

UBND TỈNH HẢI DƯƠNG  
SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

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

(Nếu nhiệm vụ có mang nội dung bí mật nhà nước,  
đóng dấu xác định độ mật của nhiệm vụ tại đây)

Hải Dương, ngày 30 tháng 06 năm 2016

**PHIẾU THÔNG TIN NHIỆM VỤ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ ĐANG TIẾN HÀNH  
SỬ DỤNG NGÂN SÁCH NHÀ NƯỚC**

1	Tên Đề tài/Dự án: <b>Nghiên cứu tác dụng hạ đường huyết của cao khô thân cây chuối tiêu (Musa paradisiaca. L) ứng dụng trong hỗ trợ điều trị đái tháo đường typ 2</b>				
2	Cấp quản lý nhiệm vụ:	<input type="checkbox"/> Quốc gia	<input type="checkbox"/> Bộ	<input checked="" type="checkbox"/> Tỉnh	<input type="checkbox"/> Cơ sở
3	Mức độ bảo mật:	<input checked="" type="checkbox"/> Bình thường	<input type="checkbox"/> Mật	<input type="checkbox"/> Tối mật	<input type="checkbox"/> Tuyệt mật
4	Mã số nhiệm vụ (nếu có):				
5	Tên tổ chức chủ trì: <b>CAO ĐẲNG DUYỆC TW – HẢI DƯƠNG</b> Họ và tên thủ trưởng: TS. Nguyễn Thị Hương – Hiệu trưởng Tỉnh/thành phố: Hải Dương Địa chỉ: số 324 đường Nguyễn Lương Bằng, thành phố Hải Dương Fax: 03203890486 Điện thoại: 03203890486 Website: www. Duoctu-hd.edu.vn				
6	Cơ quan chủ quản: UBND tỉnh Hải Dương				
7	Chủ nhiệm nhiệm vụ: Họ và tên: Nguyễn Thị Đông Giới tính: Nữ Trình độ học vấn: Thạc sĩ Chức danh khoa học: Thạc sĩ Chức vụ: Phó trưởng phòng QLKHCHN&HTQT Điện thoại: 0913155272 Fax: E-mail: dong_dhd@yahoo.com				
8	Danh sách cá nhân tham gia đề án (ghi họ tên, chức danh khoa học và học vị): Nguyễn Thị Đông, Thạc sĩ Trần Bá Kiên, Tiến sĩ Vũ Thị Minh Thu, Dược sĩ Đỗ Văn Khái, Dược sĩ Nguyễn Thị Hương, Tiến sĩ Phùng Thanh Hương P.Giáo sư Nguyễn Thị Thanh Nhài, Thạc sĩ Bùi Xuân Khoa, Thạc sĩ Nguyễn Xuân Trục, BSKH II Đào Thị Hoài Thu, Thạc sĩ				
9	<b>Mục tiêu nghiên cứu:</b> - Đánh giá được tác dụng, cơ chế tác dụng hạ glucose máu của cao toàn phần thân cây chuối tiêu trên động vật thực nghiệm. - Nghiên cứu được thành phần hóa học, độc tính của cao toàn phần thân cây chuối tiêu. - Nghiên cứu bào chế được thực phẩm chức năng dưới dạng viên nang cứng - Đánh giá được tác dụng của viên nang thực phẩm chức năng trên bệnh nhân đái tháo đường typ 2.				

10	<p><b>Tóm tắt nội dung nghiên cứu chính trong năm 2016:</b></p> <p><b>1. Đánh giá được tác dụng, cơ chế tác dụng hạ glucose máu của cao toàn phần thân cây chuối tiêu trên động vật thực nghiệm</b></p> <p>- <b>Đánh giá tác dụng hạ glucose máu của cao toàn phần thân cây chuối tiêu trên chuột ĐTĐ typ 2 thực nghiệm.</b></p> <p>- <b>Chỉ số đánh giá:</b> Nồng độ glucose máu trước và sau điều trị.</p> <p><b>2. Đánh giá ảnh hưởng trên khả năng dung nạp glucose của chuột ĐTĐ typ 2.</b></p> <p>- <b>Chỉ tiêu đánh giá:</b></p> <p>+ Nồng độ glucose máu tại các thời điểm 0, 30, 60, 90, 120 phút sau khi uống dung dịch glucose;</p> <p>+ Diện tích dưới đường cong (AUC) để đánh giá mức độ dung nạp glucose của chuột cống trắng bị đái tháo đường typ 2.</p> <p><b>3. Xác định được cơ chế hạ glucose máu của cao toàn phần thân cây chuối tiêu</b></p> <p>- <b>Trên mô hình chuột tăng glucose máu thực nghiệm bởi STZ</b></p> <p>+ <b>Chỉ tiêu đánh giá:</b></p> <p>* Nồng độ insulin máu;</p> <p>* Hoạt độ G6Pase gan.</p> <p>- <b>Trên chuột ĐTĐ typ 2 thực nghiệm</b></p> <p>+ <b>Chỉ tiêu đánh giá:</b></p> <p>* Nồng độ glucose máu;</p> <p>* Nồng độ insulin huyết thanh;</p> <p>* Hoạt độ G6Pase gan;</p> <p>* Đánh giá mức độ hoạt hóa AMPK ở mô đích của insulin (gan, cơ, mỡ);</p> <p>* Đánh giá mức độ hoạt hóa của IRS1, một protein quan trọng đối với quá trình; truyền tín hiệu của insulin ở mô đích (gan, cơ, mỡ);</p> <p>* Tình trạng đại thể và vi thể mô tụy.</p> <p>- <b>Trên các mô hình in vitro</b></p> <p>+ <b>Tác dụng in vitro trên enzym tinh khiết</b></p> <p>* <b>Chỉ tiêu đánh giá:</b></p> <p>Trên hoạt độ PTP1B, một protein quan trọng ảnh hưởng đến tác dụng của insulin.</p> <p>+ <b>Tác dụng in vitro trên dòng tế bào</b></p> <p>Đánh giá tác dụng <i>in vitro</i> trên biểu hiện gen và biểu hiện protein của một số protein quan trọng (AMPK, ACC, Akt, IRS1, PPAR<math>\gamma</math>, GLUT4) trên một số dòng tế bào chuyên biệt.</p> <p><b>4. Nghiên cứu thành phần hóa học, độc tính của cao toàn phần thân cây chuối tiêu.</b></p> <p><b>4.1. Nghiên cứu thành phần hóa học</b></p> <p>- Chiết xuất các phân đoạn dịch chiết để thu căn phân đoạn</p> <p>- Thử tác dụng của căn phân đoạn trên chuột đã gây đái tháo đường bởi STZ 150 mg/kg.</p> <p>- Xác định thành phần hóa học và phân lập hoạt chất trong phân đoạn có tác dụng hạ glucose huyết mạnh nhất</p> <p>* <b>Chỉ tiêu đánh giá:</b></p> <p>+ Sự dương tính của các phản ứng hóa học đặc trưng cho từng nhóm chất;</p> <p>+ Các vết chất tách trên sắc ký lớp mỏng;</p> <p>+ Sắc ký đồ trên HPLC với cột Restek Ultra C18;</p> <p>+ Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối lượng phun mù electron (ESI-MS). Phổ khối (MS) khối lượng phân tử m/z.</p> <p><b>4.2. Độc tính</b></p> <p>* <b>Chỉ tiêu đánh giá</b></p> <p>+ <b>Độc tính cấp:</b> quan sát các biểu hiện ngộ độc của chuột, đếm số chuột chết, từ đó nếu có chuột chết sẽ tính được LD 50.</p> <p>+ <b>Độc tính bán trường diễn:</b></p> <p>Cho thỏ uống liên tiếp trong 28 ngày liều sử dụng bình thường. Theo dõi về các chỉ số hóa sinh, thức ăn, nước uống, cân nặng của thỏ.</p>
----	--

11	<b>Lĩnh vực nghiên cứu<sup>(3)</sup>:</b> Khoa học Y Dược
12	<p><b>Mục tiêu kinh tế xã hội của nhiệm vụ<sup>(4)</sup>:</b></p> <p><b>1 Đối với lĩnh vực KH&amp;CN có liên quan</b>  Đề tài góp phần đào tạo và nâng cao trình độ cũng như kinh nghiệm cho đội ngũ cán bộ tham gia đề tài về phương pháp luận và thực tiễn trong nghiên cứu phát triển thuốc chữa bệnh đi từ dược liệu một hướng đi đang được Đảng và nhà nước rất quan tâm</p> <p><b>2 Đối với tổ chức chủ trì và các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu</b>  + <b>Bồi dưỡng, đào tạo cán bộ KH&amp;CN:</b> Trong quá trình thực hiện đề tài, chúng tôi dự kiến sẽ đào tạo 01 tiến sĩ Dược học, 02 thạc sĩ dược học, 03 dược sĩ đại học và tạo điều kiện cho một số sinh viên và cán bộ khác tham gia nghiên cứu và làm thực nghiệm khoa học.  + Các cơ sở ứng dụng kết quả nghiên cứu sẽ có cơ sở khoa học để triển khai, phát triển sản phẩm mới, an toàn hiệu quả trong điều trị đái tháo đường trong và ngoài tỉnh.</p> <p><b>3 Đối với kinh tế - xã hội và môi trường</b>  + Các kết quả nghiên cứu khá toàn diện về cây chuối tiêu rất phổ biến trên địa bàn tỉnh Hải Dương nói chung và trên cả nước nói riêng là cơ sở để đưa vào sử dụng trong lâm sàng cho việc điều trị các bệnh nhân đái tháo đường ở trong và ngoài tỉnh. Từ nguồn nguyên liệu phế phẩm vô cùng nhiều, dễ kiếm sẽ tạo ra được nguồn dược liệu phong phú, sản phẩm thực phẩm chức năng viên nang cứng sẽ thuận lợi cho bệnh nhân sử dụng và giá thành sẽ hạ hơn nhiều so với các sản phẩm cùng loại trên thị trường hiện nay, không những thế những người nông dân trồng chuối tiêu có thêm thu nhập từ việc cung cấp thân cây chuối tiêu sau khi thu hoạch quả để làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị đái tháo đường typ 2.  + Đề tài được thực hiện sẽ góp phần nâng cao nhận thức và năng lực khai thác, sử dụng các dược liệu trong phòng và chữa bệnh nói chung, phù hợp với định hướng của chính phủ về sự phát triển nền y học cổ truyền với sự hỗ trợ của khoa học hiện đại</p>
13	<p><b>Phương pháp thực hiện:</b></p> <p><b>- Điều chế mẫu nghiên cứu</b>  Trước khi thu mẫu, tiến hành định danh khoa học, lưu mẫu tại Bộ môn Thực vật, trường Đại học Dược Hà Nội</p> <p>Điều chế mẫu nghiên cứu: thân cây chuối tiêu được cắt khúc nhỏ sau đó ép kiệt lấy dịch, cắt quay chân không áp suất giảm (160mHg) thu được cặn, đem sấy cặn ở 30-40<sup>0</sup> C, dưới áp suất giảm, thu được cao khô toàn phần (gọi tắt là cao toàn phần). Cao toàn phần được hòa tan bằng nước cất theo tỷ lệ khác nhau và tiến hành thử nghiệm [17].</p> <p><b>- Phương pháp đánh giá tác dụng hạ glucose máu của cao toàn phần thân cây chuối tiêu trên động vật thực nghiệm</b></p> <p><b>+ Trên chuột nhắt trắng tăng glucose máu thực nghiệm bởi STZ</b></p> <p><b>a) Gây mô hình tăng glucose máu thực nghiệm:</b> Sử dụng STZ tiêm màng bụng dung dịch trong đệm citrat (pH 4,5) với liều 150 mg/kg chuột nhắt. 72 giờ sau khi tiêm STZ, lựa chọn chuột có glucose máu lớn hơn 11,0 mmol/L, là chuột tăng glucose máu thực nghiệm.</p> <p><b>b) Bố trí thí nghiệm</b>  Chuột tăng glucose máu thực nghiệm được cho uống dung dịch cao toàn phần thân cây chuối liên tục 15 ngày với các liều khác nhau. Tiến hành so sánh cùng điều kiện với lô không điều trị, lô chứng dương gliclazid (20 mg/kg) và lô chứng dương metformin (240 mg/kg).</p> <p>Mô hình thực nghiệm này được áp dụng với các chỉ tiêu đánh giá là:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nồng độ glucose máu;</li> <li>- Nồng độ insulin huyết thanh;</li> <li>- Hoạt độ G6Pase gan.</li> </ul> <p><b>+ Trên chuột cống trắng gây ĐTĐ typ 2 thực nghiệm</b></p> <p><b>a) Gây mô hình ĐTĐ typ 2 thực nghiệm</b>  Sử dụng mô hình gây ĐTĐ thực nghiệm kiểu ĐTĐ typ 2 dựa trên chế độ ăn giàu chất béo kết</p>

hợp với STZ liều thấp của Leelavinothan, Vicker S.P [22], [30]. Mô hình này đã được triển khai bởi một số tác giả Việt Nam, gồm hai bước [3], [4], [10].

**Bước 1: Gây kháng insulin bằng chế độ ăn giàu chất béo**

Chuột công đực trắng chưa trưởng thành có cân nặng trung bình 80g được nuôi bằng chế độ ăn giàu lipid với 60% tổng số calorie của khẩu phần ăn là chất béo được tính theo bảng thành phần dinh dưỡng thực phẩm Việt Nam của Viện Dinh Dưỡng. Tiến hành trong cùng điều kiện 1 lô đối chứng là chuột bình thường được ăn chế độ ăn chứa 12% tổng số calo của khẩu phần ăn là chất béo (bảng 3.1). Cả hai lô chuột được cho ăn với hai loại thức ăn tương ứng trong vòng 60 ngày.

**Bảng 3.1. Thành phần dinh dưỡng trong khẩu phần ăn của chuột thí nghiệm [11].**

Dinh dưỡng Loại thức ăn	Carbohydrat	Protein	Chất béo	Các thành phần khác
Thức ăn của lô chuột thường	60%	20%	12%	8%
Thức ăn giàu chất béo	20%	19%	60%	1%

(Tỷ lệ % tính theo calorie tổng số)

**Bước 2: Gây ĐTD cho chuột đã bị kháng insulin**

Tiêm màng bụng dung dịch STZ với liều 50mg/kg (pha trong đệm citrat pH=4,5) cho nhóm chuột ăn chế độ ăn giàu chất béo. Sau 72 giờ lấy máu tĩnh mạch đuôi chuột định lượng glucose máu lúc đói của chuột (chuột đã nhịn đói 10 giờ). Những chuột có glucose máu trên 11 mmol/L được lựa chọn là chuột ĐTD typ 2 thực nghiệm.

**b) Bố trí thí nghiệm**

**+ nh hưởng của cao toàn phần thân cây chuối tiêu trên chuột công đực trắng gây ĐTD typ 2 thực nghiệm**

Chuột ĐTD typ 2 thực nghiệm được cho uống dung dịch cao toàn phần thân cây chuối liên tục 15 ngày với các liều khác nhau. Tiến hành so sánh cùng điều kiện với lô không điều trị và lô chứng dương metformin (120 mg/kg).

Mô hình thực nghiệm này được áp dụng với các chỉ tiêu đánh giá là:

- \* Nồng độ glucose máu;
- \* Nồng độ insulin huyết thanh;
- \* Hoạt độ G6Pase gan;
- \* Đánh giá mức độ hoạt hóa AMPK ở những mô đích của insulin (gan, cơ, mỡ);
- \* Đánh giá mức độ hoạt hóa của IRS1, một protein quan trọng đối với quá trình truyền tín hiệu của insulin ở mô đích (gan, cơ, mỡ);
- \* Tình trạng đại thể và vi thể mô tụy.

**+ nh hưởng của cao toàn phần thân cây chuối tiêu trên khả năng dung nạp glucose của chuột công đực trắng gây ĐTD typ 2 thực nghiệm**

Chuột đã gây ĐTD typ 2 thực nghiệm được cho uống dung dịch cao toàn phần thân cây chuối liên tục 15 ngày với các liều khác nhau. Tiến hành so sánh cùng điều kiện với lô không điều trị và lô chứng dương metformin (240 mg/kg).

Sau khi kết thúc 15 ngày điều trị, cho chuột nhịn đói 10 giờ, sau đó cho uống dung dịch glucose liều 3g/kg thể trọng (glucose dùng pha dung dịch ở dạng khan, thể tích cho uống là 0,2mL/50g chuột). Định lượng glucose máu sau khi uống dung dịch glucose ở các thời điểm  $t_0=0$  phút;  $t_{30}=30$  phút;  $t_{60}=60$  phút,  $t_{90}=90$  phút và  $t_{120}=120$  phút. Vẽ đồ thị. Ảnh hưởng lên sự dung nạp glucose của chuột ĐTD typ 2 được đánh giá bằng diện tích dưới đường cong (AUC) glucose máu trong 120 phút thí nghiệm [24], [28].

**- Phương pháp đánh giá tác dụng in vitro**

**+ Tác dụng in vitro trên enzym tinh khiết**

Trên hoạt độ PTP1B, một protein quan trọng ảnh hưởng đến tác dụng của insulin, đánh giá khả năng ức chế PTP1B của cao toàn phần bằng cách ủ mẫu thử ở các nồng độ khác nhau với PTP1B trong điều kiện thích hợp, sau đó đánh giá sự thay đổi hoạt độ PTP1B, xác định IC<sub>50</sub>.

**+ Tác dụng in vitro trên dòng tế bào**

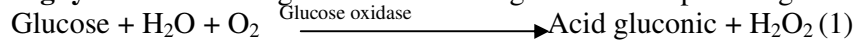
Đánh giá tác dụng *in vitro* trên biểu hiện gen và biểu hiện protein của một số protein quan trọng (AMPK, IRS1, PPAR $\gamma$ , GLUT4) trên một số dòng tế bào chuyên biệt sau khi ủ với mẫu thử.

#### - Các kỹ thuật định lượng

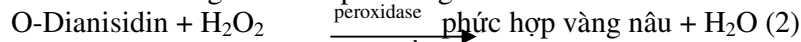
##### + Định lượng glucose máu

Tiến hành theo phương pháp glucose oxidase dựa trên mô tả của Yuen và Mc Neill với máy đo glucose máu Accu-Check Active và bộ kit tương ứng của Roche-Đức[25]

**Nguyên tắc:** oxi hóa glucose thành acid gluconic theo phản ứng



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tạo thành bị peroxidase phân hủy, giải phóng oxi, oxy hóa o-dianisidin để tạo thành phức chất có màu vàng nâu theo phản ứng .



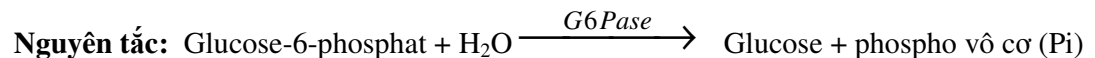
Cường độ màu được xác định bằng phương pháp đo quang tương ứng với lượng glucose cần định lượng. Máu để định lượng glucose máu là máu toàn phần lấy từ tĩnh mạch đuôi chuột sau khi đã bỏ đi giọt đầu tiên.

##### + Định lượng insulin huyết thanh

Theo phương pháp định lượng hấp phụ miễn dịch liên kết enzym 2 lớp (sandwich ELISA) với bộ sinh phẩm định lượng insulin chuột (Ultrasensitive Rat ELISA kit của hãng Crystal Chem).

**Nguyên tắc:** insulin trong mẫu thử phản ứng với kháng thể kháng insulin liên kết với enzym peroxidase và kháng thể kháng insulin cố định trên giếng phản ứng. Sau khi rửa để loại bỏ các kháng thể không gắn, phát hiện các kháng thể gắn bằng phản ứng với 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Dùng phản ứng bằng dung dịch acid sulfuric 1N, đo màu ở bước sóng 450 nm và 630 nm [32].

##### + Xác định hoạt độ enzym G6Pase gan



Phospho vô cơ được xác định theo kỹ thuật của Fiske và Subbarow [23].

Hoạt độ của G6Pase được tính bằng lượng phospho vô cơ sinh ra trong 1 phút trên 1mg protein gan ở điều kiện nhiệt độ 37<sup>0</sup>C, pH 6,5. Hàm lượng protein trong gan được định lượng bằng phương pháp Lowry[16].

##### Tiến hành:

\* Cân 1g gan chuột, cắt thành các miếng nhỏ, sau đó cho vào ống nghiệm đồng thể đã có sẵn 1mL dung dịch đệm lạnh (đệm citrat pH=6,5). Nghiền gan trong điều kiện lạnh (nhiệt độ dưới 4<sup>0</sup>C) đến khi thu được dung dịch đồng thể, sau đó thêm đệm lạnh để được tỉ lệ 1:5. Dịch nghiền thu được đem ly tâm lạnh ở 0<sup>0</sup>C với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 10 phút, lấy dịch trong tiếp tục ly tâm lạnh tốc độ 10.000 vòng/phút trong vòng 30 phút. Phần dịch trong thu được sau khi ly tâm được dùng để xác định hoạt độ enzym.

\* Phản ứng được tiến hành trong ống nghiệm 5mL gồm: 0,5mL đệm citrat (0,1M, pH 6,5); 0,2 mL nước cất; 0,1 mL cơ chất. Dung dịch enzym và dung dịch cơ chất được ủ ở 37<sup>0</sup>C trong 10 phút. Thời gian phản ứng được tính từ lúc thêm 0,2 mL dịch enzym. Tiếp tục ủ trong 10 phút ở 37<sup>0</sup>C. Sau đó thêm 2 mL acid tricloacetic (TCA) 10% để dừng phản ứng, lắc kỹ, để yên 5 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu được dịch trong làm thí nghiệm xác định phospho vô cơ. Khảo sát sự tương quan giữa mật độ quang và lượng phospho vô cơ và tính kết quả.

\* Tiến hành tương tự với mẫu đối chứng thay cơ chất bằng nước cất; mẫu trắng thay cơ chất và dịch chiết enzym bằng nước cất.

##### + Định lượng protein toàn phần trong dịch nghiền gan

Dựa trên phương pháp Lowry[16].

**Nguyên tắc:** Phức chất đồng - protein khử hỗn hợp phosphomolipden - phosphovonphramat (thuốc thử Folin – Ciocalteu) tạo phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 660nm.

Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào mức độ hấp thụ quang của protein chuẩn, có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

**+ Đánh giá khả năng ức chế protein tyrosin phosphatase 1B (PTP1B)**

**Nguyên tắc:** Dựa vào phản ứng loại nhóm phosphat ở phân tử tyrosin đã được phosphoryl hóa (pTyr 1158) trong tiểu đơn vị beta của insulin receptor dưới tác dụng của protein tyrosin phosphatase 1B (PTP1B). Cụ thể, trong thí nghiệm này cơ chất của PTP1B được sử dụng là một đoạn polypeptid của tiểu đơn vị beta của insulin receptor trong đó phân tử tyrosin 1158 đã được phosphoryl hóa (cơ chất này được đặt tên là IR5). Phân phospho tự do (Pi) tạo ra từ phản ứng này được định lượng dựa trên phản ứng giữa xanh malachit, ammonium molybdat và Pi trong môi trường acid [13], [19],[21].

Định lượng xanh malachit phosphomolybdat tạo thành bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 620nm. Lượng xanh malachit phosphomolybdat tạo thành tỷ lệ với lượng Pi có trong hỗn hợp phản ứng.

**+ Đánh giá tác dụng hoạt hóa AMPK**

5'AMPK (AMP activated protein kinase) là một enzym có vai trò chủ chốt trong điều hòa chuyển hóa năng lượng của tế bào. AMPK được hoạt hóa khi phân tử Thr172 trên tiểu đơn vị  $\alpha$  của AMPK được phosphoryl hóa. Khi AMPK được hoạt hóa sẽ gây bất hoạt ACC (ACC bất hoạt, được gọi tắt là p-ACC, khi phosphoryl hóa phân tử Ser 49 trên ACC). Đánh giá tác dụng hoạt hóa AMPK của cao chiết toàn phần thân cây chuỗi tiêu dựa trên mức độ biểu hiện total AMPK, p-AMPK, p-ACC ở tế bào bằng kỹ thuật Western Blot. Kỹ thuật này được áp dụng cho cả thực nghiệm *in vivo* (trên tế bào mô gan, cơ, mỡ) và thực nghiệm *in vitro* (trên một số dòng tế bào).

**+ Đánh giá mức độ hoạt hóa IRS1**

IRS1 là một protein quan trọng trong con đường truyền tín hiệu của insulin ở tế bào đích. Sự hoạt hóa IRS1 thể hiện sự tăng tác dụng của insulin ở mô đích. IRS1 được hoạt hóa khi tăng phosphoryl hóa ở phân tử Tyr và giảm phosphoryl hóa ở phân tử Ser 307. Đánh giá mức độ hoạt hóa IRS1 thông qua mức độ biểu hiện của các protein: total IRS1, Tyr p-IRS1, Ser307 p-IRS1. Sử dụng kỹ thuật Western Blot với kháng thể đặc hiệu. Kỹ thuật này được áp dụng cho cả thực nghiệm *in vivo* (trên tế bào mô gan, cơ, mỡ) và thực nghiệm *in vitro* (trên một số dòng tế bào).

**+ Đánh giá mức độ biểu hiện gen và biểu hiện protein in vitro**

Đánh giá tác dụng *in vitro* trên biểu hiện gen và biểu hiện protein của một số protein quan trọng (AMPK, IRS1, PPAR $\gamma$ , GLUT4) trên một số dòng tế bào chuyên biệt sau khi ủ với mẫu thử. Sử dụng kỹ thuật RT-PCR với mỗi đặc hiệu để đánh giá mức độ biểu hiện gen (định lượng mRNA). Sử dụng kỹ thuật Western Blot với kháng thể đặc hiệu để đánh giá mức độ biểu hiện protein.

Các thực nghiệm này được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học - Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

**- Kỹ thuật xét nghiệm mô bệnh học**

Bệnh phẩm tươi có bề dày 3 mm bảo quản trong formol sau đó được cố định bằng dung dịch Bouin, chuyển đúc trong parafin, tiếp tục được cắt thành những tiêu bản có bề dày 3  $\mu$ m và nhuộm theo phương pháp hematoxylin-eosin (HE) thường quy. Nhân tế bào bắt màu xanh đen, bào tương bắt màu hồng. Các tiêu bản được đọc dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần để đánh giá tổn thương với phương pháp mù đơn (người đọc không được biết ký hiệu của các lô chuột thực nghiệm).

Kỹ thuật vi thể được thực hiện tại bộ môn Giải phẫu bệnh trường ĐH Y Hà Nội.

**- Các phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học của cao toàn phần thân cây chuỗi tiêu**

+ Định tính các nhóm chất hóa học bằng phản ứng đặc trưng

+ Sắc ký lớp mỏng: được triển khai trong hệ dung môi thích hợp, quan sát các vết sắc ký dưới ánh sáng tử ngoại ở 2 bước sóng  $\lambda=254$  nm,  $\lambda=366$  nm và sau khi phun thuốc thử vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc

+ Phân lập các chất bằng phương pháp sắc ký cột pha đảo (HPLC).

Điều kiện sắc ký: Nhiệt độ: 30<sup>0</sup>C, cột Restek Ultra C18, kích cỡ hạt nhỏ 5 $\mu$ m, tốc độ dòng 0,5ml/phút. Hệ dung môi Acetonitril: H<sub>2</sub>O: MeOH (tỷ lệ phù hợp)

	<p>+ Xác định cấu trúc của các chất phân lập được bằng phương pháp phân tích phổ bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối lượng phun mù electron (ESI-MS). Khối lượng phân tử m/z của các chất được phân lập được so sánh với dữ liệu phổ đã công bố để kết luận các chất được phân lập.</p> <p><b>- Xử lý số liệu</b></p> <p>Kết quả được biểu diễn dưới dạng <math>X_{TB} \pm SE</math> (<math>X_{TB}</math>: giá trị trung bình của từng lô, SE: sai số chuẩn). Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 21 (test thống kê Anova) để so sánh sự khác biệt giữa các lô. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi <math>p &lt; 0,05</math>. Sử dụng phần mềm Statistical analysis để tính diện tích dưới đường cong AUC glucose trong test dung nạp glucose đường uống của chuột cống ĐTĐ typ 2.</p> <p><b>Tính mới, tính độc đáo, tính sáng tạo:</b></p> <p>+ Các kết quả nghiên cứu khá toàn diện về cây chuối tiêu rất phổ biến trên địa bàn tỉnh Hải Dương nói chung và trên cả nước nói riêng là cơ sở để đưa vào sử dụng trong lâm sàng cho việc điều trị các bệnh nhân đái tháo đường ở trong và ngoài tỉnh. Từ nguồn nguyên liệu phế phẩm vô cùng nhiều, dễ kiếm sẽ tạo ra được nguồn dược liệu phong phú, sản phẩm thực phẩm chức năng viên nang cứng sẽ thuận lợi cho bệnh nhân sử dụng và giá thành sẽ hạ hơn nhiều so với các sản phẩm cùng loại trên thị trường hiện nay, không những thế những người nông dân trồng chuối tiêu có thêm thu nhập từ việc cung cấp thân cây chuối tiêu sau khi thu hoạch quả để làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị đái tháo đường typ 2.</p> <p>+ Sản phẩm thực phẩm chức năng chữa đái tháo đường có thể chuyển giao công nghệ nhằm đa dạng hóa sản phẩm của Hải Dương có nguồn gốc thiên nhiên an toàn, hiệu quả và giá thành hợp lý dùng cho người bệnh đái tháo đường ở Việt Nam nói chung.</p> <p>+ Đề tài được thực hiện sẽ góp phần nâng cao nhận thức và năng lực khai thác, sử dụng các dược liệu trong phòng và chữa bệnh nói chung, phù hợp với định hướng của chính phủ về sự phát triển nền y học cổ truyền với sự hỗ trợ của khoa học hiện đại.</p>
14	<p><b>Sản phẩm khoa học và công nghệ dự kiến:</b></p> <p>Ít nhất có 01 chất tinh khiết phân lập được</p> <p>Mẫu chế phẩm thực phẩm chức năng</p> <p>Quy trình chiết tách hoạt chất</p> <p>Tiêu chuẩn kỹ thuật của chế phẩm</p>
15	<p><b>Địa chỉ và quy mô ứng dụng dự kiến:</b></p> <p>Sản phẩm thực phẩm chức năng chữa đái tháo đường có thể chuyển giao công nghệ nhằm đa dạng hóa sản phẩm của Hải Dương có nguồn gốc thiên nhiên an toàn, hiệu quả và giá thành hợp lý dùng cho người bệnh đái tháo đường ở Việt Nam nói chung.</p>
16	Thời gian thực hiện: 2016
17	<p>Kinh phí được phê duyệt: Tổng kinh phí: 866.000.000 đ</p> <p>- Kinh phí năm 2016: 493.000.000 đồng</p> <p>- Kinh phí năm 2017: 373.000.000 đồng</p>
18	Quyết định phê duyệt: số 235/QĐ-UBND ngày 19 tháng 01 năm 2016
19	Hợp đồng thực hiện: số 19/2016/HĐ-YD ngày 22/ 01/ 2016