạp glucose đã được chúng tôi thực hiện trước đó, giúp khẳng định kết quả gián tiếp của test dung nạp glucose. Tác giả Đỗ Thị Nguyệt Quế thì thực hiện kỹ thuật này trên chuột công kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo [47]. Chuột công mặc dù có kích thước lớn hơn, khối lượng máu nhiều hơn, lấy mẫu máu để đo nồng độ glucose và insulin tương đối dễ hơn so với ở chuột nhắt và các vấn đề kỹ thuật đỡ khó khăn hơn, nhưng vẫn cho kết quả tương tự như trên chuột nhắt [152]. Tuy nhiên, chuột béo phì, kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo chưa chắc đã mắc ĐTD typ 2. Các nghiên cứu trên thế giới thường sử dụng chuột kháng insulin ĐTD typ 2 do di truyền như chuột nhắt ob/ob, chuột nhắt db/db, chuột công Zucker fa/fa [42].

- Đặt ống thông (catheter) vào động mạch cảnh và tĩnh mạch cổ cho chuột nhắt được chứng minh là quá khó khăn về kỹ thuật. Do các mạch này của chuột nhắt nhỏ hơn nhiều so chuột công và nằm khá sâu giữa 2 bó cơ, phẫu thuật sẽ gây đụng giập, rách nát tổ chức nhiều và đòi hỏi nghiên cứu viên có kỹ thuật tốt. Phẫu thuật cũng gây stress rất lớn cho chuột hoặc con chuột được phẫu thuật không dung nạp (không thích ứng) với catheter, dẫn đến chuột bỏ ăn và giảm cân. Vì vậy thời gian khuyến nghị để chuột phục hồi là từ 5-7 ngày, điều này

sẽ làm tăng thêm thời gian, công sức và chi phí cho quy trình thí nghiệm. Do đó, tác giả Đỗ Thị Nguyệt Quế gây mê chuột cống và bộc lộ 2 tĩnh mạch đùi để đặt catheter, một bên đùi truyền insulin và một bên đùi truyền glucose. Còn chúng tôi, để đơn giản hóa kỹ thuật, chúng tôi đặt 1 catheter vào tĩnh mạch đuôi chuột nhất, truyền đồng thời 2 dung dịch insulin và glucose qua một Y connector. Về mặt giải phẫu, chạy dọc theo đuôi chuột nhất có 4 tĩnh mạch khá lớn so với đuôi chuột cống, nên thực hiện kỹ thuật đặt đường truyền khá dễ và sau đó phần đuôi gắn kim truyền được cố định luôn vào giá đỡ ở phía dưới, thuận lợi cho việc lấy các mẫu máu từ chóp đuôi chuột. Như thế chuột tuy bị cố định tại chỗ, nhưng vẫn tỉnh, không bị gây mê, không bị stress do phẫu thuật và thí nghiệm có thể thực hiện ngay, không mất thời gian phục hồi.

- Để giảm bớt Stress (căng thẳng), một số nhà nghiên cứu đã thực hiện các xét nghiệm trên chuột gây mê. Nhưng gây mê ảnh hưởng đến nhịp tim và lưu lượng máu và gây tăng đường huyết ở chuột, do đó ảnh hưởng đến độ nhạy cảm insulin. Vì thế, đánh giá chuyển hóa glucose ở chuột gây mê cho kết quả không sinh lý. Bởi vậy “kẹp insulin đấng glucose” nên được thực hiện ở những con chuột không bị trói/buộc và có ý thức. Như vậy, những con vật này ít stress hơn và chuyển hóa glucose không bị ảnh hưởng bởi việc sử dụng đồng thời thuốc gây mê [171].

- Ngoài các vấn đề kỹ thuật nêu trên, thời gian nhịn ăn trước khi tiến hành thí nghiệm là một vấn đề cần cân nhắc thận trọng bởi vì tất cả các chỉ số đo lường được trong nghiên cứu này đều phụ thuộc vào nồng độ glucose máu lúc đói và/hoặc nồng độ insulin huyết thanh lúc đói để xác định độ nhạy/kháng insulin của động vật thực nghiệm [170]. Trong nghiên cứu chuyển hóa điển hình, chuột thường được nhịn ăn qua đêm 14 -18 giờ hoặc nhịn ăn sáng 5-6 giờ. Nhịn ăn qua đêm kích thích trạng thái dị hóa ở chuột, vì chúng tiêu thụ chủ yếu vào ban đêm. Sau một đêm nhịn ăn (18 giờ) mức glycogen dự trữ trong gan đã được

chứng minh là gần như cạn kiệt, trong khi triglycerid gan cao gấp sáu lần so với nhịn ăn 4-5 giờ. Như thế sự sản xuất glucose nội sinh bị ức chế hoàn toàn so với nhịn ăn 5 giờ, điều này có lợi là ít làm thay đổi đường huyết cơ sở. Hơn nữa, trên chuột C57BL/6J chuyển gen có sự biểu hiện quá mức GLUT4 hoặc hexokinase II trong cơ đã cho thấy sự nhạy cảm insulin tăng nhanh sau một đêm nhịn ăn, điều này không xảy ra khi nhịn ăn với thì gian ngắn hơn từ 3-5 giờ. Do đó, nhịn ăn qua đêm rất hữu ích cho các nghiên cứu tập trung vào việc sử dụng glucose (ví dụ: tác động lên sự hấp thu glucose của cơ) [171]. Vì vậy, chúng tôi đã chọn thời điểm này để tiến hành thử nghiệm “kẹp insulin đấng glucose” cho nghiên cứu này.

- Thời gian “kẹp” trong thí nghiệm này được rút ngắn một nửa so với thời gian “kẹp” trong thí nghiệm của tác giả Đỗ Thị Nguyệt Quế. Điều này giúp chuột giảm stress đồng thời nghiên cứu viên đỡ mệt mỏi, mất tập trung.

Kết quả ở hình 3.10 và 3.11 cho thấy: khi nồng độ glucose máu được duy trì ổn định trong khoảng từ 7,5- 8.3 mmol/L, thì tốc độ truyền glucose (GIR) trong quá trình kẹp được sử dụng như một thước đo độ nhạy insulin, sẽ phản ánh lượng glucose ngoại sinh cần thiết để duy trì đấng glucose, tốc độ này khác nhau giữa nhóm chứng và các nhóm kháng insulin. Nhóm chứng bệnh ăn chế độ ăn giàu chất béo trong 8 tuần đã có biểu hiện kháng insulin, lại được gây ĐTĐ typ 2 và không được điều trị thì tốc độ truyền glucose là thấp nhất, do nhóm này cần ít glucose để duy trì đấng glucose máu hơn bởi vì chúng không nhạy cảm với insulin. Chuột ĐTĐ typ 2 được điều trị Andiabet 1g và 2g/kg trong 2 tuần có tốc độ truyền glucose cao hơn so lô chứng bệnh, nhưng thấp hơn so với chuột bình thường không kháng insulin, chứng tỏ Andiabet có khả năng cải thiện tình trạng kháng insulin của cơ thể.

Tổng quan tài liệu cho thấy cơ chế kháng insulin rất phức tạp, thậm chí còn nhiều cơ chế chưa rõ ràng. Tuy nhiên các nghiên cứu đều khẳng định

nguyên nhân chính dẫn đến các hiện tượng này là do yếu tố di truyền và mắc phải, trong đó thừa cân và béo phì là nguyên nhân quan trọng nhất [21]. Đối với ĐTĐ typ 2, ở mức độ tế bào, kháng insulin chủ yếu do giảm số lượng receptor của insulin và các bất thường trong con đường truyền tin nội bào của insulin (sự dẫn truyền tín hiệu sau khi insulin đã gắn vào receptor), trong đó các đích tác dụng quan trọng của các thuốc điều trị ĐTĐ typ 2 trong tương lai là ức chế protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) và liên quan đến vai trò của các acid béo và các adipokin trong cơ chế bệnh sinh kháng insulin đặc biệt ở bệnh nhân thừa cân, béo phì, hai đích tác dụng quan trọng khác của các thuốc điều trị ĐTĐ typ 2 đã được nghiên cứu và ứng dụng trên lâm sàng là hoạt hóa AMPK và kích thích PPAR γ . Tuy nhiên do viên nang cứng Andiabet là dạng cao toàn phần, chứa nhiều thành phần khác nhau, không phải là một hoạt chất tinh khiết, nên trong phạm vi đề tài này chúng tôi không tiếp tục đi sâu nghiên cứu về đích tác dụng của Andiabet trên cơ chế phân tử của kháng insulin. Nhưng từ các kết quả nghiên cứu của đề tài, có thể nhận định: Andiabet khá an toàn thông qua nghiên cứu về độc tính cấp và độc tính bán trường diễn, đồng thời Andiabet cũng đã thể hiện tác dụng HGM và hạ lipid máu tốt trên chuột nhất trắng bình thường và chuột nhất gây mô hình ĐTĐ typ 2. Cơ chế tác dụng của Andiabet là do cải thiện mức kháng insulin và ức chế tăng glucose máu sau ăn của chuột nhất gây ĐTĐ typ 2. Vì thế, có thể hướng đến sử dụng Andiabet như một thuốc hỗ trợ điều trị đái tháo đường typ 2.

KẾT LUẬN

Dưới đây là một số kết luận thu được từ kết quả nghiên cứu của đề tài:

1. Về độc tính cấp và bán trường diễn của viên Andiabet.

- Andiabet không gây độc tính cấp cho chuột nhất khi dùng đến liều 44,25 g/kg. Không xác định được LD₅₀ đường uống của Andiabet.

- Andiabet không gây độc tính bán trường diễn trên thỏ khi cho thỏ uống liều 0,21g/kg/ngày và liều 0.64g/kg/ngày trong 90 ngày liên tục. Tất cả các chỉ số theo dõi về tình trạng chung, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, mức độ hủy hoại tế bào gan, chức năng thận và mô bệnh học gan, thận đều nằm trong giới hạn bình thường, không có sự khác biệt rõ rệt so với lô chứng.

2. Về tác dụng và cơ chế tác dụng hạ glucose máu của viên Andiabet.

2.1. Về tác dụng hạ glucose máu và hạ lipid máu của viên Andiabet.

- Trên chuột nhắt trắng bình thường: sau 2 tuần liên tục uống thuốc thử, Andiabet liều 0,68 g/kg/ngày và 2 g/kg/ngày có tác dụng hạ glucose máu lần lượt là 14,3% và 17,1% so với lô chứng trắng ($p < 0.05$).

- Trên chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2: sau 2 tuần liên tục uống thuốc thử, Andiabet ở cả 3 mức liều: 0,68 g/kg/ngày; 1 g/kg/ngày và 2 g/kg/ngày có tác dụng HGM lần lượt là 9,1%; 35,6% và 19,3% so với lô chứng bệnh ($p < 0.01$).

- Andiabet ở cả 3 mức liều: 0,68 g/kg/ngày; 1 g/kg/ngày và 2 g/kg/ngày sau khi cho chuột nhắt gây ĐTĐ typ 2 uống trong 2 tuần liên tục đã làm giảm nồng độ LDL-C lần lượt là 36%; 29,88% và 50,61% đồng thời làm tăng nồng độ HDL-C rõ so với lô chứng bệnh, mức tăng tương ứng là: 27,9%; 15,64% và 20,11% sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Ngoài ra Andiabet liều 2 g/kg/ngày uống liên tục trong 2 tuần làm giảm rõ nồng độ Cholesterol toàn phần là 16,1% ($p < 0,01$) và giảm triglyceride là 30,34% so với lô chứng bệnh ($p < 0,01$).

- Andiabet ở cả 3 mức liều đều có tác dụng cải thiện hình ảnh đại thể và cấu

trúc vi thể của gan và tụy chuột được gây mô hình bệnh ĐTĐ typ 2 khi cho uống liên tục trong 2 tuần.

2.2. Về cơ chế tác dụng hạ glucose máu của viên *Andiabet*.

Andiabet có khả năng ức chế tăng glucose máu sau ăn trên chuột nhắt trắng bình thường và chuột gây ĐTĐ typ 2, gợi ý cơ chế là do ức chế enzyme α -glucosidase và/hoặc α -amylase và làm tăng nhạy cảm của tế bào đích, cải thiện tính kháng insulin.

- *Andiabet* liều 1g/kg và 2g/kg có khả năng cải thiện test dung nạp glucose, đồng thời có khả năng ức chế tăng glucose máu sau ăn do cải thiện test dung nạp sucrose và dung nạp tinh bột.

- *Andiabet* liều 1g/kg và 2g/kg có khả năng cải thiện tính kháng insulin, được đánh giá trực tiếp thông qua kỹ thuật “kẹp duy trì glucose ổn định-tăng insulin máu”.

KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, để có thể hướng đến sử dụng Andiabet như một thuốc hỗ trợ điều trị đái tháo đường, chúng tôi đề xuất kiến nghị sau:

Tiếp tục tiến hành các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng để đánh giá về tính an toàn và hiệu quả của thuốc trên bệnh nhân ĐTĐ typ 2

DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ

1. Nguyễn Thị Hương Giang, Nguyễn Trọng Thông, Đào Thị Vui, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Thanh Hà (2017) “Đánh giá tác dụng hạ glucose máu và hạ lipid máu của viên Andiabet trên thực nghiệm”, Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc, tập 8, số 4, trang 18-23.
2. Nguyễn Thị Hương Giang, Nguyễn Trọng Thông, Đào Thị Vui, Phạm Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Thanh Hà (2017), “Nghiên cứu độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên Andiabet trên thực nghiệm”, Tạp chí Y học thực hành, số 6 (1049), trang 153-155.
3. Nguyễn Thị Hương Giang, Nguyễn Trọng Thông, Đào Thị Vui (2018) “Tác dụng của Andiabet trên khả năng ức chế tăng glucose máu sau ăn và trên mức kháng insulin của chuột nhắt gây đái tháo đường typ 2”, Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc, tập 9 (1), trang 19-25 .

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ogurtsova K., Rocha Fernandes da J.D, Huang Y. et al (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 128, 40-50.
2. Tạ Văn Bình (2006). *Bệnh đái tháo đường tăng glucose máu*, Nhà xuất bản Y học, 13-15,24-28.
3. Phạm Hữu Điền, Nguyễn Khánh Hòa và Đào Văn Phan (2003). Nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của tri mẫu và mangiferin chiết tách từ tri mẫu. *Tạp chí hóa sinh học*. 3(6), 83-88.
4. Hong H (2004). Effects of malted barley extract and bababa extract on blood glucose level in genetically diabetic mice. *Journal of Medical Food*. 7(4), 487-489.
5. Thái Hồng Quang (2012). *Thực hành lâm sàng bệnh đái tháo đường*, Nhà xuất bản Y học, 71-80, 267-277, 281-287.
6. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019 (2019). *Diabetes Care*. 42(Suppl 1), S13-S28.
7. Alvin C.Power (2012). Diabetes mellitus, *Harrison's principles of internal medicine, 18th* McGraw-Hill, 2968-3002.
8. Belfiore F, Mogensen C.E (2000). New concept in diabetes and its treatment. *Diabetes Melitus*, 3-8, 27, 43, 48.
9. Tom L. Van Belle, Ken T. Coppieters and Matthias G. Von Herrath (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews* 91(1), 79-118
10. Jay S. SKyler (2012). *Atlas of Diabetes*, Springer, 4th, Miami.
11. Yoshifumi Saisho (2015). B-cell dysfunction: its critical role in prevention and management of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*. 6(1), 109-124.
12. Fonseca V.A (2009). Defining and Chracterrizing the Progression of type

- 2 Diabetes. *American Diabetes Association*, S151-S155.
13. Poitout V., Robertson R.P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and betacell dysfunction. *Endocrine Review*. 29, 351-66.
14. Keith C.R (2009). Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Journal of the American Pharmacists Association*. 9, 1-13.
15. Bertram G. Katzung, Susan B. Masters and Anthony J. Trevor (2018). Pancreatic Hormones and Antidiabetic Drugs, *Basic & Clinical Pharmacology*, 14th Edition, The McGraw-Hill Education, Chapter 41.
16. Antonio Brunetti, Eusebio Chiefari and Daniela Foti (2014). Recent advances in the molecular genetic of type 2 diabetes melitus. *World Journal of Diabetes*. 5(2), 128-140.
17. Sehamuddin Galadari, Anees Rahman, Siraj Pallichankady et al (2013). Role of Ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipid in Health and Disease*. 12(98), 1-16.
18. Sun Z Yi Lin (2010). REVIEW: Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*. 204, 1-11.
19. Shaodong Guo (2013). Molecular Basis of Insulin Resistance: The Role of IRS and Foxo1 in the Control of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Drug Discov Today Dis Mech*. 10(1-2), 1-11.
20. Je´re´mie Boucher, Andre´ Kleinriders and C. Ronald Kahn (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a009191, 1-24.
21. Jianping Ye (2013). Mechanism of insulin resistance in obesity. *Front Med* 7(1), 14-24.
22. Biswajit Mukherjee, Chowdhury M. Hossain, Laboni Mondal et al (2013). Obesity and Insulin Resistance: An Abridged Molecular correlation. *Lipid Insights*. 6, 1-11.

23. Masato Kasuga (2006). Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(7), 1756-1760.
24. Kurt Hojlund (2014). Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Danish medical journal*. 61(7), B4890.
25. Maitree Bhattacharyya Kakali Ghoshal (2015). Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World Journal of Diabetes*. 6(1), 151-166.
26. Konrad D., Rudich A. and et al (2005). Insulin-mediated regulation of Glucose Metabolism, *Insulin Resistance insulin action and its Disturbances in Disease* John Wiley & Sons Ltd, 64.
27. Ralph A. De Fronzo., Ele Ferrannini., Paul Zimmet. et al (2015). *International Textbook of Diabetes Mellitus* Fourth Edition, John Wiley & Sons, Ltd. , 641-56.
28. Laurence L. Brunton, Randa Hilal-Dandan and Björn C. Knollmann (2018). Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia, *Goodman and Gilman's Manual of pharmacology and therapeutic*, 13th edition, Mc Graw Hill Education, 863-886.
29. American Diabetes Association (2017). Standards of Medical Care in Diabetes-2017. *The Journal of clinical and applied research and education*. 40, 11-70.
30. Philip Wiffen, Marc Mitchell, Melanie Snelling et al (2017). *Oxford Handbook of Clinical Pharmacy*, Third Edition, Oxford University Press, 484-489.
31. Annalisa Capuano, Liberata Sportiello, Maria Ida Maiorino et al (2013). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy – focus on alogliptin. *Drug Design, Development and Therapy*. 7, 989-1001.

32. Gerald H Tomkin (2014). Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors. *World J Diabetes*. 5(5), 636-650.
33. Diana Röhrborn., Nina Wronkowitz. and Juergen Eckel (2015). DPP4 in diabetes. *Frontier in Immunology*. 6, 1-20.
34. Ricardo Godinho., Cristina Mega., Edite Teixeira-de-Lemos. et al (2015). The Place of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapeutics: A “Me Too” or “the Special One” Antidiabetic Class? *Journal of Diabetes Research*. 2015.
35. Elchebly M., Payette and et la (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase 1B gene. *Science*. 283, 1544-1548.
36. Roger O.A, Baron M and et al (2005). The incretin effect and its potentiation by glucagon-like peptide 1-based therapies: a revolution in diabetes management. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 14(6), 705-727.
37. Tomkin G.H (2009). Albiglutide, an albumin-based fusion of glucagon-like peptide 1 for the potent treatment of type 2 diabetes. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 11(5), 579-588.
38. Karagiannis T, Paschos P, Paletas K et al (2012). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 344, 1369-72.
39. Zheng S. L., Roddick A. J., Aghar-Jaffar R. et al (2018). Association between use of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors, glucagon-like peptide 1 agonists, and dipeptidyl peptidase 4 inhibitors with all-cause mortality in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 319(15), 1580-1591.
40. Chang Hee Jung, Jung Eun Jang and Joong-Yeol Park (2014). A Novel

Therapeutic Agent for Type 2 Diabetes Mellitus: SGLT2 Inhibitor. *Diabetes Metab J.* 38, 261-273.

41. Sanjay Kalra (2014). Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. *Diabetes Ther.* 5, 355–366.

42. Antonios Chatzigeorgiou., Antonios Halapas. and et al (2009). The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *in vivo.* 23, 245-258.

43. Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan - and streptozotocin - induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226.

44. Naoaki Sakata., Gumpei Yoshimatsu., Haruyuki Tsuchiya. et al (2012). Animal Models of Diabetes Mellitus for Islet Transplantation. *Experimental Diabetes Research.* Volume 2012, 1-11.

45. Phan Văn Các (1993). *Một số tương tác trên bản vận động cơ vân và trên hạch giao cảm trong điều kiện sinh lý bình thường và trong trạng thái đái tháo đường thực nghiệm*, Luận án phó tiến sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.

46. Nguyễn Ngọc Xuân (2004). *Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của thảo phục linh (Smilax glabra Roxb-Liliaceae) trên súc vật thí nghiệm*, Luận án tiến sĩ Trường Đại học Y Hà Nội.

47. Đỗ Thị Nguyệt Quế (2013). *Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết của rễ cây chóc máu nam (Salacia cochinchinensis Lour., Celastraceae)*, Luận án tiến sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.

48. Bùi Thị Quỳnh Nhung (2011). *Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng hạ glucose máu của Vinabetes trên thực nghiệm*, Luận văn thạc sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

49. Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh, Bùi Thị Quỳnh Nhung et al (2011). *Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết của Vinabetes trên thực nghiệm.*

Tap chí Dược học. 51(427), 38-41.

50. Benito M. (2011). Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. *Acta Physiologica* 201, 297-312.

51. Pacini G., Omar B. and Ahrén B. (2013). Methodology Report Methods and Models for Metabolic Assessment in Mice. *Journal of Diabetes Research*. 2013.

52. Zhenzhong Yang, Linli Wang, Feng Zhang et al (2015). Evaluating the antidiabetic effects of Chinese herbal medicine: Xiao-Ke-An in 3T3-L1 cells and KKAY mice using both conventional and holistic omics approaches. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15(272), 1-12.

53. Rammohan Subramanian, Zaini Asmawi M. and Amirin Sadikun (2008). In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica*. 55 (2/2008), 391–398.

54. Vogel H.G (2007). Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. *Springer*, 1327-1355, 1572-1573.

55. Curtis C. Hughey, Dustin S. Hittel and Jane Shearer (2011). Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp in the Conscious Rat. *Journal of Visualized Experiments*. 48, 2432.

56. Qian-Qian Jiang, Yun-Ping Zhao, Wen-Yuan Gao et al (2013). Isolation, Purification, Characterization and Effect upon HepG2 Cells of Anemaran from Rhizome *Anemarrhena* *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12 (4), 777-788.

57. Jeffrey D. Carter, Stacey B. Dula, Kathryn L. Corbin et al (2009). A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment. *Biological Procedures Online*. 11 (1), 1-29.

58. Ozra Tabatabaei-Malazy, Bagher Larijani and Mohammad Abdollahi

- (2012). A Systematic Review of in vitro Studies Conducted on Effect of Herbal Products on Secretion of Insulin from Langerhans Islets *J Pharm Pharmaceut Sci* 15(3), 447 - 466.
59. Seo Hee Lee, Hyun Joo Lee, Yong-ho Lee et al (2012). Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) improves Insulin sensitivity in High Fat Fed Sprague-Dawley Rats. *Phytotherapy Research*. 26, 142–147.
60. Jing Sun, Yong sen Wang, Xue qi Fu et al (2015). Magnolia officinalis Extract Contains Potent Inhibitors against PTP1B and Attenuates Hyperglycemia in db/db Mice. *BioMed Research International* 2015, 10.
61. Jing-ying Tian, Rong-ya Tao, Xiao--lin Zhang et al (2015). Effect of *Hypericum perforatum* L.extract on Insulin resistance and Lipid Metabolic Disorder in High-Fat-Diet Induced Obese Mice. *Phytotherapy Research*. 29, 86-92.
62. Yan Shen, Natsumi Honma, Katsuya Kobayashi et al (2014). Cinnamon Extract Enhances Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes and C2C12 Myocytes by Inducing LKB1-AMPActivated Protein Kinase Signaling. *PLOS ONE* 9(2), 1-9.
63. Shu-Jun Jiang, Hui Dong, Jing-Bin Li et al (2015). Berberine inhibits hepatic gluconeogenesis via the LKB1AMPK-TORC2 signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats *World Journal of Gastroenterology*. 21(25), 7777-7785.
64. Rabyah B Ali, Item J Atangwho, Navneet Kuar et al (2013). Invitro and invivo effect of standardized extract and fractions of *Phaleria macrocarpa* fruits pericarp on lead carbohydrate digesting enzymes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13(39).
65. Rosa Martha Perez-Gutierrez, Monica Damian-Guzman (2012). Meliacinolin: A Potent- α -glucosidase and α -amylase Inhibitor Isolated from

Azadizachta indica leaves and invivo antidiabetic property in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 35(9), 1516-1524.

66. Phùng Thanh Hương (2010). *Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết và ảnh hưởng trên chuyển hóa glucose của dịch chiết lá bằng lãg nước (Lagerstroemia speciosa L.Pers)*, Luận án tiến sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.

67. Đỗ Tất Lợi (2001). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 798.

68. Võ Văn Chi (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 76.

69. Eric Wei Chiang Chan, Lea Ngar Tan and Siu Kuin Wong (2014). Phytochemistry and Pharmacology of Lagerstroemia speciosa: A Natural Remedy for Diabetes *International Journal of Herbal Medicine* 2(2), 100-105.

70. Klein G, Kim J and Cao Y (2007). Antidiabetes and anti obesity activity of Lagerstroemia speciosa. *eCAM* 2007, 5-7.

71. Hosoyama H, Suugimoto A and Suzuki Y (2003). Isolation and quantitative analysis of the α -amylase inhibitor in Lagerstroemia speciosa (L.) Pers., (Banaba). *Yakugaku Zasshi.* 123(7), 599-605.

72. Garcia F. (1940). On the hypoglycemic effect of a decoction of Lagerstroemia speciosa leaves (banaba) administered orally. *Phillipine Medical Association.* 20, 193-201.

73. Kakuda T., Sakane I (1996). Hypoglycemic effect of extracts from Lagerstroemia speciosa L leaves in genetically diabetic KK-Ay mice. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry.* 60(2), 204-8.

74. Amornnat Thuppia, Pornrut Rabintossaporn, Suphaket Saenthaweek et al (2009). The hypoglycemic effect of water extract from leaves of

Lagerstroemia speciosa L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 31 (2), 133-137.

75. Tanquilut N.C., Tanquilut M.R. C., Estacio M.A.C. et al (2009). Hypoglycemic effect of *Lagerstroemia speciosa* (L) Pers on alloxan-induced diabetic mice *Journal of Medicinal Plan Research*. 3(12), 1066-1071.

76. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Thị Thu Hiền (2009). Tác dụng của dịch chiết lá Bằng lăng nước (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.) trên chuột cống đái tháo đường typ 2. *Tạp chí Dược học*. số 401 năm 49(9/2009), 19.

77. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Xuân Thắng (2009). Phân lập acid Corosolic và acid Urosolic từ lá cây Bằng lăng (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.). *Tạp chí Dược học*. 397(49), 32.

78. Thakur Rohit Singh, Dr.Jamuna Rani, Dr.TS Hemlatha et al (2016). Study of hypoglycemic effect of corosolic acid & its comparative evaluation with standard drug glibenclamide in alloxan induced diabetes in female albino mice *The Pharma Innovation Journal* 5(10), 56-59.

79. Yamada K (2008). Dietary corosolic acid ameliorates obesity and hepatic steatosis in KK-Ay mice *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 3(4), 651-656.

80. Heihachiro K (2000), *Investigation of hypoglycemic effects of glucosol in STZ-induced diabetic rats in comparison with oral anti-diabetic agents*, Rabiton Institute record 2000.

81. Suzuki Y., Hayashi K., Sukabe I. et al (2001). Effect and mode of action of banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) leaf extracts on postprandial blood glucose in rats *Japan Society of Nutrition and Food science*. 54, 131-137.

82. Takagi S., Miura T., Ishibashi C. et al (2008). Effect of corosolic acid on the hydrolysis of disaccharid. *Journal of Nutritional science and vitaminology*. 54(3), 266-268.

83. Hou W., Li Y., Zhang Q. et al (2009). Triterpene acid isolated from

Lagerstroemia speciosa leave as alpha-glucosidase inhibitor. *Phytotherapy Research*. 23(5), 614-618.

84. Musabayane C.T., Tufts M.A. and Mapanga R.F. (2010). Synergistic antihyperglycemic effect between plant-derived oleanolic acid and insulin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal Failure*. 32(7), 832-839.

85. Saumya S.M., Basha P.M. (2011). Antioxidant effect of *Lagerstroemia speciosa* Pers.(Banaba) leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice. *Indian Journal of Experimental biology*. 49(2), 125-131.

86. Barun Kanti Saha, Md Nurul Huda Bhuiyan (2009). Hypoglycemic activity of *Lagerstroemia speciosa* (L.) extract on streptozotocin-induced diabetic rat: underlying mechanism of action. *Banglades Journal of Pharmacology*. 2(2), 79-83.

87. Phùng Thanh Hương, Nguyễn Xuân Thắng (2009). Ảnh hưởng của phân đoạn dịch chiết lá Bằng lăng nước (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.) lên hoạt độ enzym glucose 6 phosphatase và hexokinase của gan chuột thực nghiệm. *Tạp chí Dược học* Số 398 năm 49(6/2009), 37.

88. Yamada K., Hosokawa M., Fujimoto S. et al (2008). Effect of corosolic acid on gluconeogenesis in rat liver. *Diabetes Research and Clinical practise*. 80, 48-55.

89. Park M. Y., Lee K. S. and Sung M. K. (2005). Effect of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- α , PPAR γ , và LPL mRNA expression *Life sciences*. 77(26), 3344-3354.

90. Miura T., Itoh Y., Kaneko T. et al (2004). Corosolic acid induces GLUT4 translocation in genetically type 2 diabetic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27(7), 1103-1105.

91. Miura T, Ueda Naoya, Yamad Koutaro et al (2006). Antidiabetic effect of Corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*.

29(3), 585-587.

92. Samananda Singh L., Sashikanta Singh N. and Anita Devi M. (2014). The hypoglycaemic effect of *Lagerstroemia speciosa* in type 2 diabetic rats. *Journal of Medicinal Plant Research*. 8(25), 899-902.

93. Toshihiro Miura, Satoshi Takagi and Torao Ishida (2012). Management of Diabetes and Its Complication with Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and Corosolic Acid. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1-8.

94. Liu F., Kim J.K., Li Y. et al (2001). An extract of *Lagerstroemia speciosa* L has insulin-like glucose uptake stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cell. *Journal of Nutrition*. 131(9), 2242-2247.

95. Liu X., Kim J., Li Y. et al (2005). Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Journal of Nutritional science and vitaminology*. 135, 165-171.

96. Shi L, Zhang W and Zhou YY (2008). Corosolic acid stimulate glucose uptake via enhancing insulin receptor phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*. 584, 21-29.

97. Li Y., Kim J., Li J. et al (2005). Natural anti-diabetic compound 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl -D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336(2), 430-437.

98. Hattori K., Sukenobu N., Sasaki T. et al (2003). Activation of insulin receptors by lagerstroemia *Journal of Pharmacological Science*. 93, 69-73.

99. Sidney J. Stohs, Howard Miller and Gilbert R. Kaats (2012). A review of the efficacy and safety of Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and Corosolic acid. *Phytother Res*. 26, 317-324.

100. Ikeda Y., Chen J.T. and Matsuda T (1999). Effectiveness and safety of

banabamin tablet containing extract from banaba in patient with mild type 2 diabetes. *Japanese Pharmacology and Therapeutics*. 27(5), 72-73.

101. Ikeda Y, Noguchi M, Kishi S et al (2002). Blood glucose controlling effect and safety of single and long term administration on the extract of Banaba leaves. *Journal of Nutrition & Food*. 5, 41-53.

102. William V. Judy, Siva P. Hari (2003). Antidiabetic activity of a standardized extract (Glucosol™) from *Lagerstroemia speciosa* leaves in Type II diabetics: A dose-dependence study. *Journal of Ethnopharmacology*. 97(1), 115-117.

103. Fukushima M., Matsuyama F. and Ueda N. (2006). Effect of corosolic acid on postchallenge plasma glucose level. *Diabetes Research and Clinical practise*. 73, 1367-1373.

104. Tsuchibe S., Kataumi S., Mori M. et al (2006). An inhibitory effect on the increase in the postprandial glucose by banaba extracts capsule enriched corosolic acid. *Journal for the Intergrated study of Dieatary Habits*. 17, 255-259.

105. Liberman S., Spahrs R., Santon A. et al (2005). Weigh loss, body measurements, and compliance: a 12-week total life style intervention pilot study. *Alternative and Complementary Therapies*. 11(6), 307-313.

106. Phạm Hoàng Hộ (2003). *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản trẻ.

107. Shukun C., Anmin L., Jeffrey C. et al (2011). *Gynostemma* Blume, In *Flrora of China* 19, 11-15.

108. Valentina Razmovski-Naumovski, Tom Hsun-Wei Huang, Van Hoan Tran et al (2005). Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry Reviews* 4, 197–21.

109. Phạm Tuấn Anh, Nghiêm Đức Trọng, Hoàng Văn Lâm et al (2015). Phân loại hình thái một số loài thuộc chi *Gynostemma* Blume ở Việt Nam. *Tạp chí*

Dược học. 55(474), 34-38.

110. Bộ Y tế (2018), Dược điển Việt Nam V. 1178, 1360.

111. Yantao Li, Wanjun Lin, Jiajun Huang et al (2016). Anti-cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Jiaogulan) *Chinese Medicine*. 11(43), 1-16.

112. Norberg A., et al (2004). A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *J Biol Chem*. 279(40), 41361-7.

113. Nguyen Khanh Hoa, Ake Norberg, Rannar Sillard et al (2007). The possible mechanisms by which phanoside stimulates insulin secretion from rat islets. *Journal of Endocrinology*. 192, 384-394.

114. Ezarul Faradianna Lokman, Harvest F. Gu, Wan Nazaimoon Wan Mohamud et al (2015). Evaluation of Antidiabetic Effects of the Traditional Medicinal Plant *Gynostemma pentaphyllum* and the Possible Mechanisms of Insulin Release. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015, 7.

115. Samer Megalli., Neal M. Davis. and Basil D. Roufogalis (2006). Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic Effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker Fatty Rat. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 9(3), 281-291.

116. Phạm Tuấn Anh (2007). *Nghiên cứu cây Giảo Cổ Lam thu hái tại Sa Pa, tỉnh Lào Cai*, Luận văn thạc sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.

117. K Yassin, V.T.T.Huyen and C.G. Ostenson (2011). Herbal Extract of *Gynostemma Pentaphyllum* Decrease Hepatic Glucose Output in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. *J Biomed Sci*. 7(2), 131-136.

118. Hung TM, Hoang DM, Kim JC et al (2009). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory by dammaranes from Vietnamese Giao-Co-Lam Tea. *J ETHNOPHARMACOLOGICAL*. 124(2), 240-5.

119. Yeo L., Kang YJ., Jeon SM et al (2008). Potential hypoglycemic effect of

- an ethanol extract of *Gynostemma pentaphyllum* in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Med Food*. 11(4), 7099-16.
120. Fei Yang, Haiming Shi, Xiaowei Zhang et al (2013). Two new saponins from tetraploid jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*), and their anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry* 141 (2013), 3606–3613.
121. Qi Gang, Zhang Li and Li Changling (1996). Influence of gypenoside on serum lipoprotein and atherosclerosis in hyperlipidaemia animal. *China Journal of Chinese materia medica*. 21(9), 562-564.
122. Y-J Jang, J-K Kim, M-S Lee et al (2001). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of crude saponin fractions from *Panax ginseng* and *Gynostemma pentaphyllum*. *JOURNAL-PHARMACEUTICAL SOCIETY OF KOREA*. 45(5), 545-556.
123. Soo-Hyun Park, Tae-Lin Huh, Sun-Young Kim et al (2014). Antiobesity effect of *Gynostemma Pentaphyllum* extract (Actiponin): A Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial. *Obesity*. 22, 63-71.
124. V.T.T.Huyen, D.V. Phan, P.Thang et al (2010). Antidiabetic effect of *Gynostemma Pentaphyllum* tea in randomly assigned type 2 diabetic patients. *Hormone and Metabolic Research* 42(5), 353-357.
125. V.T.T.Huyen, D.V. Phan, P.Thang et al (2012). Antidiabetic Effects of Add-on *Gynostemma pentaphyllum* Extract Therapy with Sulfonylurea in Type 2 Diabetic patients. *Evidence-base Complementary and Alternative medicine*.
126. V.T.T.Huyen, D.V. Phan, P.Thang et al (2013). *Gynostemma pentaphyllum* Tea Improves Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic patients. *Journal of Nutrition and Metabolism*.
127. Yu. C (1993). Therapeutic effect of tablet gypenosides on 32 patients with hyperlipaemia. *Hu Dei Zhong Yi Za Zhi*. 15(3), 21.

128. Guo WY, Wang WX (1993). Cultivation and Utilisation of *Gynostemma pentaphyllum*. Beijing: Publishing House of Electronics, Science and Technology University. 1993, 1-261.
129. Phó Đức Thành, Văn Đức Bôn and Trần Quang Hy (1963). “Tri mẫu”, 450 cây thuốc nam có tên trong bản Dược thảo Trung Quốc. Nhà xuất bản Y học, 473.
130. Park Hee Jee, Lee Jung Yeop, Moon Surk-Sik et al (2003). Isolation and anti-oomycete activity of niasol from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes. *Phytochemistry*. 64, 997-1001
131. Setsuo Saito, Satoshi Nagase and Koki Ichinose (1994). New Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 42(11), 2342-2345.
132. Kang. LP, Ma. BP, Shi. TJ et al (2006). Two new furostanol saponins from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica*. 41(6), 527-532.
133. Bing-You Yang, Jing Zhang, Yan Liu et al (2016). Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *Molecules* 2016(21).
134. Ying Peng, Lulu Zhao, Dongju Lin et al (2016). Determination of the chemical constituents of the different processed products of *Anemarrhena asphodeloides* Rhizomes by high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 216(30), 508-519.
135. Miura T., Kubo M., Ishihara E. et al (1997). Antidiabetic effect of seishinkanro-to in KK-Ay mice. *Planta Med*. 63, 320-322.
136. Đào Văn Phan, Nguyễn Khánh Hoà and Nguyễn Duy Thuận (2003). Nghiên cứu sàng lọc tác dụng hạ đường huyết của sinh địa, móng trâu, thất diệp đởm và tri mẫu. *Tạp chí nghiên cứu Y học, Bộ Y tế, Đại học Y Hà Nội*. 21(1),

1-6.

137. Phạm Hữu Điền, Phan Văn Kiệm, Đặng Thị Lan Hương et al (2002). Nghiên cứu khả năng hạ đường huyết của sinh địa (*Rehmannia glutinosa* Libosch) và tri mẫu (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge). *Tạp chí Dược học, Bộ Y tế*, . 313 (5), 10-12.

138. Miura Toshihiro, ICHI Hiroyuki and Iwamoto Naoki (2001). Antidiabetic activity of the Rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and Active Components, Mangiferin and Its Glucoside. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1009-1011.

139. Nguyễn Khánh Hoà, Đào Văn Phan và Claes Goran Ostenson (2004). Bước đầu nghiên cứu tác dụng của tri mẫu trên sự bài tiết insulin của đảo tụy cô lập. *Tạp chí nghiên cứu Y học, Bộ Y tế, Trường đại học Y Hà Nội.* 27(1), 35-39.

140. Qianwen Zhao, Yan Sun, Yu Ji et al (2014). Total polyphenol of *Anemarrhena asphodeloides* ameliorates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction by regulation of AMP-Kinase *Journal of Diabetes* 6(2014), 304–315.

141. Ichiki Hiroyuki, Miura Toshihiro (1998). New Antidiabetic Compounds, Mangiferin and Its Glucoside. *Biol. Pharm. Bull.*, 1389-1390.

142. Miura T, Ichiki H, Hashimoto I et al (2001). Antidiabetic activity of xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine.* 8, 85-87.

143. Nguyễn Thị Hương Giang (2004). *Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của mangiferin chiết xuất từ Tri Mẫu (Anemarrhena Asphodeloides Bunge) trên chuột nhắt trắng*, Luận văn thạc sĩ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

144. NK Hoa, DV Phan, ND Thuan et al (2004). Insulin secretion is stimulated by ethanol extract of *Anemarrhena asphodeloides* in isolated islet of healthy Wistar and diabetic Goto-Kakizaki Rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes.* 112(09), 520-525.

145. Toshihiro Miura, Naoki Iwamoto, Motoshi Kato et al (2001). The suppressive effect of mangiferin with exercise on blood lipids in type 2 diabetes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24(9), 1091-1091.
146. Phạm Hữu Điền (2011), Nghiên cứu tách chiết, đặc tính hóa sinh và tác dụng hạ Glucose máu của một số hoạt chất chiết từ thực vật dùng trong bài thuốc cổ truyền trên mô hình chuột béo phì và gây đái tháo đường thực nghiệm, *Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp Bộ, mã số B2010-17-275TD*, chủ biên, Bộ Giáo dục và đào tạo, Hà Nội.
147. WHO (2000). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. *Geneva*, 28-31.
148. Litchfield, Wilcoxon (1948). A simplified method of evaluating dose-effect experiment. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 99 – 113. .
149. Srinivasan K., Viswanad B and 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(4), 313-320.
150. Rivera-R.F., Gerardo N. Escalona-Cardoso, Leticia Garduno-Siciliano et al (2011). Antiobesity and Hypoglycaemic Effects of Aqueous Extract of *Ibervillea sonorae* in Mice Fed a High-Fat Diet with Fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011, 6.
151. Rammohan Subramanian, M Zaini Asmawi and Amirin Sadikun. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide.
152. Ayala Julio E., Bracy Deanna P., Malabanan C. et al (2011). Hyperinsulinemic-euglycemic clamps in conscious, unrestrained mice. *Journal of Visualized Experiments*(57).
153. Chiranthan N., Teekachunhatean S., Panthong A. et al (2013). Toxicity evaluation of standardized extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *J*

Ethnopharmacol. 149(1), 228-34.

154. Tạ Thành Văn (2013). Rối loạn chuyển hóa Carbohydrat, *Hóa sinh lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, 22-50.

155. Barry Sears, Mary Perry (2015). The role of fatty acids in insulin resistance *Lipids in Health and Disease.* 14(121), 1-9.

156. Ragheb R, Medhat AM (2011). Mechanisms of Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Muscle and Liver. . *J Diabetes Metab* 2(4), 1-5.

157. Venables M.C, Jeukendrup A.E (2009). Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 25(1), S18-23.

158. Islam M. S., Venkatesan V. (2016). Experimentally-induced animal models of prediabetes and insulin resistance: A REVIEW. *Acta Pol Pharm.* 73(4), 827-834.

159. Nguyễn Thị Thanh Hà (2013). *Nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng hạ glucose máu của bài thuốc bồi mầu qua lâu trên thực nghiệm*, Luận văn thạc sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

160. Richard Harvey, Denise Ferrier (2011). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry* 5th, Richard A. Harvey, Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, 531.

161. Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner and Björn C. Knollmann (2018). Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13th Edition, The McGraw-Hill Education, 863-886.

162. Suzuki Y., Unno T., Ushitani M. et al (1999). Antiobesity activity of extracts from *Lagerstroemia speciosa* L. leaves on female KK-Ay mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 45(6), 791-5.

163. Hanhineva K., Torronen R. I., Bondia-Pons et al (2010). Impact of dietary

- polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 11(4), 1365-402.
164. Charisse M. Orme, Jonathan S. Bogan (2009). Sorting Out Diabetes. *Science.* 324(5931), 1155.
165. Ceriello A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes.* 54(1), 1-7.
166. Megalli S., Davies N. M. and Roufogalis B. D. (2006). Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. *J Pharm Pharm Sci.* 9(3), 281-91.
167. Andrikopoulos S., Blair A. R., Deluca N. et al (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(6), E1323-32.
168. Bộ Y tế (2009). *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Hà Nội, 18.
169. N. K. Hoa, D. V. Phan, N. D. Thuan et al (2009). Screening of the hypoglycemic effect of eight Vietnamese herbal drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 31(3), 165-9.
170. Muniyappa R., Chen H., Muzumdar R. H. et al (2009). Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity/resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(5), E1023-9.
171. Ayala J. E., Samuel V. T., Morton G. J. et al (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 3(9-10), 525-34.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: Quy trình sản xuất viên nang

PHỤ LỤC 2: Tiêu chuẩn viên nang cứng Andiabet