

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đào Thị Sinh

**NGHIÊN CỨU GEN *SLC2a2* TRÊN ĐỐI TƯỢNG BỆNH NHÂN
MẮC TIỂU ĐƯỜNG TUÝP 2 TẠI VIỆT NAM ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ
VỚI GLICLAZIDE VÀ METFORMIN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Hà Nội – 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đào Thị Sinh

**NGHIÊN CỨU GEN *SLC2a2* TRÊN ĐỐI TƯỢNG BỆNH NHÂN MẮC
TIỂU ĐƯỜNG TUÝP 2 TẠI VIỆT NAM ĐƯỢC ĐIỀU TRỊ VỚI
GLICLAZIDE VÀ METFORMIN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. TRƯƠNG NGỌC MINH

2. TS. NGUYỄN MINH ĐỨC

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu dưới sự hướng dẫn khoa học của TS.Trương Ngọc Minh và TS.Nguyễn Minh Đức. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Đào Thị Sinh

LỜI CẢM ƠN

Để có được thành quả ngày hôm nay, với tất cả tình cảm, sự kính trọng và lòng biết ơn sâu sắc, em xin chân thành gửi lời cảm ơn đến:

***TS. Trương Ngọc Minh và TS. Nguyễn Minh Đức**, hai thầy đã trực tiếp hướng dẫn, dành nhiều thời gian và kinh nghiệm quý báu chỉ bảo em trong suốt quá trình thực hiện khóa luận tốt nghiệp.*

Các thầy cô của Viện nghiên cứu hệ gen, thuộc Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện để em thực hành và hoàn thiện luận văn tốt nghiệp.

*Em xin gửi lời cảm ơn tới **Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo** của Học viện Khoa học và Công nghệ, thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn đồng hành và tạo điều kiện thuận lợi cho em trong suốt quá trình học tập.*

*Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến các anh chị em đồng nghiệp tại **Trung tâm Hỗ trợ sinh sản - Bệnh viện Đa khoa Hồng Ngọc** đã tạo điều kiện để em được đi học và giúp đỡ nhiệt tình trong công việc để em hoàn thành chương trình học.*

Và cuối cùng, em xin được gửi lời cảm ơn tới cha mẹ, chồng, các con và những người thân trong gia đình cũng như bạn bè của em vì đã luôn quan tâm, chia sẻ và động viên trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Em xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	viii
Bảng 2.1 Các cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu.....	viii
DANH MỤC HÌNH ẢNH.....	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1 Bệnh tiểu đường và tiểu đường tuýp 2.....	3
1.1.1 Khái niệm bệnh tiểu đường.....	3
1.1.2 Phân loại tiểu đường.....	3
1.1.3 Cơ chế bệnh sinh của tiểu đường tuýp 2	4
1.1.3 Nguyên nhân dẫn đến tiểu đường tuýp 2	5
1.1.4 Biện chứng và phòng bệnh tiểu đường tuýp 2	5
1.2 Tình hình nghiên cứu về gen liên quan đến bệnh tiểu đường tuýp 2 trong nước và thế giới.....	6
1.2.1 Thế giới	6
1.2.2 Việt Nam	9
1.3 Gen <i>SLC2a2</i>	11
1.3.1 Định nghĩa.....	11
1.3.2 Cơ chế hoạt động.....	12
1.3.3 Gen <i>SLC2a2</i> và tiểu đường tuýp 2.....	13
1.4 Chẩn đoán và điều trị tiểu đường tuýp 2.....	14
1.4.1 Chẩn đoán.....	14
1.4.2 Điều trị tiểu đường tuýp 2.....	15
1.4.3 Một số loại thuốc phổ biến trong điều trị tiểu đường tuýp 2.....	15

1.4.3.1 <i>Metformin</i>	16
1.4.3.2 <i>Gliclazide</i>	17
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19
2.1. Đối tượng nghiên cứu	19
2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng.....	19
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng nghiên cứu.....	19
2.2. Vật liệu và hoá chất, thiết bị nghiên cứu	20
2.3. Phương pháp nghiên cứu	21
2.3.1 Tách chiết, tinh sạch RNA và DNA tổng số	21
2.3.2 Tổng hợp cDNA	24
2.3.3 Các cặp mồi trong nghiên cứu.....	25
2.3.4 Khuếch đại gen bằng phương pháp PCR.....	26
2.3.5 Điện di sản phẩm PCR	26
2.3.6 Giải trình tự gen Sanger.....	26
2.3.7 Phân tích mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> bằng phương pháp RT-PCR và Realtime-qPCR.....	27
2.4 Phân tích và xử lý số liệu	28
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1 Đặc điểm cơ bản và các chỉ số lâm sàng, sinh hoá của các nhóm nghiên cứu.....	30
3.1.1 Đặc điểm nhân trắc học cơ bản của các nhóm đối tượng nghiên cứu	30
3.1.2 Kết quả phân tích và so sánh các chỉ số lâm sàng và chuyển hoá của các nhóm nghiên cứu	31
3.2. Mức độ biểu hiện của gen <i>SLC2a2</i>	36
3.2.1 Mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng.....	36
3.2.2 Mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> giữa các nhóm bệnh nhân được	

chỉ định điều trị bằng Metformin và Gliclazide.....	39
3.2.3 Môi tương quan giữa mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> với các chỉ số sinh hoá và chuyển hoá trong nhóm bệnh nhân được điều trị	42
3.3 Trình tự gen <i>SLC2a2</i> và xác định các điểm xuất hiện đột biến trên gen.....	52
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	56
KẾT LUẬN	56
KIẾN NGHỊ	56
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC.....	57
TÀI LIỆU THAM KHẢO	58

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ADA	American Diabetes Association	Hiệp hội Tiểu đường Hoa Kỳ
ALT	Alanine transaminase	Chỉ số men gan
AST	Aspartate aminotransferase	Chỉ số men gan
BMI	Body mass index	Chỉ số khối cơ thể
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh
FPG	Fasting plasma glucose	Đường huyết lúc đói
TĐ		Tiểu đường
TĐT2		Tiểu đường tuýp 2
HbA1c	Hemoglobin A1c	Huyết sắc tố Glycated
HDL-C	High density lipoprotein Cholesterol	Cholesterol lipoprotein tỉ trọng cao
IDF	International Diabetes Federation	Hiệp hội Tiểu đường Thế giới
IFG	Impaired fasting glucose	Rối loạn glucose huyết lúc đói
IGT	Impaired glucose tolerance	Rối loạn dung nạp glucose
GLUT2	Glucose transporter 2	Protein vận chuyển glucose

LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol	Cholesterol lipoprotein tỷ trọng thấp
	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase	
MMLV-RT		Enzyme phiên mã ngược
	Noncommunicable diseases	Bệnh không lây nhiễm
NCDs		
	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PCR		
		Rối loạn dung nạp glucose
RLDNG		
	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribonucleic
rRNA		
	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược
RT-PCR		
	Randomized controlled clinical trials	Thử nghiệm lâm sàng đối chứng ngẫu nhiên
RCT		
	Solute carrier family 2 member 2	Gen vận chuyển glucose
<i>SLC2a2</i>		
	Single nucleotide polymorphism	Đa hình đơn gen nucleotide
SNP		
	Cholesterol total	Cholesterol toàn phần
TC		
	Triglyceride	Chỉ số mỡ máu
TG		
	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
WHO		
	Waist-to-hip ratio	Tỷ lệ eo/hông
WHR		

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1 Các cặp môi được sử dụng trong nghiên cứu.....	25
Bảng 3.1 Các đặc điểm cơ bản và chỉ số lâm sàng, chỉ số chuyên hoá của các nhóm.....	29
Bảng 3.2: Kết quả phân tích mối tương quan giữa các biến số và mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> ở các nhóm bệnh nhân tiểu đường tuýp 2	43
Bảng 3.3: Vị trí các đột biến trên exon của gen <i>SLC2a2</i>	54

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Cơ chế hoạt động của protein GLUT2.....	13
Hình 1.2: Cơ chế tác dụng của thuốc Metformin.....	17
Hình 1.3: Cơ chế tác dụng của thuốc Gliclazide	18
Hình 3.1: Kết quả phân tích sản phẩm RT-PCR bằng phần mềm.....	38
Hình 3.2: Phổ điện di sản phẩm RT - PCR của một số mẫu phân tích ...	38
Hình 3.3: Mức độ biểu hiện của gen <i>SLC2a2</i> của nhóm bệnh so với nhóm chứng	39
Hình 3.4: Đồ thị biểu diễn độ đặc hiệu của môi và mẫu dò thiết kế dựa trên các gen nghiên cứu.....	40
Hình 3.5: Tín hiệu huỳnh quang của các mẫu thuộc nhóm bệnh trên gen <i>SLC2a2</i>	40
Hình 3.6: Mức độ biểu hiện của gen <i>SLC2a2</i> trong các nhóm đối tượng được chỉ định sử dụng Metformin và Gliclazide	42
Hình 3.7: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> với chỉ số HbA1c (%) trong nhóm bệnh nhân được điều trị	46
Hình 3.8: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> với chỉ số FPB (mmol/L) trong nhóm bệnh nhân được điều trị	47
Hình 3.9: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> với chỉ số AST (U/L) trong nhóm bệnh nhân được điều trị.....	50
Hình 3.10: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen <i>SLC2a2</i> với chỉ số ALT (U/L) trong nhóm bệnh nhân được điều trị.....	51
Hình 3.11: Kết quả giải trình tự và so sánh của các điểm đột biến trên các mẫu với exon 5 và exon 9 của gen <i>SLC2a2</i>	53

MỞ ĐẦU

Bệnh tiểu đường (hay đái tháo đường) là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong và tàn tật trên thế giới. Bệnh có thể ảnh hưởng đến mọi độ tuổi và không phân biệt giới tính. Theo thống kê của Hiệp hội Tiểu đường thế giới (IDF), năm 2021 toàn thế giới có 537 triệu người trong độ tuổi 20-79 mắc bệnh tiểu đường, dự kiến con số này sẽ tăng tới 643 triệu người vào năm 2030 và 783 triệu người vào năm 2045. Tại khu vực Đông Nam Á ghi nhận 90 triệu người mắc tiểu đường và số người tử vong lên tới hơn 700 nghìn người trong năm 2021. Kết quả điều tra của Bộ Y tế năm 2021 cho thấy tại Việt Nam tỷ lệ mắc tiểu đường ở người trưởng thành ước tính là 7,1%, tương đương với khoảng gần 5 triệu người hiện đang mắc bệnh và con số này dự kiến sẽ còn tăng nhanh trong những năm tới. Đặc biệt có tới 65% số người mắc tiểu đường mà không được chẩn đoán. tiểu đường có thể chia thành 3 loại thường gặp bao gồm tiểu đường tuýp 1, tiểu đường tuýp 2 (TĐT2) và tiểu đường thai kỳ.

Trong đó, TĐT2 chiếm tới 90% trường hợp mắc tiểu đường. TĐT2 xuất hiện ở mọi lứa tuổi nhưng chủ yếu ở người trên 35 tuổi và ở những người có các yếu tố nguy cơ như béo phì, tăng huyết áp, rối loạn chuyển hóa lipid, ít vận động, chế độ ăn giàu carbohydrate. Bệnh TĐT2 có sự tác động qua lại giữa các yếu tố gen, yếu tố môi trường và tuổi. Trong đó, yếu tố di truyền đóng vai trò quan trọng đối với TĐT2.

Gen *Solute Carrier Family 2 Member 2 (SLC2a2)* mã hoá protein glucose transporters (GLUT2), là một trong những gen quan trọng có liên quan đến tiểu đường. GLUT2 được xác định là nằm trong tế bào gan và tế bào beta tuyến tụy, đóng vai trò trong việc lưu trữ đường hoặc chuyển đổi đường thành năng lượng. Mặc dù vai trò của gen *SLC2a2* đã được xác định là có liên quan đến tiểu đường, nhưng mỗi bệnh nhân có thể có những biểu hiện gen khác nhau, nên cơ chế và mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* đối với bệnh nhân tiểu đường vẫn đang được nghiên cứu để hiểu rõ hơn.

Hiện nay, một số loại thuốc đang được sử dụng phổ biến để điều trị tiểu

đường ở Việt Nam là Gliclazide và Metformin. Đây là các loại thuốc này có thể sử dụng độc lập hoặc kết hợp, trong đó, Gliclazide có tác dụng kích thích tuyến tụy tiết insulin, còn Metformin kiểm soát đường huyết bằng cách giảm sản xuất glucose từ gan để cơ thể sử dụng insulin hiệu quả. Việc phòng ngừa tiểu đường hiện tại vẫn đang là một thách thức, do đó, việc nghiên cứu sâu hơn về các gen liên quan đến bệnh tiểu đường trên các nhóm bệnh nhân khác nhau là vô cùng cần thiết.

Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài: **“Nghiên cứu gen *SLC2a2* trên đối tượng bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường tuýp 2 tại Việt Nam được điều trị với Gliclazide và Metformin”**. Kết quả của nghiên cứu sẽ giúp các nhà khoa học và bác sĩ hiểu hơn về vai trò của gen *SLC2a2* có liên quan đến bệnh TĐT2 nhằm củng cố thêm các dữ liệu khoa học trong việc nghiên cứu chuyên sâu hơn về bệnh TĐT2 và tăng tính hiệu quả hơn trong việc điều trị với người bệnh.

Đề tài được thực hiện với các mục tiêu:

- Phân tích mức độ biểu hiện gen *SLC2A2* ở các nhóm đối tượng nghiên cứu và đánh giá mối tương tác với các chỉ số lâm sàng và thông số sinh hoá;
- Xác định các đột biến trên gen *SLC2a2* trên nhóm đối tượng được chẩn đoán mắc tiểu đường tuýp 2.

Các nội dung chính của đề tài:

- Khảo sát mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* ở các nhóm nghiên cứu;
- Xác định mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* và các chỉ số lâm sàng, sinh hóa;
- Xác định trình tự gen *SLC2a2* và tìm kiếm các đột biến trên gen tại các nhóm nghiên cứu.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1 Bệnh tiểu đường và tiểu đường tuýp 2

1.1.1 Khái niệm bệnh tiểu đường

Tiểu đường được biết đến là bệnh mãn tính xảy ra khi tuyến tụy không sản xuất đủ insulin hoặc khi cơ thể không thể sử dụng insulin hiệu quả, dẫn đến tăng đường huyết. Tăng đường huyết nếu không kiểm soát được và dần dần đến tổn thương nghiêm trọng cho các cơ quan trong cơ thể [1]. Các dấu hiệu thường xuất hiện khi mắc bệnh tiểu đường bao gồm cảm giác tiểu tiện thường xuyên, cảm thấy khát nước liên tục dù vừa mới uống và tăng cảm giác đói hơn so với bình thường. Bệnh tiểu đường có thể gây ra nhiều hệ quả và tình trạng biến chứng, trong đó có các tình trạng biến chứng cấp tính như nhiễm toan ceton, tăng áp lực thẩm thấu và nguy cơ cao nhất là dẫn đến tử vong, cũng như các tình trạng biến chứng mãn tính khác như tim mạch, đột quỵ, bệnh thận, tổn thương thần kinh, mắt và suy giảm nhận thức [2].

1.1.2 Phân loại tiểu đường

Việc phân loại tiểu đường là quan trọng để xác định phác đồ điều trị, Hiệp hội Tiểu đường Hoa Kỳ (ADA) 2023 đã phân bệnh thành 4 loại [3], bao gồm:

- Tiểu đường tuýp 1 là một loại tiểu đường tự miễn, đặc trưng bởi sự tấn công của hệ thống miễn dịch vào tế bào beta trong tuyến tụy. Khi cơ thể không có hoặc sản xuất không đủ insulin, mức đường huyết sẽ tăng lên một cách không kiểm soát, gây ra tình trạng tiểu đường. Do tế bào beta bị phá hủy, để điều trị tiểu đường tuýp 1, bệnh nhân được yêu cầu phải tiêm insulin thường xuyên để duy trì mức đường huyết ổn định.
- Tiểu đường tuýp 2 (TĐT2) còn được gọi là tiểu đường không phụ thuộc vào insulin, là loại tiểu đường phổ biến nhất. Bệnh đặc trưng bởi mức đường huyết cao do cơ thể thiếu hụt hoặc kháng insulin. Khác với tiểu đường tuýp 1, những người mắc TĐT2 vẫn có thể sản xuất insulin, nhưng

insulin không được cơ thể sử dụng một cách hiệu quả. Kết quả là glucose tích tụ trong máu thay vì được tế bào hấp thụ để cung cấp năng lượng. TĐT2 thường phát triển từ từ theo thời gian và có thể không được chẩn đoán trong nhiều năm.

- Tiểu đường thai kỳ là tình trạng đường huyết tăng cao trong thời gian mang thai, được chẩn đoán trong 3 tháng giữa hoặc 3 tháng cuối của thai kỳ và không có bằng chứng về tiểu đường tuýp 1 hoặc tuýp 2 trước đó. Tuy nhiên, cả mẹ và con đều có nguy cơ mắc TĐT2 trong tương lai.
- Tiểu đường còn có những thể bệnh khác như do bất thường gen liên quan đến chức năng tế bào beta, bất thường gen liên quan đến hoạt tính insulin, bệnh lý tụy: viêm tụy, cắt tụy, xơ hóa nang, u tụy,..., bệnh nội tiết làm tăng kháng insulin: u tiết glucagon, cường giáp, hoặc giảm bài tiết insulin: u tiết somatostatin, u tiết aldosterone hoặc cả hai, do sử dụng thuốc hay hóa chất: glucocorticoid, hormon tuyến giáp, alpha interferon, thiazide,...

1.1.3 Cơ chế bệnh sinh của tiểu đường tuýp 2

Tiểu đường tuýp 2 chiếm hơn 90% các trường hợp mắc tiểu đường [4]. Sinh lý bệnh của TĐT2 được đặc trưng bởi tình trạng kháng insulin ngoại biên, suy giảm điều hoà sản xuất glucose ở gan và suy giảm chức năng tế bào β , cuối cùng dẫn đến suy tế bào β [5]. Trong quá trình này, insulin là một hormone được sản xuất bởi các tế bào β trong tuyến tụy nội tiết và có nhiệm vụ vận chuyển glucose vào bên trong các tế bào. Khi nồng độ glucose trong máu tăng cao, tuyến tụy phản ứng bằng cách tiết ra một lượng insulin đủ để hỗ trợ việc đưa glucose vào tế bào. Ngược lại, khi nồng độ glucose trong máu giảm, tuyến tụy ngừng sản xuất insulin. Ở những người mắc TĐT2, tuyến tụy vẫn tiết ra đủ lượng insulin, nhưng các tế bào trong cơ thể kháng lại tác dụng của insulin hoặc do đưa quá nhiều glucose vào trong cơ thể, làm cho lượng insulin sản xuất ra không đủ đáp ứng để đưa glucose vào tế bào. Hậu quả của tình trạng này là nồng độ đường trong máu tăng lên, và khi vượt quá một mức nào đó, đường sẽ

được loại bỏ qua đường tiêu, gây nên tình trạng TĐT2.

1.1.3 Nguyên nhân dẫn đến tiểu đường tuýp 2

Nguyên nhân chính gây ra TĐT2 thường là sự kết hợp phức tạp giữa yếu tố di truyền và lối sống không lành mạnh, như:

- Yếu tố di truyền: nếu có người thân trong gia đình mắc bệnh, khả năng mắc tiểu đường sẽ tăng cao hơn. Các biểu hiện gen cụ thể có thể ảnh hưởng đến cách cơ thể sử dụng và sản xuất insulin. Các nhà khoa học đã xác định có ít nhất 36 gen liên quan đến bệnh tiểu đường và khoảng 10% trong số đó có khả năng di truyền liên quan đến TĐT2. Hầu hết các biến thể gen được phát hiện có liên quan đến rối loạn chức năng tế bào beta hơn là kháng insulin [6].
- Béo phì: Béo phì và tích tụ mỡ xung quanh vùng bụng có liên quan mật thiết đến TĐT2. Mỡ bụng gây ra sự chống đối insulin và gây rối loạn chức năng của nó, dẫn đến tăng đường huyết [7].
- Lối sống thiếu vận động: là một trong những yếu tố quan trọng khiến cơ thể không thể sử dụng insulin một cách hiệu quả. Việc thiếu vận động gây ra tăng đường huyết và làm suy yếu khả năng điều chỉnh đường huyết của cơ thể [7].
- Thức ăn không lành mạnh: Chế độ ăn uống chứa quá nhiều thức ăn giàu đường và tinh bột, ít rau quả và thực phẩm giàu chất xơ cũng có thể tăng nguy cơ TĐT2. Việc tiêu thụ quá nhiều thức ăn chứa đường có thể gây sự tăng đột ngột của đường huyết [7].

1.1.4 Biến chứng và phòng bệnh tiểu đường tuýp 2

Khi được chẩn đoán mắc bệnh TĐT2 thì tình trạng bệnh sẽ tiếp tục tiến triển. Hơn nữa, bệnh tiểu đường mang theo nhiều rủi ro về biến chứng nguy hiểm có thể ảnh hưởng tới tính mạng của bệnh nhân, như viêm nhiễm hoặc khó lành các vết thương. Người bệnh tiểu đường cũng có nguy cơ cao bị nhiễm trùng cơ quan nội tạng, đặc biệt là não và hệ tiêu hoá. Ngoài ra, trong trường

hợp bị chấn thương bệnh nhân có thể nhanh chóng sa sút tinh thần. Nếu không điều trị thì nguy cơ nhồi máu cơ tim và đột quy tăng lên. Trong kiểm tra lâm sàng, có bốn đặc điểm phổ biến thường được lưu ý: một là glucose trong máu tăng trên 33,3 mmol/L, hai là ceton trong nước tiểu tăng nhẹ, ba là áp lực huyết tương thâm thấu hoặc huyết thanh cao hơn 340 mosM và cuối cùng là cơ thể mất nước. Với từng cấp độ bệnh mà người bệnh sẽ được chỉ định các phương pháp đặc trị khác nhau. Nếu nguyên nhân đến từ môi trường sống thì việc cải thiện và duy trì lối sống lành mạnh, tránh dùng nhiều món ăn có lượng đường cao và kiểm tra sức khỏe định kỳ là những cách phòng bệnh hữu hiệu nhất.

1.2 Tình hình nghiên cứu về gen liên quan đến bệnh tiểu đường tuýp 2 trong nước và thế giới

1.2.1 Thế giới

Trong những năm gần đây, có sự biến đổi đáng kể trong mô hình bệnh tật với xu hướng giảm số lượng các bệnh nhiễm trùng, mà thay vào đó là các bệnh không lây nhiễm như ung thư, tim mạch, thâm thần,... đặc biệt là các bệnh liên quan đến chuyển hoá như tiểu đường đang ngày càng trở nên phổ biến. Vào những năm cuối thế kỷ 20 và những năm đầu thế kỷ 21, các chuyên gia của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã nhận định thế kỷ 21 là thế kỷ của bệnh nội tiết và chuyển hóa, trong đó bệnh tiểu đường thực sự là một đại dịch và là một thách thức lớn đối với nhân loại, chủ yếu là tiểu đường tuýp 2 chiếm từ 85% đến 95% trong tổng số bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường. Bệnh tiểu đường đã được biết đến từ lâu trong lịch sử y học. Từ hàng nghìn thế kỷ trước Công nguyên, trong tài liệu của người Ai Cập cổ đại đã ghi chép về triệu chứng tương tự bệnh tiểu đường hiện đại. Trong hơn ba thập kỷ qua, số lượng người mắc bệnh này đã tăng gấp đôi trên toàn thế giới [8], làm cho bệnh tiểu đường loại 2 trở thành một trong những vấn đề sức khỏe cộng đồng đáng lo ngại nhất ở nhiều quốc gia. Sự gia tăng đột ngột của bệnh tiểu đường trên toàn thế giới được cho là kết quả của sự già hóa dân số, quá trình đô thị hóa và thay đổi lối sống. Vào năm 2012, ước tính có khoảng 346 triệu người mắc bệnh tiểu đường, và con số

này dự kiến sẽ tăng lên 439 triệu vào năm 2030, chiếm tới 7,7% dân số trong khoảng từ 20 đến 79 tuổi. Trong danh sách 10 quốc gia dự kiến có số lượng người mắc bệnh tiểu đường cao nhất vào năm 2030, có đến 4 quốc gia thuộc khu vực châu Á (Trung Quốc, Pakistan, Indonesia và Bangladesh) [9]. Trong khi đó, khu vực Trung Đông và Châu Phi cũng đang trở thành những điểm nóng của bệnh TĐT2. Sự gia tăng này ở các nước đang phát triển và tỷ lệ người trẻ mắc bệnh tăng nhanh đang tạo ra một áp lực lớn về mặt sức khỏe cho những nước này. Châu Á đang nổi lên như một điểm nóng về bệnh tiểu đường do hậu quả của sự phát triển kinh tế nhanh chóng, quá trình đô thị hóa và thay đổi thói quen ăn uống trong thời gian ngắn [10].

Cho tới nay, cùng với sự phát triển của ngành hóa sinh và sinh học phân tử, các nghiên cứu về bệnh tiểu đường được nghiên cứu sâu hơn về các chất chuyển hóa trong tế bào và gen liên quan với bệnh. Đồng thời các phương pháp điều trị mới và sản xuất thuốc vẫn đang được nghiên cứu và thử nghiệm. Rất nhiều nghiên cứu về gen liên quan tới tiểu đường đã được thực hiện và cho tới nay người ta đã phát hiện ra một số gen nguy cơ liên quan đến tiểu đường tuýp 2. Gen ảnh hưởng tới hoạt động của insulin gồm: *ENPP1*, *INSR*, *IRS1*, *IRS2*, *RBP4*, *PIK3R1*, *PP1R3A*, *FOXO1*, *FOXA2*. Gen ảnh hưởng tới chức năng của tế bào beta gồm: *CAPN10*, *HNF4 α* , *ABCC8*, *Kir6.2*, *GLUT2*, *UCP2*, *IAPP*, *INS*, *GCK*, *SIR1*, *ARNT*. Gen ảnh hưởng tới nội cân bằng năng lượng bao gồm: *PGC1*, *SIRT1*. Gen ảnh hưởng tới chức năng của gan gồm: *FABP2*, *GYS1*, *GCCGR*, *IGF1*. Gen ảnh hưởng tới chức năng tế bào tạo mỡ gồm: *PPAR γ* , *ADIPOQ*, *ADRB3*, *RDB4* [11]. Gen ảnh hưởng tới các loại mô khác gồm: *NOS3*, *TCF7L2*, *Kir6x*, *ABCC8*. Một số gen liên quan tiểu đường được nghiên cứu nhiều như: Gen *KCNQ1* có liên quan tới nguy cơ bệnh tiểu đường ở Châu Á nhưng ít liên quan ở cộng đồng Châu Âu; gen này ảnh hưởng làm giảm chức năng của các tế bào beta của tuyến tụy và giảm glucose khi đói [12]. Gen *CAPN10*, mã hóa cho 1 loại protease ảnh hưởng tới chức năng của tuyến tụy có liên quan với bệnh tiểu đường ở người Phần Lan, Mexico và người Mỹ nhưng

chưa thấy có liên quan với bệnh tiểu đường ở người Nhật, Samoa và Châu Phi. Gen *PPAR γ* mã hóa cho một loại thụ thể điều hòa sự phát triển của tế bào tạo mỡ và có liên quan tới sự kháng insulin [13]. Gen *TCF7L2* mã hóa cho yếu tố phiên mã và theo ước tính có khoảng 20% số người mắc tiểu đường ở Châu Phi và Châu Âu có liên quan tới gen *TCF7L2*. Các alen gây bệnh của gen này cũng biểu hiện rõ ở một số vùng Đông Á [14]. Gen *FTO* là gen mới được phát hiện có sự liên quan đối với tiểu đường tuýp 2. Cơ chế ảnh hưởng của gen *FTO* đối với tiểu đường tuýp 2 vẫn chưa được làm rõ tuy nhiên người ta thấy rằng gen *FTO* làm tăng tính kháng insulin ở gan và nó có liên quan tới một chuỗi các rối loạn dẫn tới tiểu đường tuýp 2 [15]. Trên thế giới, khảo sát và nghiên cứu rõ ràng các gen liên quan ảnh hưởng đến sự tăng giảm nồng độ nesfatin-1 trong bệnh nhân tiểu đường nói chung và tiểu đường tuýp 2 nói riêng vẫn còn hạn chế. Hiểu được rõ sự thay đổi các gen này là một hướng nghiên cứu quan trọng mà từ đó có hướng chẩn đoán và chữa bệnh hiệu quả.

Hiện nay, nghiên cứu về gen *SLC2a2* (còn được gọi là gen GLUT2) đối với bệnh TĐT2 đã thu hút sự quan tâm rất lớn từ phía cộng đồng nghiên cứu y học. Gen *SLC2a2* mã hóa cho protein vận chuyển đường glucose trong các tế bào, đóng vai trò quan trọng trong sự kiểm soát đường huyết. Các nghiên cứu về gen *SLC2a2* trong mối quan hệ với bệnh TĐT2 đã phần nào đánh giá được vai trò của gen đối với nguy cơ mắc bệnh và cách tương tác với các yếu tố môi trường. Các nghiên cứu dịch tễ học đã xác định các biến thể gen *SLC2a2* có thể liên quan đến tăng nguy cơ mắc bệnh TĐT2. Đặc biệt, một số biến thể gen *SLC2a2* đã được liên kết với khả năng tăng sự vận chuyển glucose vào tế bào, dẫn đến tăng đường huyết và nguy cơ mắc bệnh.

Tuy nhiên, tình hình nghiên cứu về gen *SLC2a2* vẫn còn rất mới mẻ và cần thêm nhiều nỗ lực nghiên cứu để hiểu rõ hơn về sự tương tác giữa gen này và các yếu tố môi trường, cũng như cơ chế chính xác của tác động của nó trong phát triển bệnh TĐT2. Các nghiên cứu trên phạm vi quốc gia và quốc tế đang tập trung vào việc xác định các biến thể gen *SLC2a2* và các cơ chế tương tác,

nhằm định rõ hơn vai trò của gen này trong quá trình điều tiết đường huyết và tạo ra cơ hội phát triển các phương pháp điều trị và phòng ngừa tối ưu.

1.2.2 Việt Nam

Trong thực tế tại Việt Nam, bệnh TĐT2 đang thể hiện một xu hướng gia tăng đáng báo động theo thời gian, song song với mức độ phát triển kinh tế và đô thị hóa của đất nước. Các nghiên cứu liên quan đến bệnh TĐT2 tại Việt Nam đã cung cấp những thông tin sâu rộng về tình trạng bệnh, yếu tố di truyền và tác động của môi trường.

Theo kết quả điều tra STEPwise về các yếu tố nguy cơ của bệnh không lây nhiễm do Bộ Y tế thực hiện năm 2015, ở nhóm tuổi từ 18 đến 69, cho thấy tỷ lệ Tiểu đường toàn quốc từ 2,6% (năm 2010) tăng lên 4,1% (năm 2015), tỉ lệ rối loạn đường huyết lúc đói từ 1,5% tăng lên 3,5% [16]. Trong nghiên cứu dịch tễ học khác, với sự hỗ trợ của các chuyên gia hàng đầu từ WHO đã được tiến hành vào năm 2001 tại bốn thành phố lớn: Hà Nội, Hải Phòng, Đà Nẵng và TP.HCM, dựa theo nghiên cứu của Vũ Thị Thanh Huyền và cộng sự (2015), trong khảo sát về dịch tễ học trên 2402 cá nhân, kết quả cho thấy tỷ lệ mắc tiểu đường là 7,9%. Người mắc bệnh chủ yếu nằm ở nhóm tuổi trên 45 (chiếm 85%). Tỷ lệ mắc bệnh ở nam và nữ là tương đương nhau (lần lượt 91,4% và 92,5%). Những người có công việc đòi hỏi sự lao động chân tay thường có tỷ lệ mắc bệnh thấp hơn so với những người không làm việc có yêu cầu đặc biệt về chân tay, với tỷ lệ lần lượt là 7,4% và 9,2%. Các cá nhân trên 45 tuổi, có tiền sử bệnh tăng huyết áp và rối loạn lipid máu, có nguy cơ mắc cao hơn so với những người không có tiền sử về tăng huyết áp và rối loạn lipid máu, lần lượt là 4,42 và 3,45 lần. Những người có chỉ số BMI (chỉ số khối cơ thể) ≥ 23 cũng có nguy cơ mắc bệnh cao hơn gấp 1,81 lần so với những người có chỉ số BMI < 23 [17]. Riêng tại Thành phố Hồ Chí Minh, nghiên cứu hơn 2142 người từ 30 đến 72 tuổi cho thấy tỉ lệ mắc đái tháo đường tuýp 2 lên đến 10,8% ở nam và 11,7% ở nữ. Một nghiên cứu khác được tiến hành bởi Hồ Phạm Thục Lan và cộng sự vào năm 2017 trên 1339 cá nhân trên 30 tuổi tại thành phố Hồ Chí Minh cho

thấy tỷ lệ mắc là 7,4%, và tỷ lệ tiền tiểu đường là 11,7% [18]. Kết quả của các nghiên cứu này đã cảnh báo về tình hình TĐT2 ở Việt Nam với tỷ lệ mắc bệnh trong đối tượng từ 30 đến 64 tuổi tại bốn thành phố lớn đã lên đến 4,9%, tỷ lệ rối loạn dung nạp glucose máu đạt 5,9%, và tỷ lệ rối loạn glucose máu lúc đói là 2,8%. Khảo sát này cũng đã chỉ ra rằng có hơn 44% số người mắc bệnh không được phát hiện và chưa nhận được hướng dẫn điều trị hiệu quả. Các nghiên cứu tiếp theo trong quãng thời gian khác nhau cũng đã thể hiện tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường ở các tỉnh và thành phố khác nhau. Tỷ lệ mắc tiểu đường ở các tỉnh Thanh Hóa, Thái Bình, Nghệ An, Cao Bằng đã được ghi nhận trong khoảng từ 3% đến 6,8% [19], [20]. Tại Bệnh viện Bạch Mai vào năm 2004, tỷ lệ mắc tiểu đường tuýp 2 đã chiếm đến 81,5% trong số các ca được chẩn đoán mắc tiểu đường.

Một cuộc điều tra quốc gia vào năm 2012 do Bệnh viện Nội tiết Trung ương thực hiện trên hơn 11.000 người ở 6 vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam đã cho thấy tỷ lệ mắc tiểu đường tại đất nước này đã tăng lên mức 6%. Kết quả này báo hiệu rằng tình trạng bệnh đang có sự gia tăng nhanh chóng, đặc biệt là ở vùng Tây Nam Bộ với tỷ lệ cao nhất vượt 7%, trong khi ở Tây Nguyên chỉ gần 4%. Điều này càng tạo ra nỗi lo ngại khi số người mắc bệnh ở cộng đồng và không được phát hiện có tỷ lệ lên tới gần 64%, một con số cao hơn so với trung bình thế giới.

Với sự thay đổi nhanh chóng về lối sống và thói quen ăn uống, dấu hiệu bệnh TĐT2 đã xuất hiện ở những người trẻ tuổi hơn và thậm chí ở lứa tuổi rất trẻ. Điều này làm cho tình hình bệnh trở nên phức tạp và đòi hỏi sự quan tâm và can thiệp từ các chuyên gia y tế. Đặc điểm chung của TĐT2 là sự tương tác giữa yếu tố gen và yếu tố môi trường trong quá trình bệnh phát triển. Mặc dù điều trị có thể dựa vào thay đổi lối sống và sử dụng thuốc để kiểm soát glucose máu, tuy nhiên, việc thực hiện hiệu quả cần sự quản lý cẩn thận để tránh những biến chứng nghiêm trọng.

Mặc dù đã có nhiều cuộc điều tra đánh giá và nghiên cứu dịch tễ học về

bệnh tiểu đường tại Việt Nam, tuy nhiên, lĩnh vực nghiên cứu về gen và các yếu tố di truyền đối với bệnh TĐT2 vẫn đang còn rất ít. Trong bối cảnh sự gia tăng nhanh chóng của bệnh tiểu đường và tầm quan trọng của yếu tố di truyền trong việc hiểu rõ nguyên nhân và phát triển bệnh, việc này càng trở nên cấp thiết. Các cuộc nghiên cứu dịch tễ học đã cung cấp cái nhìn tổng quan về tình hình bệnh tiểu đường tại Việt Nam, nhưng chúng chưa thể làm sáng tỏ các cơ chế cụ thể liên quan đến gen và yếu tố di truyền. Sự tương tác giữa gen và môi trường trong quá trình phát triển bệnh vẫn còn mơ hồ và đòi hỏi sự tiếp tục của các nghiên cứu chuyên sâu và chi tiết hơn. Việc nghiên cứu sâu hơn về các gen liên quan đến TĐT2 và yếu tố di truyền đối với bệnh TĐT2 tại Việt Nam đối mặt với nhiều thách thức, bao gồm sự đa dạng dân tộc và gen trong cộng đồng, cũng như sự cần thiết của việc tích hợp dữ liệu genetica và thông tin về môi trường. Mặc dù có một số nghiên cứu khảo sát di truyền, song còn cần thêm nhiều nỗ lực hơn để hiểu rõ hơn về tác động của gen và cơ chế di truyền trong bệnh tiểu đường tại Việt Nam, là một phần quan trọng trong việc hiểu rõ hơn về cơ chế phát triển của bệnh và phát triển các phương pháp phòng ngừa và điều trị hiệu quả.

1.3 Gen *SLC2a2*

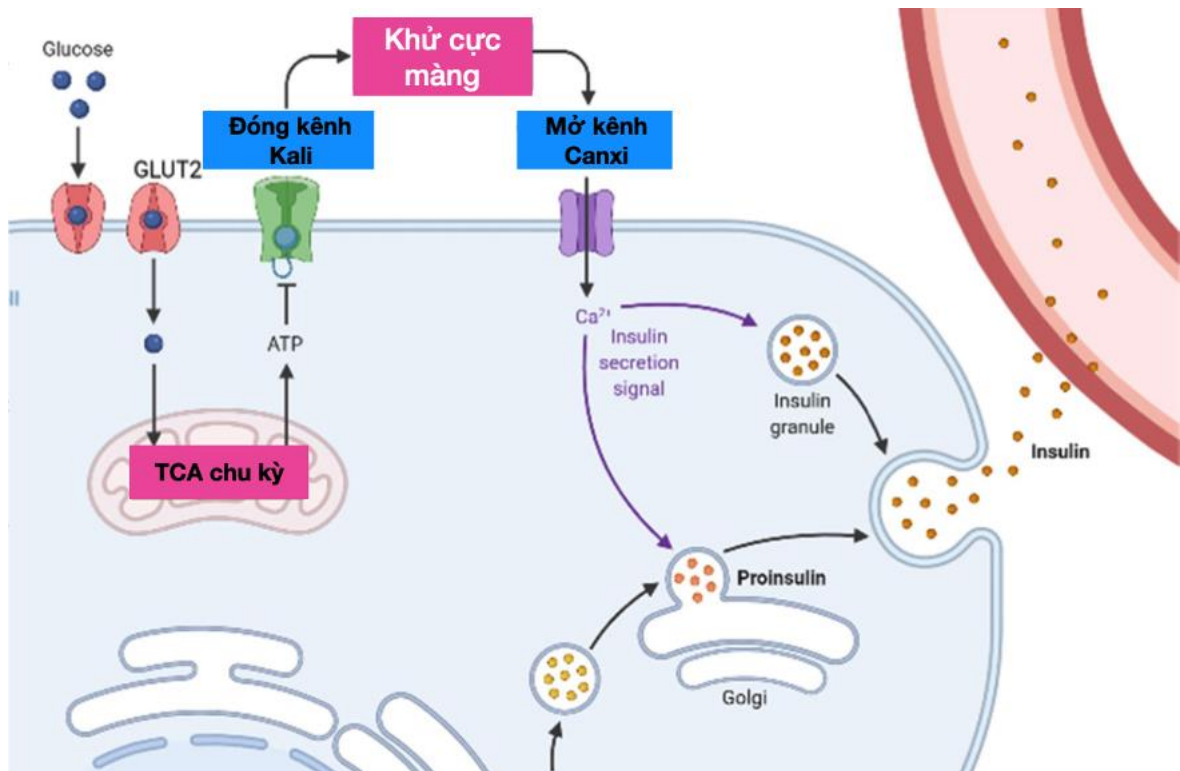
1.3.1 Định nghĩa

Solute carrier family 2 member 2 (*SLC2a2*) gen nằm ở vị trí q26.2 trên nhiễm sắc thể số 3, *SLC2a2* còn được biết đến với tên khác là glucose transporter 2 (GLUT2), là gen mã hóa cho protein GLUT2. Protein GLUT2 được tìm thấy chủ yếu trên bề mặt tế bào gan, tế bào β trong tuyến tụy, và một số tế bào khác [21]. GLUT2 được xác định là một trong số các protein vận chuyển glucose trong cơ thể, chủ yếu tham gia vào quá trình vận chuyển glucose từ máu vào các tế bào gan và tế bào động mạch. Chức năng chính của GLUT2 là cân bằng nồng độ glucose giữa máu và các tế bào mục tiêu. Ở tế bào gan, GLUT2 giúp điều chỉnh lượng glucose trong máu bằng cách giữ cho gan hấp thụ glucose khi nồng độ glucose trong máu tăng cao, và ngược lại, giải

phóng glucose vào máu khi nồng độ glucose giảm. Ngoài ra, GLUT2 còn có vai trò quan trọng trong quá trình cảm nhận glucose trong tế bào đảo não, giúp cơ thể điều chỉnh cảm giác no và đói cũng như sự kiểm soát đường huyết [22].

1.3.2 Cơ chế hoạt động

Khi lượng đường trong máu tăng cao, các tế bào biểu hiện GLUT2 hấp thu glucose thông qua kênh vận chuyển. Glucose sau đó được phosphoryl hoá thành glucose 6-phosphate bởi glucokinase, tiếp theo là quá trình glycolysis hoặc oxy hóa glucose để tạo ra ATP thông qua một loạt các phản ứng, do đó làm tăng tỷ lệ ATP/ADP trong tế bào chất, dẫn đến việc ức chế kênh K^+ nhạy cảm với ATP (ATP – sensitive potassium channels) dẫn đến thay đổi hiệu điện thế màng và mở kênh Ca^{2+} . Điều này cho phép một lượng lớn Ca^{2+} đi vào các tế bào, thúc đẩy sự di chuyển của các túi chứa insulin đi ra để hợp nhất với màng tế bào và tiết ra các hạt insulin từ các tế bào thông qua exocytosis [23] (Hình 1.1). Con đường này là con đường kích hoạt chính cho sự tiết insulin. Các bất thường GLUT2 sẽ dẫn đến giảm glucose vào trong tế bào β . Khi glucose trong cơ thể hoạt động không hiệu quả, cơ thể sẽ kháng hoặc giảm tiết insulin. Đây chính là nguyên nhân dẫn đến TĐT2. Các đột biến di truyền trong gen *SLC2a2* có thể ảnh hưởng đến cấu trúc hoặc chức năng của protein GLUT2 [24].



Hình 1.1: Cơ chế hoạt động của protein GLUT2

Nguồn: BioRender.com bio

1.3.3 Gen *SLC2a2* và tiểu đường tuýp 2

Các đột biến của gen *SLC2a2* đã được nghiên cứu về mối liên quan với nguy cơ mắc bệnh tiểu đường. Một số nghiên cứu đã ghi nhận rằng các biến thể gen *SLC2a2* có thể ảnh hưởng đến sự kiểm soát đường huyết và khả năng xử lý glucose của cơ thể [13-14] [25], [26]. Các nghiên cứu sinh lý học với chuột biến đổi gen đã tiết lộ vai trò quan trọng của GLUT2 trong một số cơ chế điều tiết khác nhau. Trong tế bào beta của tuyến tụy, GLUT2 đóng vai trò cần thiết trong việc tiết insulin khi glucose kích thích. Trái lại, trong tế bào gan, việc ức chế biểu hiện của GLUT2 cho thấy sự tồn tại của một con đường đầu ra glucose có thể phụ thuộc vào cơ chế vận chuyển qua màng. Các nghiên cứu về tương tác gen trên toàn bộ hệ gen cho thấy rằng sự thay đổi trong gen *SLC2a2* có thể tăng nguy cơ tăng đường huyết khi đói, tiến triển sang bệnh TĐT2, đồng thời tăng nguy cơ các vấn đề về cholesterol và tim mạch. Điều này thể hiện mối quan hệ phức tạp giữa gen GLUT2 và các vấn đề sức khỏe liên quan đến quá

trình chuyển hóa glucose và insulin. Đây là các yếu tố liên quan trực tiếp đến TĐT2 [27].

Các nghiên cứu đã chứng minh rằng, các locus di truyền liên quan đến đường huyết lúc đói và tác động của chúng đối với bệnh TĐT2 được xác định có liên quan đến gen *SLC2a2*. Đa hình đơn nucleotide e(SNPs) trong gen *SLC2a2* có liên quan đến sự chuyển đổi sang bệnh TĐT2 ở những đối tượng béo phì bị rối loạn dung nạp glucose (IGT). Có thể kể đến như đột biến gen rs5393 (kiểu gen AA) làm tăng nguy cơ mắc bệnh tiểu đường loại 2 lên gấp ba lần hay đa hình đơn gen (SNP) rs11920090 ở trạng thái mất cân bằng luôn liên kết với NSP rs5400 trên gen *SLC2a2*, mã hoá cho sự thay thế axit amin T110I. Sự thay thế này được xác định là có thể có hại, ảnh hưởng đến việc vận chuyển, cảm nhận glucose và bài tiết insulin [28].

Bên cạnh đó, việc điều hoà mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* cũng được xác định là có liên quan đến việc bài tiết insulin trong tế bào β đảo tụy với vùng tăng cường hoạt động gen enhancer. Ba yếu tố quan trọng cho quá trình phiên mã tạo RNA, bao gồm: MafA, NeuroD1 và HNF1 β . Ba yếu tố này tương tác với nhau để kích hoạt gen thông qua enhancer và vùng gần gen. Rối loạn điều hoà biểu hiện *SLC2a2* có thể góp phần làm suy yếu chuyển hoá glucose và bài tiết insulin được quan sát thấy tại bệnh nhân mắc TĐT2 [29].

Song song với việc nghiên cứu xác định các đột biến trên gen *SLC2a2*, việc hiểu được các cơ chế kiểm soát biểu hiện gen *SLC2a2* cũng là rất quan trọng để làm sáng tỏ cơ sở phân tử của chức năng tế bào liên quan, điều đó sẽ đóng góp rất lớn vào sự phát triển của các chiến lược điều trị nhắm vào biểu hiện *SLC2a2* trong bệnh tiểu đường.

1.4 Chẩn đoán và điều trị tiểu đường tuýp 2

1.4.1 Chẩn đoán

Việc chẩn đoán TĐT2 thường được dựa vào các kết quả xét nghiệm đo mức độ đường huyết và khả năng phản ứng của cơ thể với insulin như là xét nghiệm đường huyết lúc đói, HbA1c để đo lượng glucose gắn hồng cầu hoặc

xét nghiệm glucose sau ăn. Khi chẩn đoán TĐT2 dựa vào các chỉ số đường huyết có thể gặp sai sót, tuy nhiên, việc thường xuyên thống kê dữ liệu có thể phản ánh tình hình thực tế một cách chính xác. Nhóm trên 45 tuổi là nhóm người có nguy cơ mắc tiểu đường cao nhất. Ngoài ra, nguy cơ mắc bệnh cũng tăng lên nếu chỉ số BMI trên 23. Đặc biệt, nếu có tiền sử mắc bệnh tiểu đường trong gia đình, thì người thân nên kiểm tra sức khỏe định kỳ để tầm soát và kiểm soát bệnh kịp thời.

1.4.2 Điều trị tiểu đường tuýp 2

Mục tiêu chính của việc điều trị tiểu đường type 2 là duy trì mức đường huyết trong khoảng phù hợp với tình trạng sức khỏe của bệnh nhân và đồng thời giải quyết các vấn đề liên quan đến tiểu đường như tăng huyết áp, tình trạng lipid máu bất thường, nguy cơ nhiễm trùng và các tác động khác. Quá trình kiểm soát đường huyết đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa những biến chứng tiềm năng liên quan đến mắt, thận, tim mạch và hệ thần kinh. Trong số các biến chứng này, những vấn đề liên quan đến hệ tim mạch đứng ở vị trí hàng đầu, gây ra sự tổn thương và có thể dẫn đến tình trạng nguy hiểm như đột quỵ, đau tim và thậm chí tử vong. Người mắc tiểu đường type 2 có nguy cơ mắc các bệnh tim mạch gấp đôi so với những người không mắc tiểu đường. Tuy nhiên, nguy cơ này có thể được giảm đi đáng kể thông qua các biện pháp sau:

- Từ bỏ việc hút thuốc.
- Thực hiện kiểm tra sức khỏe định kỳ và tuân thủ liệu pháp điều trị theo hướng dẫn của bác sĩ.
- Điều chỉnh huyết áp và mức cholesterol cao bằng cách tuân thủ chế độ ăn uống, thực hiện thường xuyên hoạt động thể dục và tuân thủ lời khuyên của bác sĩ về việc sử dụng thuốc.

1.4.3 Một số loại thuốc phổ biến trong điều trị tiểu đường tuýp 2

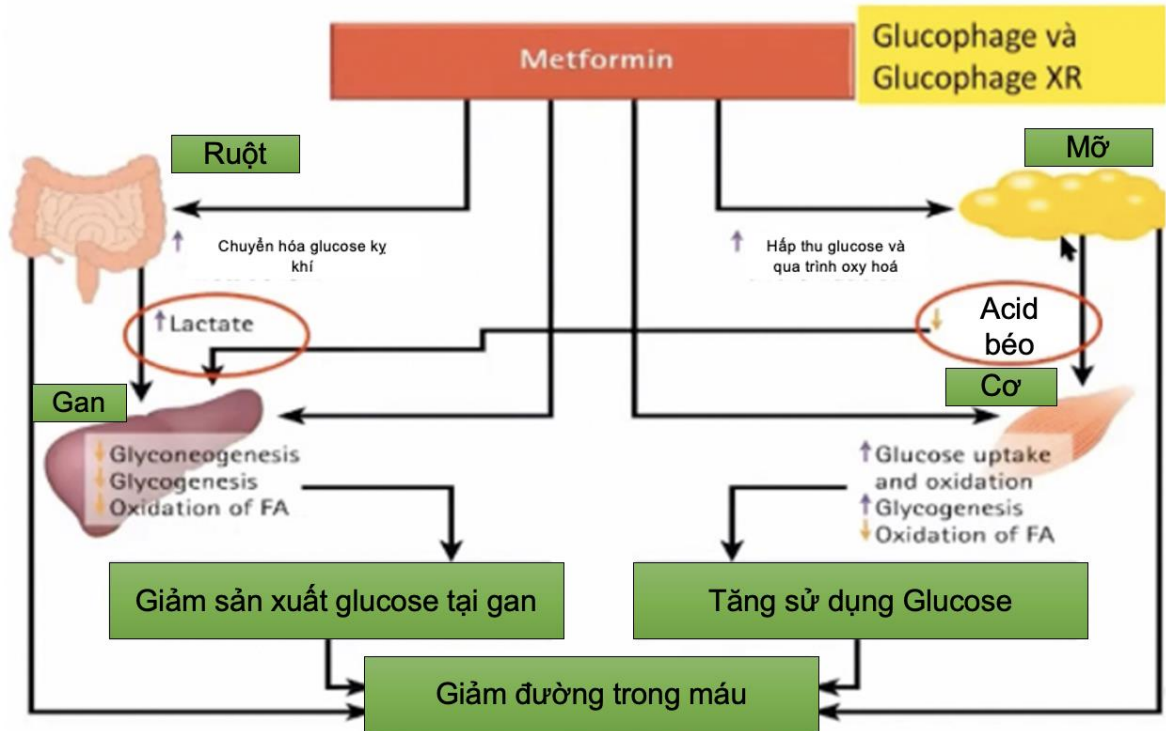
Metformin và Gliclazide là hai loại thuốc đang được sử dụng phổ biến

để điều trị các bệnh nhân TĐT2 tại Việt Nam và thế giới, đây là hai loại thuốc được kê đầu tiên ngay sau khi bệnh nhân được chẩn đoán TĐT2 [30].

1.4.3.1 Metformin

Metformin có tên hoá học là 1,1-dimethylbiguanide hydrochloride. Năm 1957, bác sĩ người Pháp Jean Sterne, người đầu tiên báo cáo việc sử dụng Metformin để điều trị bệnh tiểu đường. Năm 1994, Metformin được phê duyệt và giới thiệu ở Mỹ. Năm 2011, Metformin có tên trong danh sách các loại thuốc thiết yếu do WHO cấp [31]. Cho đến nay, Metformin là thuốc điều trị tiểu đường hàng đầu thuộc nhóm Biguanide, với hơn 100 triệu người sử dụng trên toàn thế giới.

Một thử nghiệm lâm sàng đối chứng ngẫu nhiên (RCT) được thực hiện để đánh giá về hiệu quả của Metformin trong phòng ngừa tiểu đường. Kết quả cho thấy Metformin làm giảm 31% tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường so với giả dược, hiệu quả cao hơn nữa ở nhóm bệnh nhân béo phì có đường huyết lúc đói tăng cao [32]. Theo dõi với những người tham gia nghiên cứu trong hơn 15 năm, phát hiện ra rằng Metformin làm giảm 18% nguy cơ mắc bệnh tiểu đường trong 10 và 15 năm sau một cách ngẫu nhiên [33]. Sử dụng Metformin để phòng ngừa bệnh tiểu đường cũng được ước tính là tiết kiệm chi phí [34]. Metformin được cho là an toàn và dung nạp tốt, tuy nhiên cũng có tác dụng phụ nhẹ đối với đường ruột đối với một số bệnh nhân. Ngoài ra việc tuân thủ điều trị Metformin còn giúp bệnh nhân giảm cân [35].



Hình 1.2: Cơ chế tác dụng của thuốc Metformin [36]

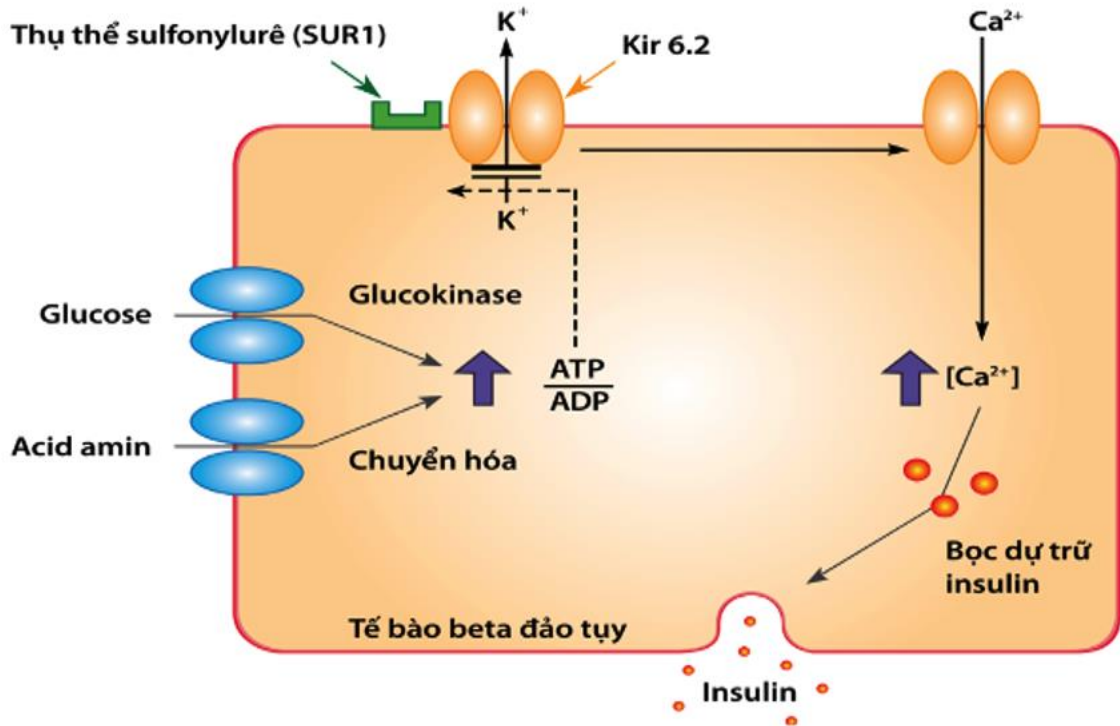
Các nghiên cứu dược lý đã đưa ra ba cơ chế hoạt động của Metformin [37], [38]:

- Cải thiện độ nhạy với insulin: Metformin làm tế bào cơ thể tăng khả năng tiếp nhận insulin bằng cách phosphoryl hoá acetyl-CoA carboxylase (ACC1 và ACC2) thông qua hoạt hoá protein kinase kích hoạt AMP (AMPK), giúp giảm cường độ insulin cần thiết để kiểm soát đường huyết.
- Ức chế hấp thu glucose ở hệ tiêu hoá: Metformin tác động lên ruột bằng cách tăng sử dụng glucose, tăng GLP-1 và thay đổi hệ vi sinh vật. Điều này làm tăng chuyển hoá glucose kỵ khí trong tế bào ruột, dẫn đến giảm hấp thu glucose rỗng và tăng cung cấp lactate đến gan.
- Giảm sản xuất glucose ở gan: Metformin ức chế quá trình tạo glucose ở gan thông qua quá trình gluconeogenesis, điều này ngăn chặn đáng kể sự gia tăng đường huyết sau khi ăn.

1.4.3.2 Gliclazide

Gliclazide có tên gọi hoá học là 3-(4-(3,4-dihydro-5-methyl-3-((5-methyl-3-(trifluoromethyl)thiazol-2-yl)methyl)thiazol-2-yl)-2-

methylphenylsulfonyl) urea. Gliclazide là một sulfonylurea (SU) thế hệ thứ hai, một nhóm thuốc điều trị TĐT2 được cấp bằng sáng chế năm 1972. Gliclazide được sử dụng phổ biến tại Đông Nam Á lý do là thuốc điều trị hiệu quả cao và chi phí thấp [39]. Cơ chế của Gliclazide là kích thích tuyến sản xuất insulin, làm giảm glucose trong máu từ 50 đến 60 mg/dl, giảm nồng độ HbA1c khoảng 2% [40].



Hình 1.3: Cơ chế tác dụng của thuốc Gliclazide [40]

Gliclazide được gắn chọn lọc với thụ thể sulfonylurea (SUR-1) trên bề mặt của tế bào β tuyến tụy nhưng không liên kết với thụ thể sulfonyl urea trong tim nên có tác dụng bảo vệ tim mạch [40]. Các liên kết này gây ức chế dòng kali đi ra khỏi tế bào β bằng cách đóng kênh kali phụ thuộc ATP. Sự đóng kênh K^+ sẽ gây ra hiện tượng khử cực do giảm tính thấm K^+ của tế bào β tụy. Để cân bằng điện tích hai bên màng tế bào β , kênh Ca^{2+} sẽ được mở ra. Khi kênh Ca^{2+} được mở ra, Ca^{2+} sẽ đi vào tế bào làm tăng nồng độ Ca^{2+} nội bào. Một protein nội bào là calmodulin sẽ kết hợp với Ca^{2+} qua phản ứng phosphoryl-hóa. Phức hợp Ca^{2+} - calmodulin sẽ đưa các hạt chế tiết insulin đến sát màng tế bào β tụy và kết quả là insulin sẽ được phóng thích (**Hình 1.3**).

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Một nghiên cứu cắt ngang được thực hiện từ 06/2020 đến 06/2021 tại Khoa Nội tiết - Bệnh viện 198. Các đối tượng chia hai nhóm:

- Bệnh nhân TĐT2 thuộc nhóm nghiên cứu được lấy mẫu thuận tiện tại Khoa.
- Đối tượng khỏe mạnh có tuổi, giới tính tương đồng với bệnh nhân thuộc nhóm bệnh được chọn lọc theo thăm khám định kỳ tại Khoa.

Các mẫu bệnh phẩm bao gồm mẫu máu và mẫu mô từ những người tham gia nghiên cứu được thu thập từ khoa Nội tiết, bệnh viện 198 trong khoảng thời gian tiến hành nghiên cứu. Các xét nghiệm trong nghiên cứu đã được hội đồng y đức tại Bệnh viện và Viện nghiên cứu thông qua.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng

* Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:

- Bệnh nhân được chẩn đoán xác định TĐT2 theo IDF năm 2012
- Bao gồm cả nam và nữ, tuổi ≥ 40
- Bệnh được chẩn đoán lần đầu hoặc đã được chẩn đoán và điều trị trước thời điểm nghiên cứu.
- Có thể có các biến chứng các cơ quan đích.
- Làm đủ các xét nghiệm theo yêu cầu của nghiên cứu.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

* Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nhóm chứng

- Bao gồm những người khỏe mạnh được xác định dựa vào tiền sử sức khỏe hoặc khi khám lâm sàng.
- Có tuổi, giới tính tương đương với bệnh nhân.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng nghiên cứu

* Tiêu chuẩn loại trừ bệnh nhân

- Tiểu đường tuýp 1 và tiểu đường thai kỳ.
- Bệnh nhân tiểu đường thứ phát (tiểu đường trong hội chứng Cushing, Basedow, tiểu đường do sỏi tuý).
- Những bệnh nhân có biến chứng nặng, hoặc đang mắc các bệnh cấp tính khác (rối loạn nước và điện giải nặng, đột quy não, suy thận cấp, nhồi máu cơ tim cấp).
- Bệnh nhân đang trong tình trạng nhiễm trùng cấp tính hoặc nghi ngờ mắc bệnh ngoại khoa, phẫu thuật.
- Mắc các bệnh nội tiết kèm theo: bệnh to đầu chi, Basedow, u tuý thượng thận, hội chứng Cushing.

* Tiêu chuẩn loại trừ đối tượng thuộc nhóm chứng

- Mắc các bệnh mạn tính như tiểu đường, bệnh tim thiếu máu cục bộ, đột quy não.
- Đang mắc các bệnh cấp tính.
- Không thực hiện đủ các chỉ số nghiên cứu.

2.2. Vật liệu và hoá chất, thiết bị nghiên cứu

Sodium dodecyl sulfate (SDS); ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (BioLabs, Mỹ); phenol, methanol, isoamylalcohol, EtBr, glycerol, ethanol, chloroform, ampicillin, acrylamide, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Đức); n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone (Sigma, Mỹ); thạch (Fluka, Đức); DMEM (Dullbecco's modified minimum essential medium) (Gibco, Mỹ); RPMI 1640 (Gibco, Mỹ); PBS (phosphate buffered saline, g/l) (Gibco, Mỹ); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (DUCHEFA biochemie, Hà Lan) và một số hóa chất phân tích khác. Taq DNA polymerase (Thermo scientific, Mỹ); d-NTPs (Fermentas, Mỹ); bộ kit tinh sạch DNA từ gel agarose;... và các hoá chất cần thiết khác.

Phiến 96 giếng (SPL Life Sciences, Hàn Quốc); Micropipettes, pipettes đa kênh, đầu tip pipette; Máy đọc ELISA (ELISA Bio-Rad machine, Mỹ); Máy

PCR (Applied Biosystem 9700, Mỹ); máy ly tâm lạnh (Sorvall RC5B, Mỹ); máy ly tâm lạnh (Biofuge fresco, Kendro, Đức); máy ổn nhiệt (Labnet, Mỹ); bộ điện di agarose, máy soi gel (Bio-Rad, Mỹ); máy lắc ổn nhiệt (New Jersey, Mỹ); máy vortex (vision scientific, Hàn Quốc); máy khuấy từ (vision scientific, Hàn Quốc); tủ cấy an toàn sinh học Class II (Esco, Anh); máy cô quay Kika-Werke RV06 (GMBH&CO KG, Đức); Cân kỹ thuật (Precisa XT2200A, Thụy Điển); Cân phân tích AY 120 (Shimadzu, Nhật Bản); Nồi khử trùng (Nhật Bản); pH kế Melter Toledo (Đức); Tủ sấy Cornthem (New Zealand); máy giải trình tự ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA); máy quang phổ NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA) và các loại thiết bị khác dùng trong nghiên cứu do Nhật Bản, Thụy Sĩ, Anh, Đức và Việt Nam sản xuất.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Tách chiết, tinh sạch RNA và DNA tổng số

Tách chiết và tinh sạch RNA tổng số:

KIT RNeasy Mini Kit-Part 1 và Part 2 (QIAGEN, USA) được sử dụng cho quá trình tách chiết và tinh sạch RNA. Quy trình thực hiện tuân theo hướng dẫn từ nhà sản xuất, bao gồm:

RNeasy Mini Kit-Part 1:

- Trộn đều mẫu với lượng RLT lysis buffer tương ứng theo tỉ lệ 1:1 để đồng hoá mẫu. Ủ ở nhiệt độ phòng 10-15 phút.
- Bổ sung ethanol 70% với tỉ lệ 1:1 vào dịch ly giải và trộn đều bằng pipet.
- Chuyển tối đa 700 µl mẫu (gồm cả tủa) vào cột RNeasy Mini đặt trong ống thu 2 ml. Đậy nắp và ly tâm trong 15 giây ở tốc độ $\geq 8000 \times g$. Loại bỏ dịch chảy qua cột.
- Thêm 700 µl Buffer RW1 vào cột quay RNeasy. Đậy nắp và ly tâm trong 15 giây ở tốc độ $\geq 8.000 \times g$. Loại bỏ dịch chảy qua cột.
- Thêm 500 µl Buffer RPE vào cột quay RNeasy. Đậy nắp và ly tâm trong 15 giây ở tốc độ $\geq 8.000 \times g$. Loại bỏ dịch chảy qua cột.

- Thêm 500 μ l Buffer RPE vào cột RNeasy. Đậy nắp và ly tâm trong 2 phút ở tốc độ $\geq 8.000 \times g$, loại dịch. Đặt cột RNeasy vào ống thu 2 ml mới. Ly tâm ở tốc độ tối đa trong 1 phút để làm khô màng.
- Đặt cột RNeasy vào ống thu 1,5 ml mới. Thêm trực tiếp 30–50 μ l nước không chứa RNase vào màng cột. Đóng nắp và ly tâm trong 1 phút ở tốc độ $\geq 8.000 \times g$ để rửa giải RNA.
- Nếu hiệu suất RNA dự kiến là $>30 \mu$ g, lặp lại bước 7 bằng cách sử dụng 30–50 μ l nước không có RNase hoặc sử dụng dịch rửa giải từ bước 7 (nếu cần nồng độ RNA cao). Tái sử dụng ống thu thập từ bước 7.
- Bảo quản mẫu RNA tổng số ở -80°C cho bước tinh sạch tiếp theo.

RNeasy Mini Kit-Part 2:

- Bổ sung 10 μ l RDD Buffer. Trộn đều bằng pipet
- Bổ sung: 2.5 μ l DNase I Stock. Trộn đều bằng pipet. Ủ: 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Bổ sung: 350 μ l RLT Buffer. Trộn đều bằng pipet
- Bổ sung: 250 μ l cồn EtOH 96%. Trộn đều bằng pipet. Chuyển toàn bộ dung dịch lên cột lọc.
- Li tâm: $8.000 \times g / 15$ giây.
- Bổ sung: 500 μ l RPE Buffer (đã được bổ sung cồn EtOH). Li tâm: $8.000 \times g / 15$ giây. Loại bỏ toàn bộ phần dung dịch được lọc dưới cột
- Bổ sung: 500 μ l RPE Buffer (đã được bổ sung cồn EtOH). Li tâm: $8.000 \times g / 2$ phút. Loại bỏ toàn bộ phần dung dịch được lọc dưới cột.
- Chuyển phần cột phía trên sang ống Eppendorf 2 ml mới. Li tâm: 20.000 rpm/ 1 phút (để loại bỏ hoàn toàn cồn EtOH).
- Chuyển phần cột phía trên sang ống Eppendorf 1,5 ml mới. Bổ sung: 30 μ l RNase-free water (được cung cấp trong bộ kit). Ủ: 1 phút ở nhiệt độ phòng.
- Li tâm: 20.000 rpm/ 1 phút.
- Kiểm tra RNA tổng số bằng máy NanoDrop; Bioanalyzer.

- Bảo quản mẫu RNA tổng số ở -80°C .

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số:

KIT QIAamp DSP DNA (QIAGEN, USA) được sử dụng cho quá trình tách chiết và tinh sạch DNA. Quy trình thực hiện tuân theo hướng dẫn từ nhà sản xuất, bao gồm:

- Hút 20 μl QIAGEN protease (QP) vào ống phân giải (LT).
- Bổ sung 200 μl mẫu máu vào ống phân giải (LT).
- Bổ sung 200 μl Chất đệm Phân giải (AL) vào ống phân giải (LT), đậy nắp và lắc nhẹ để mix đều trong 15 giây. Để đảm bảo phân giải hiệu quả, điều quan trọng là mẫu và Chất đệm Phân giải (AL) được trộn kỹ để tạo ra dung dịch đồng nhất.
- Ủ ở 56°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) trong 10 phút (± 1 phút).
- Ly tâm ống phân giải (LT) trong ≥ 5 giây ở tốc độ tối đa để loại bỏ các giọt từ bên trong nắp.
- Bổ sung 200 μl ethanol (96-100%) vào ống phân giải (LT), đậy nắp và trộn kỹ bằng cách lắc nhẹ trong ≥ 15 giây.
- Ly tâm ống phân giải (LT) trong ≥ 5 giây ở tốc độ tối đa để loại bỏ các giọt từ bên trong nắp.
- Sử dụng toàn bộ chất phân giải từ bước 7 cho cột QIAamp Mini mà không làm ướt miệng tube. Tránh chạm màng cột QIAamp Mini vào đầu tip pipet.
- Đậy nắp cột QIAamp Mini và ly tâm ở $6.000 \times g$ trong 1 phút. Đặt cột QIAamp Mini vào một ống rửa (WT) sạch và thải bỏ ống có chứa chất lọc.
- Mở cột QIAamp Mini và bổ sung 500 μl Chất đệm rửa 1 (AW1). Tránh chạm màng cột QIAamp Mini vào đầu tip pipet.

- Đậy nắp cột QIAamp Mini và ly tâm ở 6.000 x g trong 1 phút. Đặt cột QIAamp Mini vào một ống rửa (WT) sạch và thải bỏ ống có chứa chất lọc.
- Bổ sung 500 μ l Chất đệm rửa 2 (AW2).
- Đậy nắp cột QIAamp Mini và ly tâm ở tốc độ tối đa (khoảng 8.000 x g hoặc 20.000 rpm) trong 1 phút. Đặt cột QIAamp Mini vào một ống rửa (WT) sạch và thải bỏ ống có chứa chất lọc.
- Ly tâm ở tốc độ tối đa (20.000 rpm) trong 3 phút để làm khô màng hoàn toàn.
- Đặt cột QIAamp Mini vào ống rửa giải (ET) sạch và thải bỏ ống rửa (WT) chứa chất lọc. Carefully mở nắp của cột QIAamp Mini và đưa 50 đến 200 μ l Chất đệm Rửa giải (AE) vào tâm của màng. Đậy nắp và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm ở 8.000 x g trong 1 phút để rửa giải DNA.
- Kiểm tra DNA tổng số bằng máy NanoDrop; Bioanalyzer.
- Bảo quản mẫu DNA tổng số ở -40°C cho đến khi sử dụng.

2.3.2 Tổng hợp cDNA

Các mẫu RNA tổng số đạt nồng độ tối ưu và đáp ứng độ tinh sạch trong khoảng 1,8-2,0 được sử dụng để tổng hợp cDNA. Quy trình tổng hợp cDNA bao gồm các bước thực hiện như sau [42].

- Giai đoạn biến tính (denaturation): Sử dụng 2-3 μ g RNA tổng số, bổ sung thêm nước khử DEPC cho đủ thể tích 6 μ l/ống. Để ở nhiệt độ 65°C trong 5 phút để biến tính chuỗi RNA.
- Giai đoạn gắn mồi (annealing): Bổ sung 2 μ l Random primer (đã được pha loãng 20 lần) và 5 μ l dNTP nồng độ 10 mM. Để ở nhiệt độ 25°C trong 10 phút, để primer gắn với RNA khuôn, sau đó để trong đá lạnh 1 phút.

- Giai đoạn tổng hợp cDNA (extention): Bổ sung: 4 μ l PCR buffer 5X; 1 μ l DTT 0,1M (ức chế enzyme proteinase); 1 μ l HPRI (ức chế enzyme RNAase); 1 μ l MMLV-RT (enzyme reverse transcriptase). Trộn đều bằng pipet, ly tâm nhanh 10-15 giây. Đưa vào máy PCR với chương trình tổng hợp như sau: 37°C trong 55 phút; 70°C trong 15 phút; 4°C bảo quản tạm thời. cDNA được lưu trữ trong tủ -20°C cho đến khi sử dụng.
- Kiểm tra chất lượng cDNA được tổng hợp bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu với GADPH. Kết quả được kiểm tra trên gel Agarose 1,5%.

2.3.3 Các cặp mồi trong nghiên cứu

Cặp mồi đặc hiệu dùng trong nghiên cứu gen *SLC2a2* và gen đối chứng GADPH được thiết kế dựa trên các thông tin về trình tự của các gen được công bố trên NCBI và chương trình <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Các cặp mồi được đặt của công ty Phu Sa Biochem (Việt Nam) [43].

Bảng 2.1 Các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu.

TT	Gen	Mồi	Trình tự (5' -> 3')	Độ dài	Tm (°C)	GC %
1	SLC2A2	SLC2A2-F1	TTATCTACTTCCGTGTACC	20	59.47	52
		SLC2A2-R1	GCACCATCTTCCACAATTATC	20	59.97	53
		SLC2A2-F2	CCCTGTCCATAGTGGCAACT	20	60.25	55
		SLC2A2-R2	TGATCTAAGCTTCCTCGCTGT	21	59.3	49
2	GADPH	GADPH-F	ATCTCCATCTCCGTTGGCTT	20	59.87	52
		GADPH-R	GGTACTCACTTCTCCATTCT	20	58.73	54

2.3.4 Khuếch đại gen bằng phương pháp PCR

Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) được sử dụng để tổng hợp DNA dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích DNA ban đầu nhằm khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp mồi (primer) đặc hiệu cho các đoạn DNA. Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước [44]:

- Biến tính tách đôi sợi DNA (denaturation): thực hiện ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ nóng chảy của phân tử (94 – 95°C) trong 30 giây - 1 phút, phân tử DNA mạch kép tách thành 2 mạch đơn.
- Bắt cặp (annealing): nhiệt độ được hạ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các primer, cho phép các primer bắt cặp với mạch khuôn (56 °C), thời gian bắt cặp kéo dài 45 giây.
- Kéo dài chuỗi (elongation – extension): nhiệt độ được tăng lên 72°C giúp DNA polymerase hoạt động tốt nhất. Dưới tác động của DNA polymerase, các nucleotide lần lượt gắn vào primer theo nguyên tắc bổ sung với mạch khuôn. Thời gian kéo dài chuỗi được xác định là 60 giây.
- Sự khuếch đại này có thể được tính theo công thức: Tổng lượng DNA khuếch đại = $m \times 2^n$ (với m : Là số bản sao của chuỗi mã hóa. n : Là số chu kỳ).
- Chu kỳ PCR được lặp lại liên tục trong 35 chu kỳ.

2.3.5 Điện di sản phẩm PCR

Phương pháp điện di agarose được sử dụng nhằm phát hiện sản phẩm PCR qua việc quan sát sự phát quang của ethidium bromide gắn với DNA dưới ánh sáng đèn UV [41].

2.3.6 Giải trình tự gen Sanger

Giải trình tự DNA gen *SLC2a2* được tiến hành cùng các bộ KIT tiêu chuẩn và theo hướng dẫn của nhà sản xuất tại phòng thí nghiệm Viện Nghiên

cứu hệ gen. Quy trình giải trình tự DNA theo Sanger thực hiện với các bước giống kỹ thuật PCR, bao gồm: Một enzyme DNA polymerase; Một primer, là một đoạn ngắn của DNA sợi đơn kết hợp với mẫu DNA và hoạt động như một khởi đầu cho polymerase; 4 loại nucleotide deoxy nucleotide DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 4 loại dideoxy nucleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP); Trình tự DNA [42].

2.3.7 Phân tích mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* bằng phương pháp RT-PCR và Realtime-qPCR

RT-PCR: Chu kỳ nhiệt của phản ứng được xác định như sau: 94°C 3 phút, các chu kỳ lặp lại (94°C 10 giây, 50°C-60°C 30 giây, 72°C 40 giây), 72°C 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%. Sản phẩm PCR của các gen được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Độ sáng của các băng điện di trên gel agarose được phân tích bằng phần mềm ImageJ [43].

Realtime-qPCR: Định lượng PCR phiên mã ngược thời gian thực (Realtime-qPCR) được tiến hành trên hệ thống 7300 Real-time PCR (Applied Biosystems, USA) với môi. Tất cả các lần khuếch đại được lặp lại hai lần. Khuếch đại được thực hiện với SYBR® Premix Ex Taq™ Kit (Takara, Nhật Bản) ở thể tích cuối cùng là 20 µL, chứa 1 µL mẫu cDNA, 10 µL SYBR Premix ExTaq (Takara, Nhật Bản), 0,4 µL ROX Reference Dye, 1 µL trong số mỗi môi, và 6,6 µL ddH₂O [44].

Các bước Realtime-PCR được tiến hành theo ba bước chính tạo nên mỗi chu kỳ trong phản ứng PCR thời gian thực. Các phản ứng chạy trong 40 chu kỳ:

1. Biến tính: Ủ ở nhiệt độ cao được sử dụng để "làm tan chảy" DNA sợi kép thành các sợi đơn và nới lỏng cấu trúc thứ cấp trong DNA sợi đơn.

2. Ủ: Trong quá trình, các trình tự bổ sung có thể xảy ra tình trạng gắn môi ngẫu nhiên, vì vậy nhiệt độ thích hợp được sử dụng dựa trên nhiệt độ nóng chảy tính toán (T_m) của môi.

3. Kéo dài chuỗi: Ở 70-72°C, hoạt động của DNA polymerase là tối ưu, và sự kéo dài mới xảy ra với tốc độ lên đến 100 base mỗi giây.

- Lấy các ống H₂O, Master mix, môi và mẫu dò, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm đặt vào giá lạnh trước khi sử dụng.

- Tiến hành trộn các sinh phẩm cho phản ứng trong tủ an toàn sinh học dùng riêng cho chuẩn bị phản ứng PCR, thành phần cho mỗi phản ứng đối với từng gen như sau:

Thành phần	Thể tích (µl)
Master Mix (4X)	5
Forward primer (15 pmol)	1
Reverse primer (15 pmol)	1
Probe (5pmol)	1
Khuôn cDNA	5
Nuclease free water	7

- Cài đặt chương trình chạy trên máy Realtime-PCR

Các bước PCR	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Phiên mã ngược	55°C	10 phút	01
Biến tính bước đầu	95°C	30 giây	01
Biến tính	95°C	12 giây	40
Kéo dài + đọc tín hiệu	60°C	30 giây	

2.4 Phân tích và xử lý số liệu

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R và R-studio (Team RC, 2018) [45]. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm SD hoặc tần số (%). ANOVA một chiều với phân tích post hoc để đánh giá sự khác biệt về thành phần cơ thể, nhân trắc học, thông số chuyển hóa và nội tiết tố giữa nhóm bệnh TĐT2 và nhóm chứng [46]. Mối tương quan của biểu hiện gen với các đặc điểm lâm sàng khác được xác định bằng phân tích tương quan Pearson, với giá trị có ý nghĩa $P < 0,05$. Các sản phẩm PCR trình tự được phân tích bởi Mutation Surveyor v3.2 (SoftGenetics, State College, PA, USA)[47]. Nhiều

trình tự sắp xếp đã được thực hiện bằng công cụ Clustal-W và kết quả này được sử dụng để xác định đột biến nucleotide và axit amin. Công cụ tin sinh học BioEdit được sử dụng cho các trình tự axit nucleic của hai nhóm (bệnh nhân và nhóm chứng) để dịch mã và lấy chuỗi trình tự protein. Phần mềm cơ sở dữ liệu Ensemble đã hỗ trợ tất cả các trình tự exon và protein [48]. Các dữ liệu về chỉ số Ct (Crossing Point), đường cong nóng chảy (Melting Curves) và đỉnh nóng chảy (Melting Peak) của mẫu được xác định và xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm cơ bản và các chỉ số lâm sàng, sinh hoá của các nhóm nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu thu thập được tổng số 40 mẫu máu của nhóm đối tượng khoẻ mạnh (nhóm chứng) và 120 mẫu bệnh phẩm của nhóm bệnh nhân được chẩn đoán mắc TĐT2 (nhóm bệnh) từ khoa Nội tiết của Bệnh viện 198 Bộ Công an. Trong 120 mẫu bệnh phẩm của nhóm đối tượng được chẩn đoán mắc bệnh, tìm hiểu tiền sử bệnh và hồ sơ bệnh án, chúng tôi chia nhóm mắc TĐT2 thành 3 nhóm phụ: 40 mẫu bệnh phẩm thuộc nhóm đối tượng chưa được điều trị bằng thuốc; 40 mẫu thuộc nhóm bệnh nhân đã được chỉ định sử dụng liệu pháp điều trị với Metformine; và 40 mẫu thuộc nhóm được chỉ định điều trị với Gliclazide.

3.1.1 Đặc điểm nhân trắc học cơ bản của các nhóm đối tượng nghiên cứu

Kết quả tổng hợp và phân tích các đặc điểm cơ bản của các nhóm đối tượng tham gia nghiên cứu **Bảng 3.1.** cho thấy, sự phân bố giới tính nam/nữ của nhóm chứng, nhóm không điều trị, nhóm điều trị Metformine và nhóm điều trị Gliclazide lần lượt là 18/22; 19/21; 17/23 và 20/20. Tính trên các nhóm bệnh nhân mắc bệnh thì tỷ lệ nam/nữ tham gia nghiên cứu tương đương nhau lần lượt là 49% và 51%. Nhóm đối chứng có độ tuổi tham gia là 58.04 (± 10.7), trẻ hơn so với các nhóm bệnh. Trong đó có sự tương đồng trong độ tuổi trung bình giữa các nhóm bệnh, với sự gia tăng nhẹ ở nhóm có điều trị và nhóm điều trị bằng Gliclazide có độ tuổi cao nhất là 61.96 (± 9.16). Thời gian mắc bệnh ghi nhận ở nhóm chưa điều trị, nhóm điều trị bằng Metformine và Gliclazide lần lượt là 4.5 (± 2.9), 5.9 (± 4.0), 6.3 (± 4.2) năm. Nhóm điều trị bệnh có thời gian mắc bệnh lâu hơn. Chỉ số khối cơ thể BMI và tỷ lệ eo/hông WHR cao nhất ở nhóm bệnh nhân không điều trị, tương ứng là 23.5 (± 2.6) kg/m² và 0.85 (± 0.1). Trong đó BMI và WHR của nhóm chứng và hai nhóm bệnh được điều trị là tương đương nhau. Như vậy việc sử dụng thuốc có hiệu quả trong việc duy trì chỉ số BMI và WHR của cơ thể ở mức tương đương với nhóm không mắc bệnh.

Bảng 3.1 Các đặc điểm cơ bản và chỉ số lâm sàng, chỉ số chuyển hoá của các nhóm

Nhóm	Đôi chứng	Chưa điều trị với thuốc	Điều trị với Metformin	Điều trị với Gliclazide
Số ca	40	40	40	40
Nam/nữ	18/22	19/21	17/23	20/20
Tuổi (năm)	58.04 ± 10.7	61.58 ± 9.32	61.61 ± 8.23	61.96 ± 9.16
Thời gian mắc bệnh (năm)	-	4.5 ± 2.9	5.9 ± 4.0	6.3 ± 4.2
BMI (kg/m ²)	21.79 ± 1.92	23.5 ± 2.6	21.79 ± 1.74	22.1 ± 1.81
WHR	0.82 ± 0.08	0.82 ± 0.09	0.85 ± 0.1	0.85 ± 0.11
HbA1c (%)	5.44 ± 0.59	6.64 ± 0.9	6.42 ± 1.33	5.61 ± 1.33
FPG (mmol/L)	5.33 ± 0.42	7.52 ± 2.76	7.15 ± 1.27	7.18 ± 1.99
ALT (UI/L)	28.41 ± 6.8	39.54 ± 5.19	29.79 ± 8.34	31.93 ± 12.35
AST (UI/L)	27.43 ± 4.33	31.87 ± 6.96	26.76 ± 6.36	28.48 ± 5.54
HDL Cholesterol (mmol/L)	1.58 ± 0.36	1.32 ± 0.44	1.36 ± 0.52	1.35 ± 0.12
LDL Cholesterol (mmol/L)	2.49 ± 0.59	2.72 ± 0.39	2.58 ± 0.67	2.69 ± 0.34
Cholesterol tổng số (mmol/L)	4.99 ± 0.74	6.13 ± 0.77	4.43 ± 1.1	4.7 ± 1.01
Triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 0.51	3.45 ± 2.38	3.18 ± 2.5	2.21 ± 1.43

3.1.2 Kết quả phân tích và so sánh các chỉ số lâm sàng và chuyển hoá của các nhóm nghiên cứu

Kết quả các chỉ số về chuyển hoá cũng được chúng tôi tổng hợp và phân

tích so sánh giữa các nhóm trong nghiên cứu. Trong đó, mức HbA1c cao nhất ở nhóm bị bệnh không điều trị 6.64 (± 0.9) và thấp nhất là nhóm chứng 5.44 (± 0.59). Mức HbA1c của hai nhóm điều trị với Metformin và Gliclazide đều thấp hơn nhóm không điều trị, lần lượt là 6.42 (± 1.33) và 5.61 (± 1.33). Đối với nhóm bệnh nhân được áp dụng liệu pháp Metformin hoặc Gliclazide, quan sát thấy HbA1c giảm 0,22% trong nhóm metformin và 1,03% cho nhóm Gliclazide so với mức ban đầu là 6,64% ở nhóm không được điều trị. Thành phần cấu tạo chính của hồng cầu là hemoglobin (Hb), ở người trưởng thành Hb bao gồm chủ yếu là HbA (95 – 97%), HbA2 (<3%) và HbF (<1%). Một lượng nhỏ Hb bị glycosyl hoá tạo thành glycohemoglobin. HbA1 được tạo thành do sự glycosyl hoá nhóm amin tự do của valin ở đầu N tận cùng của chuỗi beta với các carbohydrate khác nhau. HbA1 bình thường chiếm từ 5 - 7%, bao gồm HbA1a, HbA1b, HbA1c. HbA1c tạo thành từ HbA gắn với glucose, chiếm 75 – 80% lượng HbA. Thời gian sống của hồng cầu bình thường là 120 ngày, phản ứng glycosyl hóa xảy ra tỷ lệ thuận với nồng độ glucose trong máu, vì vậy ở bệnh nhân tiểu đường tỷ lệ HbA1c tăng cao và HbA1c phản ánh nồng độ glucose máu trong khoảng 2-3 tháng trước đó [49]. Việc hạ thấp nồng độ HbA1c bằng cách kiểm soát chặt chẽ đường huyết để làm giảm tốc độ tiến triển của các biến chứng vi mạch. Trong nghiên cứu này, mặc dù đã xác định được sự giảm nồng độ glucose huyết lúc đói cho cả hai nhóm điều trị, tuy nhiên, nồng độ này vẫn cao hơn so với nhóm đối chứng. Các thử nghiệm điều trị với Metformin cho thấy hiệu quả và có vai trò ức chế tăng đường huyết cũng như tăng lipid máu, và cân nặng của bệnh nhân, cũng như tác động đối với huyết áp. Liệu pháp Metformin (0,5 đến 3 g/ngày) đã được De Fronzo và Harrower chứng minh khả năng giảm FPG và HbA1c một cách đáng kể hơn so với giả dược trong các nghiên cứu lâm sàng có kiểm soát [50], [51]. Nghiên cứu của Foley và cộng sự (2009) đã so sánh hiệu quả giữa Gliclazide và Vildagliptin trong điều trị đối với những bệnh nhân mắc bệnh tiểu đường loại 2 mới phát hiện. Kết quả cho thấy mức giảm trung bình của HbA1c từ mức cơ sở là tương tự ở cả hai nhóm

(-0,5% ở Vildagliptin so với -0,6% ở Gliclazide). Ngoài ra, nồng độ glucose khi đói ở nhóm Gliclazide thấp hơn đáng kể (Δ -0,5 mmol/l, $P < 0,025$) so với nhóm Vildagliptin. Mặc dù vậy, tăng cân ít hơn đáng kể đã được quan sát trong nhóm Vildagliptin so với nhóm Gliclazide (0,8 so với 1,6 kg, $P < 0,01$), và sự giảm đột ngột về đường huyết cũng ít hơn được ghi nhận ở nhóm Vildagliptin so với nhóm Gliclazide (0,7 so với 1,7%). Đáng chú ý, không có trường hợp giảm đường huyết nguy hiểm nào được ghi nhận ở cả hai nhóm [52]. Trong một nghiên cứu khác, Filozoff và Gautier (2010) đã so sánh Vildagliptin với Gliclazide trong bối cảnh điều trị đồng thời với Metformin. Kết quả nghiên cứu này cho thấy giảm HbA1c tương tự (độ chênh lệch -0,03, 95% khoảng tin cậy từ -0,11 đến 0,20) ở cả hai nhóm [53].

Alanin-aminotransferase (ALT) là enzyme được tạo ra chủ yếu ở tế bào gan, ngoài ra có ở một số mô như thận, cơ xương. Hoạt độ ALT huyết tương bình thường ở nam là 10-50 U/L, ở nữ là 10-35 U/L. Khi tế bào gan bị huỷ hoại (viêm gan, xơ gan,...), ALT tăng cao trong máu và có thể tăng tới hàng trăm lần so với bình thường trong viêm gan virus. Số liệu trong **Bảng 3.1** cho thấy chỉ số ALT của nhóm đối chứng, nhóm không điều trị, nhóm điều trị Metformin và nhóm điều trị Gliclazide lần lượt là 28.41 (± 6.8), 39.54 (± 5.19), 29.79 (± 8.34) và 31.93 (± 12.35). Như vậy, tiểu đường làm chỉ số ALT tăng lên và việc sử dụng thuốc cũng có tác dụng khi chỉ số này của hai nhóm được điều trị thấp hơn nhóm không điều trị, mặc dù vậy nhưng vẫn cao hơn nhóm chứng. Trong khi đó, aspartat-aminotransferase (AST) phân bố ở tất cả các mô, có nhiều ở gan, tim, cơ xương. Hoạt độ AST huyết tương bình thường ở nam là 10-50 U/L, ở nữ là 10-35 U/L. AST tăng cao phản ánh tổn thương tế bào gan, tuy nhiên AST không đặc hiệu với gan, sự tăng hoạt độ AST có thể gặp trong nhồi máu cơ tim, suy tim và tổn thương cơ. Mặc dù AST không đặc hiệu như ALT trong tổn thương gan nhưng việc theo dõi tổn thương gan dựa vào 2 enzyme này vẫn được sử dụng phổ biến. Tỷ số giữa ALT và AST là hữu ích cho bác sĩ trong đánh giá bệnh nguyên của các bất thường về enzyme gan. Chỉ

số AST ở nhóm chứng, nhóm không điều trị, nhóm điều trị Metformin và Gliclazide lần lượt là: 27.43 (± 4.33), 31.87 (± 6.96), 26.76 (± 6.36) và 28.48 (± 5.54). Kết quả cho thấy rằng việc sử dụng thuốc có hiệu quả đặc biệt là nhóm sử dụng Metformin.

Cholesterol huyết tương là một trong những thông số cổ điển về hóa sinh lâm sàng đến giờ vẫn có giá trị thực tế, nhất là cholesterol huyết tương được định lượng bằng phương pháp động học enzym. Cholesterol là sterol ở mô động vật, là thành phần chất béo được vận chuyển trong huyết tương của mọi động vật. Cholesterol huyết tương bao gồm 25 - 40% ở dạng tự do và 60 - 75% dạng este hóa. Cholesterol huyết tương có 2 nguồn: ngoại sinh từ thức ăn và nội sinh do gan tổng hợp. Ở người bình thường, giá trị cholesterol trong huyết tương có khoảng tương đối rộng: 140 - 200 mg/dL (3,64 - 5,2 mmol/L). Nồng độ cholesterol huyết tương thay đổi theo tuổi, giới tính và chế độ ăn. Giá trị cholesterol huyết tương phản ánh tình trạng rối loạn lipid máu, đây là rối loạn rất thường gặp ở bệnh nhân tiểu đường, có thể xảy ra trước hoặc khi đã có tiểu đường (thứ phát). Rối loạn lipid máu gây xơ vữa mạch máu, hầu hết các nghiên cứu cho thấy rối loạn lipid máu ở bệnh nhân tiểu đường làm tăng nguy cơ mắc các biến chứng tim mạch và tử vong do đột quy. LDL Cholesterol (LDL-C) là lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp, còn HDL Cholesterol (HDL-C) là lipoprotein cholesterol có tỷ trọng cao. HDL cholesterol chiếm khoảng 1/4 - 1/3 tổng số cholesterol trong máu, được cho là tốt bởi nó vận chuyển cholesterol từ máu về gan, vận chuyển cholesterol khỏi các mảng xơ vữa, do vậy, làm giảm nguy cơ xơ vữa động mạch và biến cố tim mạch nghiêm trọng khác. LDL cholesterol là thành phần xấu của cholesterol, khi LDL cholesterol tăng nhiều trong máu dẫn đến lắng đọng ở thành mạch máu, gây nên các mảng xơ vữa. Mảng xơ vữa dần dần gây hẹp hoặc tắc mạch máu, dẫn đến những bệnh lý nguy hiểm đe dọa tính mạng như nhồi máu cơ tim, đột quy. Giá trị tối ưu của HDL-C là trên 60 mg/dL ($>1.56\text{mmol/L}$), còn của LDL-C là dưới 100 mg/dL ($<2.6\text{mmol/L}$). Phân tích số liệu cho thấy chỉ số HDL-C của nhóm không điều

trị, nhóm điều trị Metformin và Gliclazide lần lượt là 1.32 ± 0.44 , 1.36 ± 0.52 , 1.35 ± 0.12 . Như vậy mặc dù sử dụng thuốc có làm tăng chỉ số này lên, nhưng không đáng kể, cả ba nhóm này đều có chỉ số HDL-C không tối ưu như nhóm chứng (1.58 ± 0.36). Tương tự, chỉ số LDL-C của nhóm chứng, không điều trị, điều trị với Metformin và điều trị với Gliclazide lần lượt là 2.49 ± 0.59 , 2.72 ± 0.39 , 2.58 ± 0.67 và 2.69 ± 0.34 . Như vậy có 2 nhóm đạt được giá trị tối ưu cho chỉ số LDL-C là nhóm chứng và nhóm bị bệnh được điều trị với Metformin, còn nhóm điều trị với Gliclazide có làm cải thiện chỉ số LDL-C so với nhóm điều trị nhưng không đáng kể. Mặc dù vậy khi xét về chỉ số cholestrol toàn phần, hai thuốc Metformin và Gliclazide đều có tác dụng đáng kể. Giá trị cholesterol toàn phần tối ưu là dưới 200 mg/dL ($<5.2\text{mmol/L}$), hai nhóm Metformin và Gliclazide đạt giá trị trung bình tương ứng là 4.43 ± 1.1 và 4.7 ± 1.01 thấp hơn cả nhóm chứng (4.99 ± 0.74) và thấp hơn rất nhiều so với nhóm không điều trị (6.13 ± 0.77).

Lipid ngoài thành phần chính cholesterol còn có triglyceride. Triglyceride huyết tương cũng có 2 nguồn gốc: ngoại sinh từ thức ăn và nội sinh do sự tổng hợp lipid ở gan. Trong huyết tương, triglycerid ngoại sinh được vận chuyển bởi chylomycron và triglycerid nội sinh được vận chuyển bởi lipoprotein tỷ trọng rất thấp. Nồng độ triglycerid ở người bình thường từ 0,76-1,79 mmol/L, tăng theo tuổi ở người trưởng thành, ảnh hưởng bởi lối sống và chế độ ăn. Số liệu từ nghiên cứu này cho thấy chỉ số triglyceride của bệnh nhân tiểu đường không điều trị (3.45 ± 2.38) cao gấp đôi so với nhóm chứng (1.7 ± 0.51). Việc sử dụng thuốc Metformin và Gliclazide giúp làm giảm chỉ số này xuống còn 3.18 ± 2.5 và 2.21 ± 1.43 với Gliclazide giúp giảm chỉ số Triglyceride tốt hơn. Kết quả ở nhóm Metformin tương tự với một nghiên cứu của Landin và cộng sự (1991), trong đó, sự giảm TC và TG đã được quan sát khi sử dụng Metformin, liên quan đến việc cải thiện độ nhạy insulin và giảm nồng độ insulin huyết tương và huyết áp [54].

Jennings và cộng sự (1989) đã thực hiện một đánh giá trên bệnh nhân

lớn tuổi (40-65 tuổi) sử dụng các thuốc hạ đường huyết uống. Kết quả chỉ ra rằng tỷ lệ mắc các triệu chứng hạ đường huyết cao hơn đáng kể ở nhóm được điều trị bằng Glibenclamide so với nhóm Gliclazide ($P < 0,01$) hoặc Chlorpropamide ($P < 0,05$), mặc dù mức HbA1c tương tự nhau [55]. Van Staa và cộng sự (1997) đã đánh giá hiệu quả điều trị của SU đối với đường huyết và tìm thấy tỷ lệ mắc các triệu chứng hạ đường huyết cao hơn ở glibenclamide so với các loại khác, bao gồm cả Gliclazide. Sự giảm FPG cũng tương tự (1,31 so với 1,52 mmol, $P = 0,257$) [56]. Các nghiên cứu trên cho thấy Gliclazide hỗ trợ tốt trong việc kiểm soát đường huyết với nguy cơ hạ đường huyết thấp. Nghiên cứu của Inukaivà cộng sự (2005) đã chỉ ra rằng việc chuyển đổi từ Gliclazide hoặc glibenclamide sang glimepiride không tạo ra sự khác biệt đáng kể trong việc kiểm soát đường huyết (bao gồm cả HbA1c và glucose huyết khi đói).

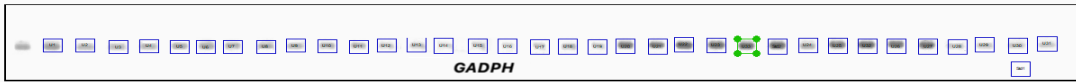
Như vậy, tổng hợp các nghiên cứu cho thấy việc điều trị bằng Metformin và Gliclazide có thể giúp kiểm soát đường huyết và tác động lên các yếu tố liên quan đến lipid máu và trọng lượng cơ thể. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu để hiểu rõ hơn về tác dụng và tương quan giữa các tham số này.

3.2. Mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2*

3.2.1 Mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng

Để phân tích được mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2* ở các nhóm đối tượng nghiên cứu, chúng tôi tiến hành thực hiện kỹ thuật RT-PCR với gen “quản gia” là GADPH. Các dữ liệu phân tích bằng phần mềm phân tích nồng độ sản phẩm PCR QuantityOne được trình bày tại Hình 3.1.

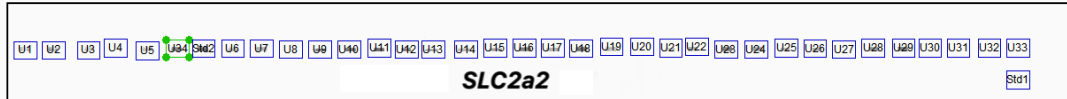
Gel name : (Raw 1-D Image)



Index	Name	Volume INT*mm2	Adj. Vol. INT*mm2	% Adj. Vol.	Concentration
1	Std1	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
2	Std2	9492.945621	9492.945621	100.00	100.0000000000
3	U1	5848.170725	5848.170725	3.74	61.60543796401
4	U2	3792.937045	3792.937045	2.43	39.9532258421
5	U3	3578.007446	3578.007446	2.29	37.69122450033
6	U4	3877.271193	3877.271193	2.48	40.84371014236
7	U5	4010.806093	4010.806093	2.57	42.25038521369
8	U6	4833.851386	4833.851386	3.09	50.92045798037
9	U7	4014.655369	4014.655369	2.57	42.29093402340
10	U8	4284.944563	4284.944563	2.74	45.13819771600
11	U9	3637.894910	3637.894910	2.37	38.95413560996
12	U10	3641.625487	3641.625487	2.33	38.38138573714
13	U11	3532.376023	3532.376023	2.26	37.21053679252
14	U12	2687.424847	2687.424847	1.72	28.30970443604
15	U13	2996.906674	2996.906674	1.92	31.56882873657
16	U14	1885.095660	1885.095660	1.21	19.85785799070
17	U15	2836.216879	2836.216879	1.82	29.87710024403
18	U16	1372.861945	1372.861945	0.88	14.46191729517
19	U17	2109.123550	2109.123550	1.35	22.21779871571
20	U18	3170.684010	3170.684010	2.03	33.40042318212
21	U19	2088.477431	2088.477431	1.34	22.00030964546
22	U20	7851.404179	7851.404179	5.03	82.70777578720
23	U21	6904.412185	6904.412185	4.42	72.73203134792
24	U22	9375.717656	9375.717656	6.00	98.76510443162
25	U23	9233.434401	9233.434401	5.91	97.26627297459
26	U24	4458.721899	4458.721899	2.85	46.96879216155
27	U25	8388.763173	8388.763173	5.37	88.36838962245
28	U26	8060.664845	8060.664845	5.16	84.91215653315
29	U27	8385.333817	8385.333817	5.37	88.3226431926
30	U28	2608.689647	2608.689647	1.67	27.48029696474
31	U29	2839.016353	2839.016353	1.82	29.90659028745
32	U30	2992.007595	2992.007595	1.92	31.51822116058
33	U31	2800.453622	2800.453622	1.79	29.50036453929
34	U32	9099.059659	9099.059659	5.83	95.85075089023
35	U33	8937.320061	8937.320061	5.72	94.14696363140

Background Subtraction Method: Global
data units: Intensity (INT)

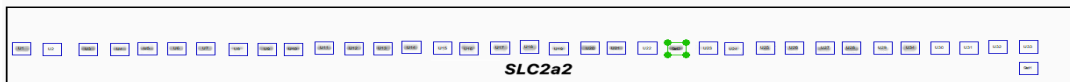
Gel name : (Raw 1-D Image)



Index	Name	Volume INT*mm2	Adj. Vol. INT*mm2	% Adj. Vol.	Concentration
1	Std1	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
2	Std2	995.5628650	995.5628650	100.00	100.0000000000
3	U1	306.1924453	306.1924453	2.45	30.75571177504
4	U2	367.5009212	367.5009212	2.94	36.91388400703
5	U3	264.2703254	264.2703254	2.12	26.54481546573
6	U4	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
7	U5	305.9124979	305.9124979	2.45	30.72759226714
8	U6	342.5156177	342.5156177	2.74	34.40421792619
9	U7	398.1551592	398.1551592	3.19	39.99297012302
10	U8	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
11	U9	574.0320998	574.0320998	4.60	57.65905096661
12	U10	733.1121976	733.1121976	5.87	73.63796133568
13	U11	765.7260672	765.7260672	6.13	76.91388400703
14	U12	581.2407448	581.2407448	4.65	58.38312829525
15	U13	383.6678823	383.6678823	3.07	38.53778558875
16	U14	408.7931596	408.7931596	3.27	41.06151142355
17	U15	444.8363845	444.8363845	3.56	44.68189006678
18	U16	818.7760955	818.7760955	6.55	82.24253075571
19	U17	389.7567378	389.7567378	3.12	39.14938488576
20	U18	791.3412524	791.3412524	6.33	79.48681898067
21	U19	328.6582224	328.6582224	2.63	33.01230228471
22	U20	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
23	U21	176.0169143	176.0169143	1.41	17.68014059754
24	U22	388.9868825	388.9868825	3.11	39.07205623902
25	U23	740.3208426	740.3208426	5.93	74.36203866432
26	U24	473.8109382	473.8109382	3.79	47.59226713533
27	U25	268.5395229	268.5395229	2.15	26.97363796134
28	U26	339.0862623	339.0862623	2.71	34.05975395431
29	U27	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
30	U28	452.6049243	452.6049243	3.62	45.46221444125
31	U29	663.8252214	663.8252214	5.31	66.67838312830
32	U30	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
33	U31	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
34	U32	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
35	U33	0.00000000	0.00000000	0.00	0.000000000000
36	U34	784.7624890	784.7624890	6.28	78.82601054482

Background Subtraction Method: Global
data units: Intensity (INT)

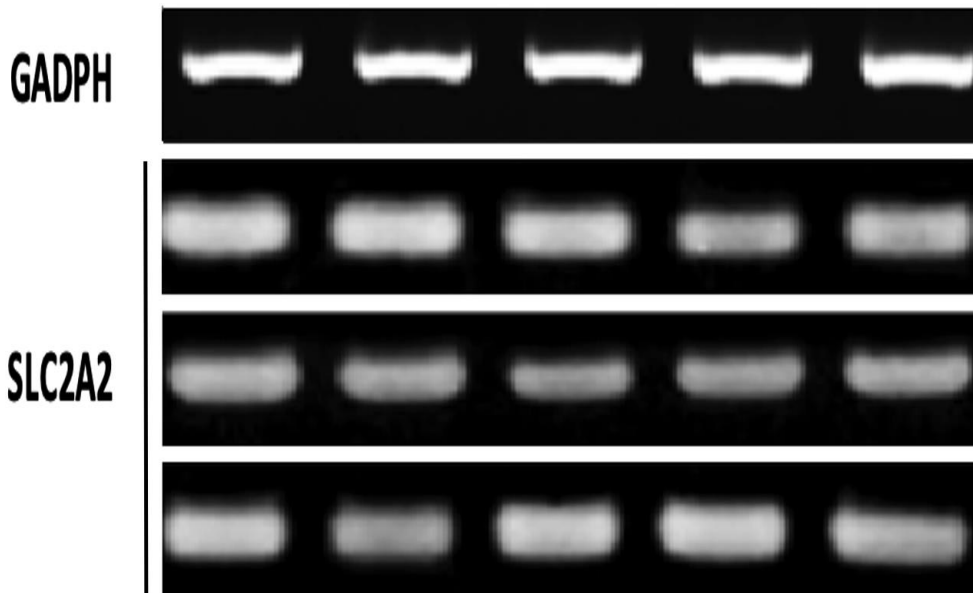
Gel name : (Raw 1-D Image)



Index	Name	Volume INT*mm2	Adj. Vol. INT*mm2	% Adj. Vol.	Concentration
1	Std1	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
2	Std2	3630.777526	3630.777526	100.00	100.0000000000
3	U1	3366.367227	3366.367227	4.52	92.71752958865
4	U2	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
5	U3	3516.419022	3516.419022	4.72	96.85030263310
6	U4	2766.090061	2766.090061	3.71	76.18450981148
7	U5	3015.243228	3015.243228	4.05	83.04676356066
8	U6	2605.750200	2605.750200	3.50	71.76837965997
9	U7	2740.824810	2740.824810	3.68	75.48864643972
10	U8	1583.872281	1583.872281	2.13	43.62350129149
11	U9	3057.375308	3057.375308	4.11	84.20717838005
12	U10	3122.882995	3122.882995	4.19	86.01141138826
13	U11	3164.735128	3164.735128	4.25	87.16411581017
14	U12	3432.784743	3432.784743	4.61	94.54682138864
15	U13	3414.168242	3414.168242	4.59	94.03407995682
16	U14	3216.875327	3216.875327	4.32	88.60017733914
17	U15	790.1514760	790.1514760	1.06	21.76259686187
18	U16	3329.204213	3329.204213	4.47	91.69397432438
19	U17	3421.866795	3421.866795	4.60	94.24611588727
20	U18	3034.209663	3034.209663	4.07	83.56914298932
21	U19	1916.169819	1916.169819	2.57	52.77574308956
22	U20	3544.133813	3544.133813	4.76	97.61363198273
23	U21	2970.101713	2970.101713	3.99	81.80346196846
24	U22	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
25	U23	819.8958850	819.8958850	1.10	22.58182659316
26	U24	1142.185305	1142.185305	1.53	31.45842168164
27	U25	2051.104456	2051.104456	2.75	56.49215467057
28	U26	2142.997183	2142.997183	2.88	59.02309264043
29	U27	2616.948095	2616.948095	3.51	72.07679555881
30	U28	3367.976925	3367.976925	4.52	92.76186437411
31	U29	1102.922685	1102.922685	1.48	30.37703843633
32	U30	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
33	U31	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
34	U32	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
35	U33	0.000000000	0.000000000	0.00	0.000000000000
36	U34	3208.546893	3208.546893	4.31	88.37079301438

Background Subtraction Method: Global
data units: Intensity (INT)

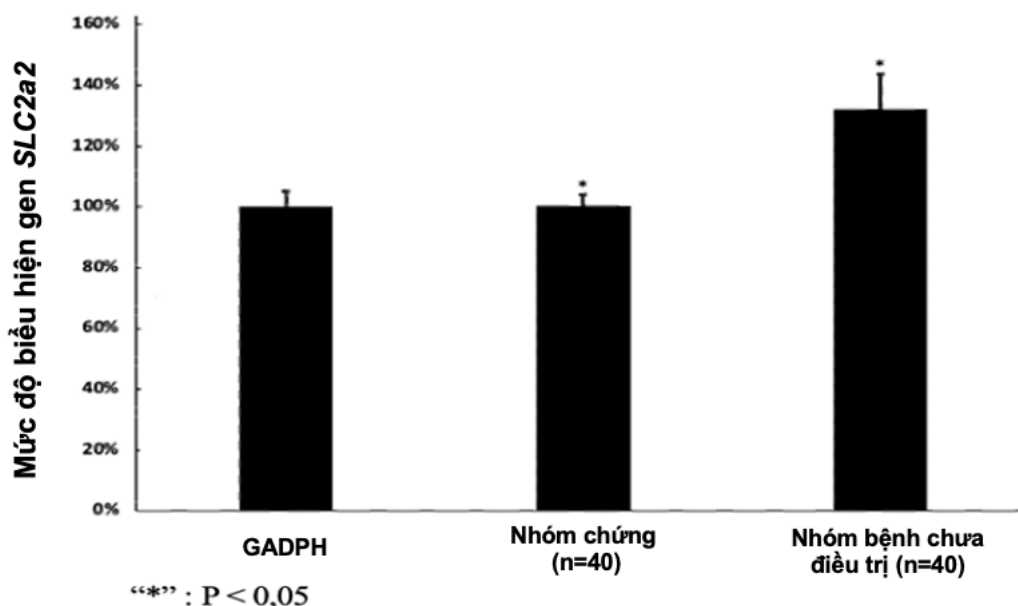
Hình 3.1. Kết quả phân tích sản phẩm RT - PCR bằng phần mềm Quantity One đối với một số mẫu với gen *GADPH* và gen *SLC2a2*.



Hình 3.2: Phổ điện di sản phẩm RT - PCR của một số mẫu phân tích

Trong kỹ thuật RT-PCR bán định lượng, độ sáng của băng điện di sản phẩm PCR được sử dụng để đánh giá tương đối mức độ biểu hiện gen. Tổng hợp các kết quả phân tích, các dữ liệu về mức độ biểu hiện gen giữa các nhóm

ngiên cứu được thể hiện tại Hình 3.3 như dưới đây:

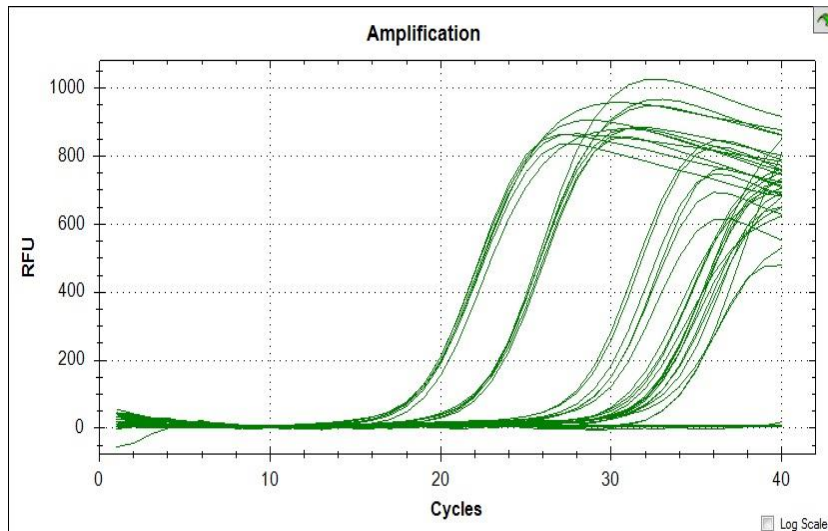


Hình 3.3: Mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2* của nhóm bệnh so với nhóm chứng

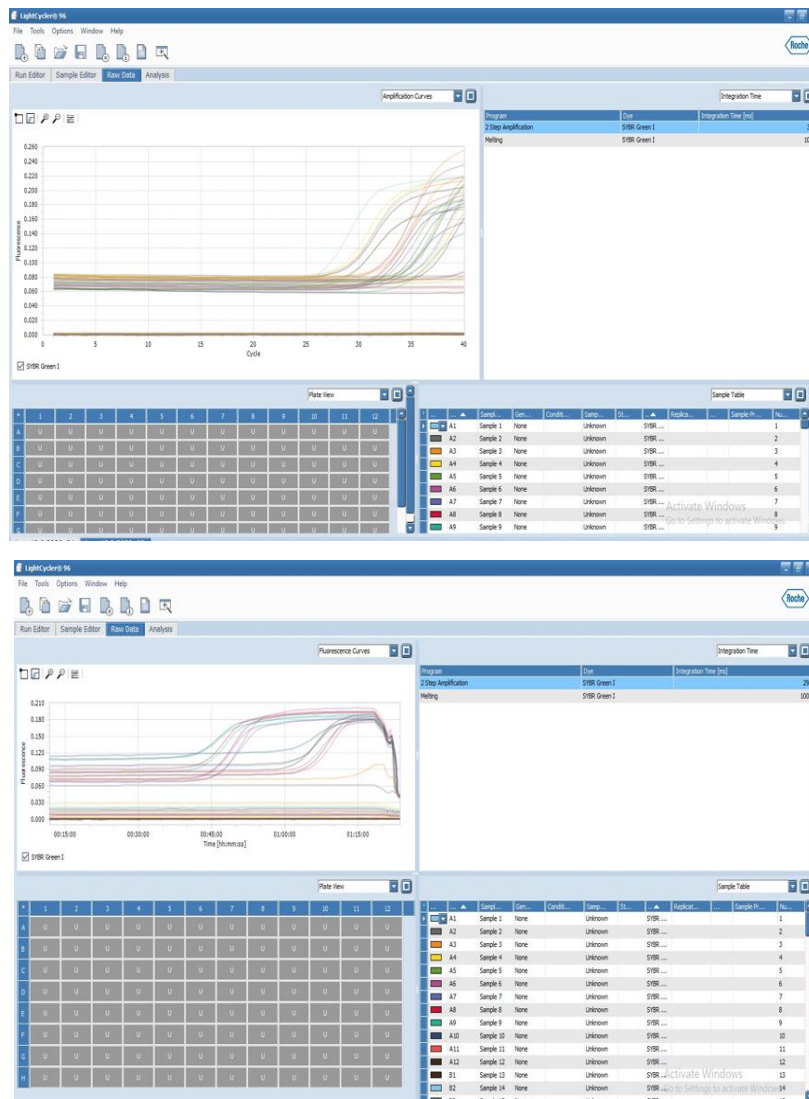
Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2* là có sự thay đổi rõ rệt và có ý nghĩa khi so sánh giữa nhóm mắc bệnh TĐT2 với nhóm chứng ($P < 0,05$). Cụ thể, mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* ở nhóm bệnh cao hơn so với nhóm chứng với sự chênh lệch khoảng 30% (Hình 3.3). Điều này gợi ý mối liên quan chặt chẽ giữa bệnh lý tiểu đường và sự biểu hiện GLUT2.

3.2.2 Mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* giữa các nhóm bệnh nhân được chỉ định điều trị bằng Metformin và Gliclazide

Để hiểu rõ hơn mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2* trong nhóm bệnh nhân được chẩn đoán mắc TĐT2, kỹ thuật Realtime-qPCR được tiến hành trên hệ máy 7300 Real-time PCR (Applied Biosystems, USA) với các cặp mồi đã được thiết kế và các mẫu dò đặc hiệu. Kết quả cho thấy, mồi và mẫu dò thiết kế chỉ khuếch đại đặc hiệu với các gen được xác định trong nghiên cứu và không cho tín hiệu khuếch đại, hoặc tín hiệu khuếch đại ở $Ct > 39$ với các gen thuộc đối chứng âm.



Hình 3.4: Đồ thị biến đổi độ đặc hiệu của môi và mẫu dò thiết kế dựa trên các gen nghiên cứu.

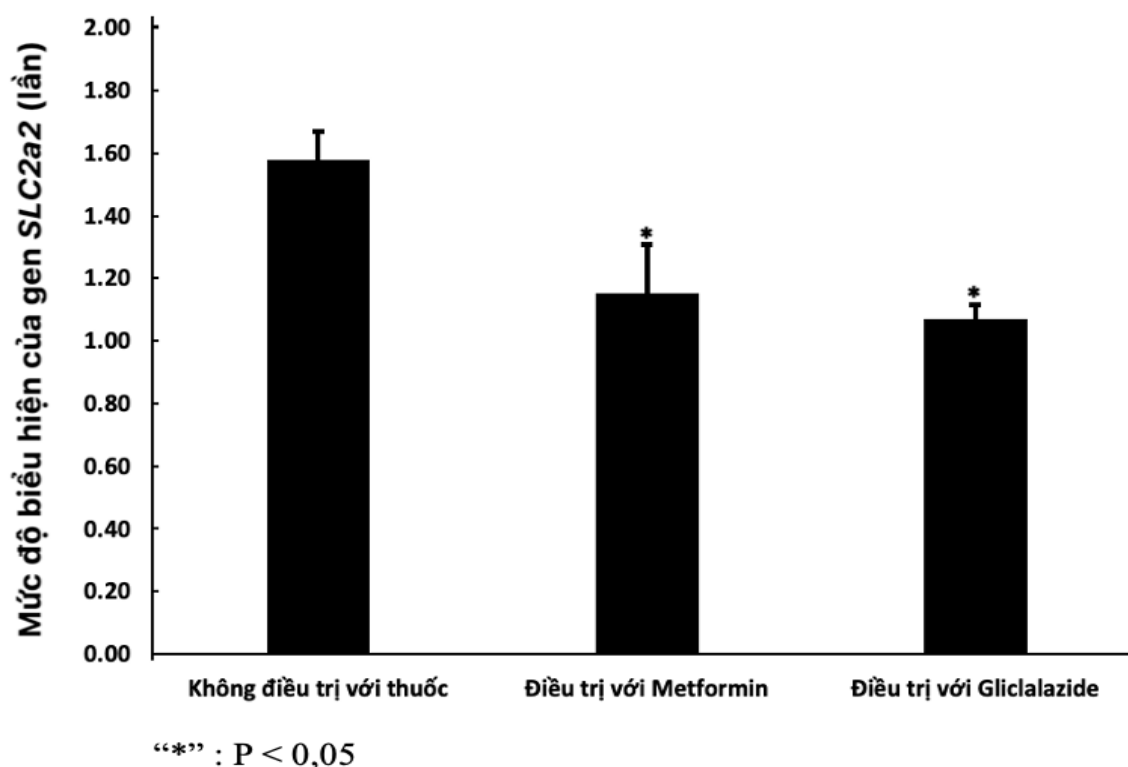


Hình 3.5: Tín hiệu huỳnh quang của các mẫu thuộc nhóm bệnh trên gen *SLC2a2*.

Phương trình tuyến tính (R^2) là phương trình biểu diễn mối tương quan giữa chu kì ngưỡng ($y=Ct$) với \log_{10} của số lượng bản sao đích ban đầu có trong ống phản ứng (x), hàm số đó dạng: $y = ax + b$. Trong đó, a là slope hay gọi là độ dốc của đường tuyến tính, b -intercept, đường hiển thị trên biểu đồ chuẩn. Dựa vào giá trị slope có thể tính được hiệu suất phản ứng theo công thức $E = 10^{-(1/\text{slope})} - 1$.

Để kiểm tra độ tuyến tính và hiệu suất phản ứng, chuẩn bị 6 nồng độ 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 và 10 bản sao, sử dụng 5 μ l cho mỗi nồng độ/phản ứng. Kết quả, phương trình tuyến tính cho gen *SLC2a2* trong nghiên cứu là $y = 4,3571x + 44,5$; $R^2 = 0.9619$. Phản ứng Realtime - qPCR tối ưu cần phải có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,98$ để hiệu quả khuếch đại đạt 95 – 105%. Như vậy, phản ứng Realtime-qPCR với các cặp môi và mẫu dò thiết kế đạt yêu cầu về độ tuyến tính, độ chính xác cao.

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện *SLC2a2* ở bệnh nhân không điều trị với thuốc cao hơn đáng kể so với hai nhóm điều trị với Metformin và Gliclazide (**Hình 3.6**). So sánh với các kết quả từ nghiên cứu trước đến nay cũng cho thấy rằng, những thay đổi trong biểu hiện gen *SLC2a2* có vai trò quan trọng trong việc điều hòa bởi glucose bởi *SLC2a2* là chất vận chuyển glucose không phụ thuộc vào insulin.



Hình 3.6: Mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2* trong các nhóm đối tượng được chỉ định sử dụng Metformin và Gliclazide

Bên cạnh đó, GLUT-2 (protein được mã hóa bởi *SLC2a2*) có thể liên quan đến kháng insulin khi biểu hiện của nó tăng lên ở gan [57], [58]. Kết quả trong nghiên cứu gợi ý rằng, việc giảm mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* có thể do tác dụng của Metformin và Gliclazide. Đáng chú ý, khi điều trị với Gliclazide, biểu hiện của *SLC2a2* giảm nhẹ so với Metformin. Những phát hiện này phù hợp với kết quả thu được của các nhà nghiên cứu khác, với bệnh nhân TĐT2 có sự gia tăng đáng kể mức độ biểu hiện của gen *SLC2a2* [59].

3.2.3 Môi trường quan giữa mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* với các chỉ số sinh hoá và chuyển hoá trong nhóm bệnh nhân được điều trị

Để đánh giá môi trường quan của biểu hiện gen *SLC2a2* với kiểm soát đường huyết, phân tích hồi quy tuyến tính được thực hiện. Kết quả của nghiên cứu cho thấy trong cả hai nhóm điều trị Metformin và Gliclazide, biểu hiện gen *SLC2a2* có tương quan thuận với BMI, TC và LDL-C. Cụ thể, trong nhóm Metformin, hệ số tương quan r của chỉ số BMI, TC và LDL-C lần lượt là 0.015, 0.183, 0.071. Nhóm Gliclazide có hệ số tương quan r tương ứng là 0.117, 0.082

và 0.039. Kết quả này cho thấy mức độ biểu hiện *SLC2a2* tăng và giảm song song với BMI, TC và LDL-C ở cả hai nhóm điều trị. Đáng chú ý, biểu hiện *SLC2a2* và LDL-C tương quan nghịch ở nhóm không điều trị, gợi ý rằng sự thay đổi nồng độ LDL-C ở liệu pháp điều trị Metformin và Gliclazide có thể thông qua tác động lên biểu hiện gen *SLC2a2*. Tương tự, chỉ số TC cũng có tương quan nghịch ở nhóm không điều trị nhưng tương quan thuận ở nhóm điều trị so với biểu hiện gen *SLC2a2*. Điều này cho thấy mối liên hệ giữa biểu hiện gen *SLC2a2* với nồng độ và thành phần cholesterol và việc sử dụng Metformin và Gliclazide có thể thay đổi mối tương quan này (**Bảng 3.2**).

Bảng 3.2: Kết quả phân tích mối tương quan giữa các biến số và mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* ở các nhóm bệnh nhân tiểu đường tuýp 2

Chỉ số	Đối chứng		Không điều trị		Điều trị với Metformin		Điều trị với Gliclazide	
	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Tuổi	-0.165	0.232	0.055	0.098	-0.046	0.079	-0.170	0.218
BMI	0.220	0.109	-0.051	0.074	0.015	0.109	0.117	0.401
WHR	0.016	0.108	-0.026	0.056	-0.154	0.243	0.087	0.058
Thời gian mắc bệnh	-	-	0.133	0.348	-0.036	0.085	-0.044	0.051
TC	-0.236	0.086	-0.037	0.093	0.183	0.165	0.082	0.553

TG	-0.079	0.565	-0.193	0.069	-0.066	0.119	-0.038	0.283
HDL-C	0.095	0.062	0.106	0.149	0.125	0.075	-0.082	0.063
LDL-C	0.032	0.168	-0.025	0.054	0.071	0.085	0.039	0.203

Hệ số tương quan của chỉ số WHR trong nhóm Metformin và Gliclazide lần lượt là -0.154 và 0.087. Như vậy chỉ số WHR tương quan nghịch biến với mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* ở nhóm Metformin, nhưng có mối quan hệ đồng biến ở nhóm Gliclazide. Đặc biệt, mối liên hệ giữa biểu hiện *SLC2a2* và WHR ở nhóm không điều trị, là tương quan nghịch ($r=-0.026$), ở nhóm đối chứng là tương quan thuận ($r=0.016$). Điều này cho thấy, việc điều trị với Gliclazide cải thiện chỉ số WHR cân bằng với nhóm bệnh nhân không bị tiểu đường.

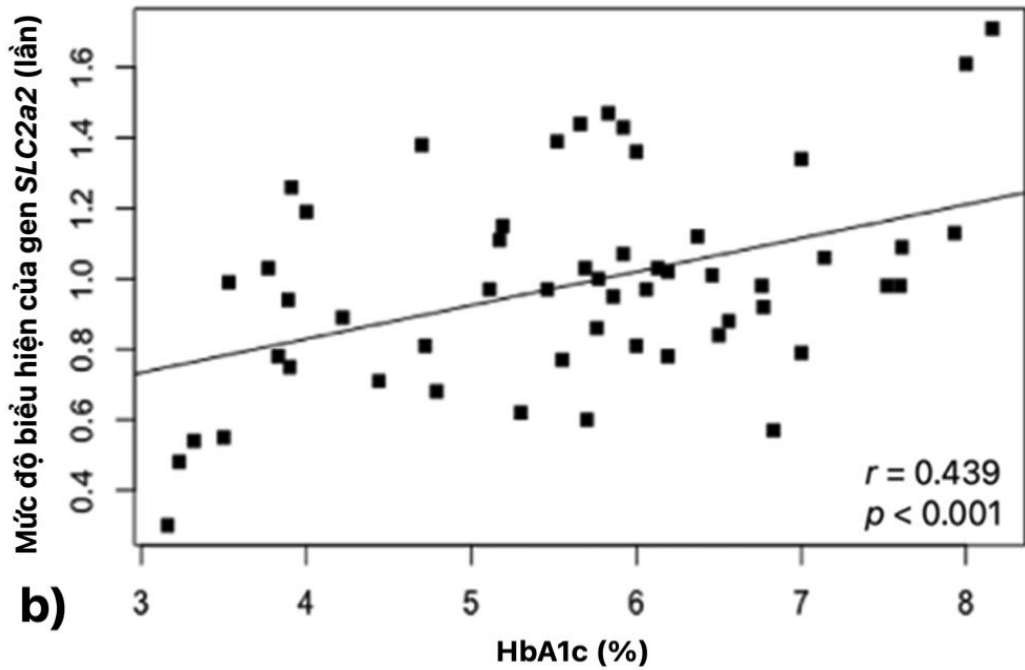
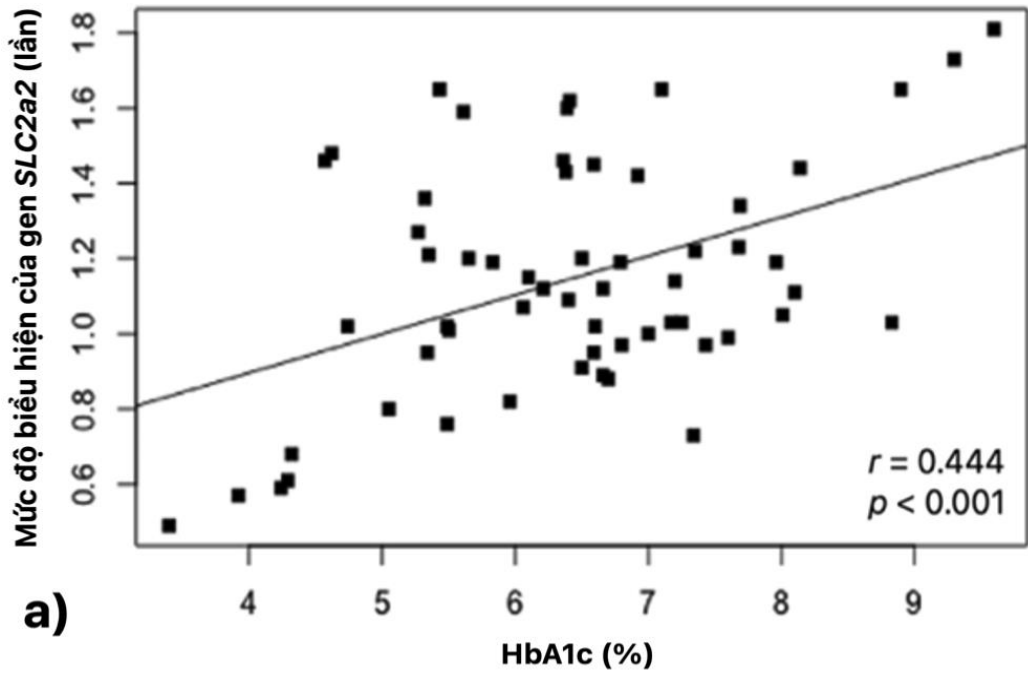
Mặt khác, hệ số tương quan với chỉ số HDL-C trong nhóm Metformin và Gliclazide lần lượt là 0.125 và -0.082. Như vậy, mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* tương quan thuận với nồng độ HDL-C trong nhóm điều trị với Metformin và tương quan nghịch ở nhóm điều trị với Gliclazide. Cả hai nhóm chứng và nhóm không điều trị đều có mối tương quan thuận với HDL-C với hệ số tương quan lần lượt là 0.095 và 0.106. Điều này cho thấy việc sử dụng Gliclazide có thể thay đổi mối tương quan này.

Đối với chỉ số TG, mối tương quan nghịch được xác định ở cả 4 nhóm: nhóm chứng, nhóm không điều trị, nhóm điều trị với Metformin và nhóm điều trị với Gliclazide với hệ số tương quan lần lượt là -0.079, -0.193, -0.066, -0.038. Như vậy việc sử dụng thuốc có xu hướng cải thiện tương quan giữa biểu hiện *SLC2a2* và nồng độ TG trong máu về gần giá trị r ở nhóm chứng.

Bên cạnh đó, tác dụng hạ cholesterol toàn phần (TC) và triglycerid (TG) của phương pháp điều trị bằng Metformin và Gliclazide cũng được xác định.

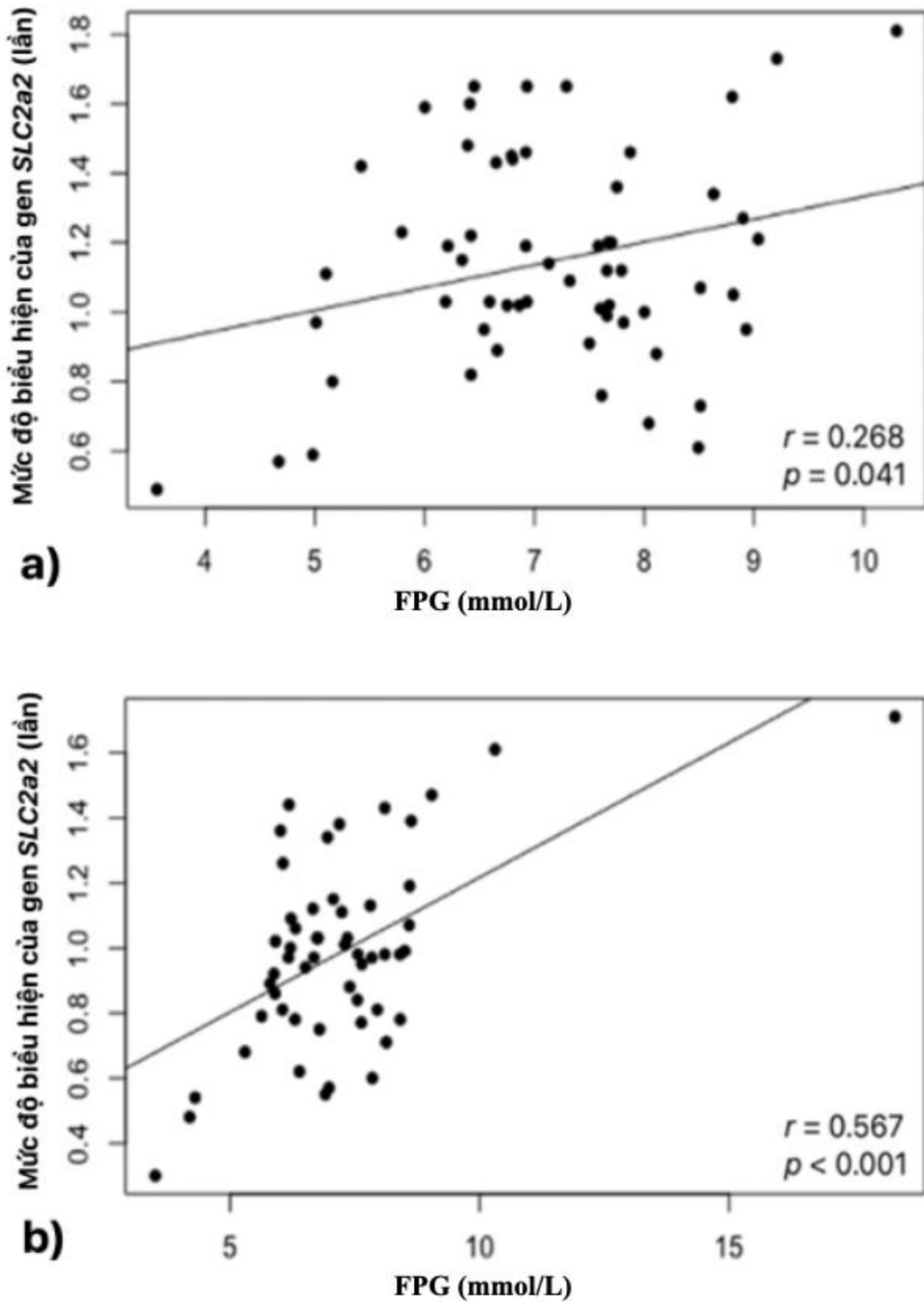
Nồng độ TC được duy trì ở mức 4,43 mmol/L so với 4,99 mmol/L ở nhóm chứng và 6,13 mmol/L ở nhóm không được điều trị. Nồng độ TG là 3,18 mmol/L, giảm 0,27mmol/L so với nhóm không điều trị, vẫn cao hơn 1,7 mmol/L so với nhóm chứng. Trong nghiên cứu Landin K, tăng huyết áp không mắc bệnh tiểu đường và không mắc bệnh không điều trị, liệu pháp Metformin làm giảm TC và TG, đồng thời cải thiện độ nhạy insulin, giảm insulin huyết tương và huyết áp rõ rệt [54]. Ngoài ra, các mối quan hệ giữa FPG, kiểm soát HbA1c, TC, TG và chỉ số lipid đã được đánh giá ở bệnh nhân TĐT2 trong một số nghiên cứu được báo cáo. Mullugeta Y báo cáo rằng HbA1c có liên quan tích cực với TC nhưng không phải với LDL-C [60] Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy mối tương quan thuận giữa HbA1c với LDL-C và TC [61]. Một số nghiên cứu khác báo cáo rằng LDL-C không liên quan đến HbA1c và TĐT2 [62], [63] và thậm chí LDL-C có thể còn thấp hơn [64], [65].

Nghiên cứu này chỉ ra rằng ở cả hai nhóm điều trị, biểu hiện *SLC2a2* có tương quan thuận với các dấu hiệu kiểm soát đường huyết như nồng độ glucose huyết tương lúc đói (FPG) và glycated hemoglobin (HbA1c), ở nhóm Metformin (FPG: $r = 0,268$, $P = 0,041$ và HbA1c: $r = 0,444$, $P < 0,001$) và Gliclazide (FPG: $r = 0,567$, $P < 0,001$ và HbA1c: $r = 0,439$, $P < 0,001$), tương ứng (**Hình 3.4** và **Hình 3.5**).



Hình 3.7: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* với chỉ số HbA1c (%) trong nhóm bệnh nhân được điều trị

a) với Metformin; b) với Gliclazide.



Hình 3.8: Môi tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* với chỉ số FPG (mmol/L) trong nhóm bệnh nhân được điều trị

a) với Metformin; b) với Gliclazide.

Các nghiên cứu từ trước cho đến nay đã chỉ ra rằng, đơn trị liệu

Metformin hoặc Gliclazide được coi là điều trị đầu tay ở những bệnh nhân dễ bị tăng cân và (hoặc) rối loạn lipid máu và những người không đạt được kiểm soát đường huyết đầy đủ khi chỉ quản lý chế độ ăn uống. Một nhóm nghiên cứu đã chứng minh rằng Metformin có liên quan đến hiện tượng giảm glucose máu mạnh mẽ trong nhóm đối tượng mang một loại biến thể của GLUT2 so với nhóm không có biến thể đó. Biến thể này có thể ảnh hưởng đến chỉ số HbA1c trên bệnh nhân điều trị với Metformin. Mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* có thể phụ thuộc vào biến thể của gen này dẫn đến việc tăng hoặc giảm biểu hiện GLUT2 trong các loại tế bào liên quan đến điều hòa đường máu [66]. Còn ít nghiên cứu khai thác cơ chế Metformin điều hòa các protein vận chuyển họ GLUT, bao gồm GLUT2, cho dù một vài bằng chứng cho thấy metformin có thể tăng biểu hiện GLUT2 trên tế bào ruột non, gan và các mô khác [67].

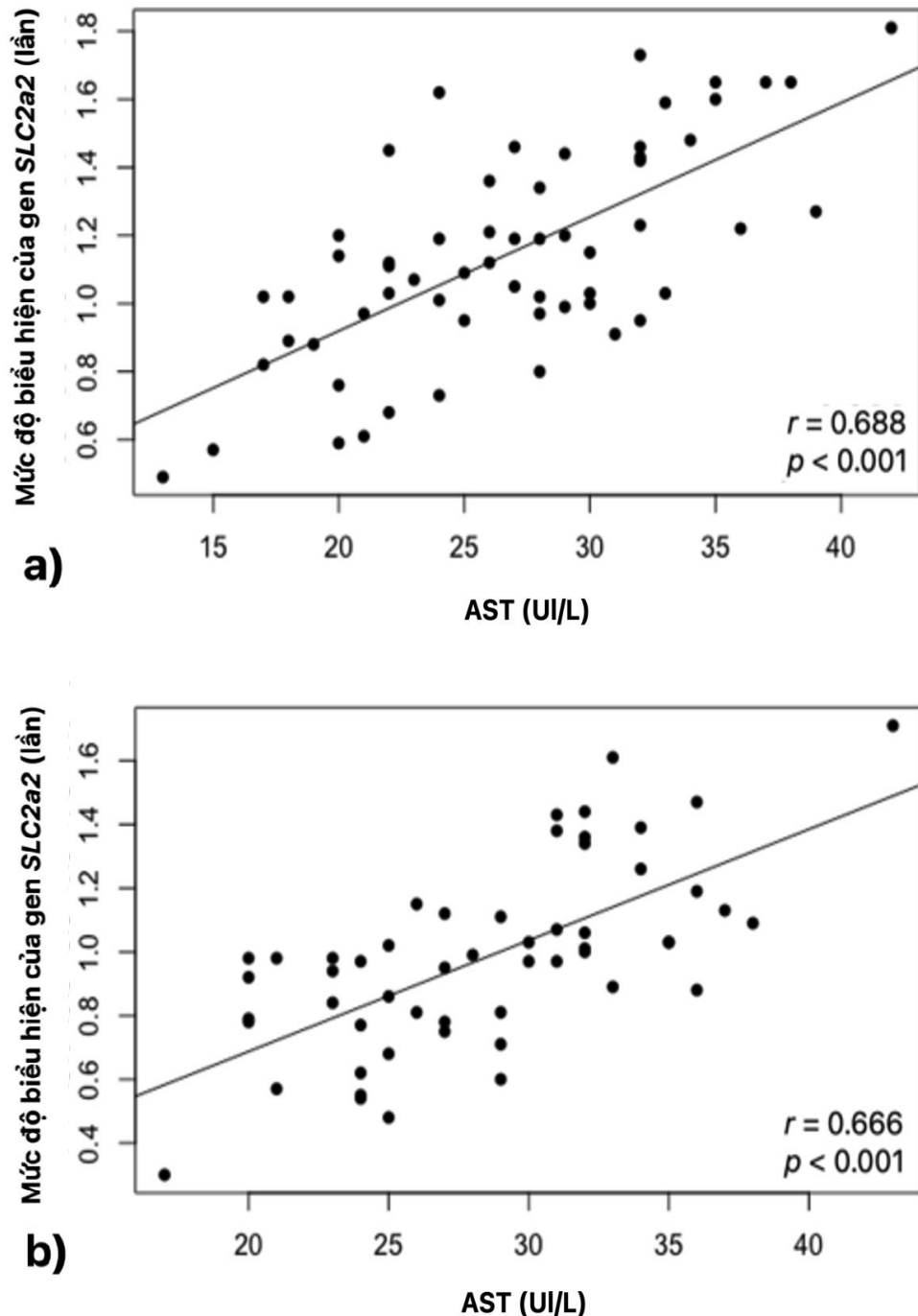
So sánh với kết quả thu được trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy rằng Metformin và Gliclazide có tác dụng làm giảm FPG, HbA1c và duy trì trọng lượng cơ thể ổn định. Đối với nhóm bệnh nhân được chỉ định điều trị bằng Metformin hoặc Gliclazide, HbA1c giảm 0,22% ở nhóm Metformin và 1,03% ở nhóm Gliclazide so với 6,64% ban đầu ở nhóm không điều trị. Mặc dù mức giảm FPG của cả hai nhóm đã được xác định, nhưng FPG vẫn giữ ở mức cao hơn so với nhóm chứng.

Trong các thử nghiệm trị liệu với Metformin được tiến hành trên thế giới, bệnh nhân được đánh giá hiệu quả hạ đường huyết và hạ lipid máu cũng như ảnh hưởng đến trọng lượng cơ thể và huyết áp. Đơn trị liệu Metformin (0,5 đến 3 g/ngày) làm giảm nồng độ FPG và mức HbA1c ở mức độ lớn hơn đáng kể so với giả dược trong các nghiên cứu lâm sàng có đối chứng [51], [68]. Harrower (1985), so sánh hiệu quả đường huyết của 5 SU (n = 112) Chlorpropamide, Glibenclamide, Glipizide, Gliquidone và Gliclazide trong thời gian theo dõi 1 năm. Kết quả cho thấy Gliclazide vượt trội hơn hẳn trong việc giảm HbA1c so với bốn SU còn lại [69]. Trong một nghiên cứu đa trung tâm mù đôi ngẫu nhiên của Perreillo và cộng sự. (2006), họ nhận thấy sự giảm HbA1c và FPG tương tự

với Gliclazide và Pioglitazone [70].

Nghiên cứu của Foley và cộng sự. (2009) so sánh Gliclazide với Vildagliptin ở bệnh nhân TĐT2 chưa điều trị. Mức giảm trung bình của HbA1c so với ban đầu là tương tự ở cả hai nhóm (-0,5% trong Vildagliptin so với -0,6% trong Gliclazide). Hơn nữa, FPG thấp hơn đáng kể ở nhóm Gliclazide (Δ -0,5 mmol/L, $P < 0,025$) so với Vildagliptin. Tuy nhiên, sự gia tăng cân nặng ít hơn đáng kể với Vildagliptin so với Gliclazide (0,8 so với 1,6kg, $P < 0,01$) và các đợt hạ đường huyết nhẹ hơn được quan sát thấy ở nhóm Vildagliptin so với Gliclazide (0,7 so với 1,7%). Đáng chú ý, không có đợt hạ đường huyết nghiêm trọng nào được quan sát thấy ở cả hai nhóm [71]. Trong một nghiên cứu khác, Filozoff và Gautier (2010) đã so sánh Vildagliptin với Gliclazide trong liệu pháp với Metformin nền. Nghiên cứu này cho thấy mức giảm HbA1c tương tự nhau (Δ -0,03, 95% CI -0,11 đến 0,20) ở cả hai nhóm. Mức giảm FPG tương tự cũng được quan sát thấy ở cả hai nhóm (1,31 so với 1,52 mmol/L, $P = 0,257$). Mặc dù, các biến cố hạ đường huyết (6 so với 11 trong Gliclazide) và tăng trọng lượng cơ thể (+0,08 so với +1,36 ở gliclazide, $P < 0,001$) thấp hơn ở nhóm Vildagliptin; Số lượng bệnh nhân ngừng điều trị cao hơn ở nhóm Vildagliptin (22 so với 13 trong Gliclazide) là do tác dụng đường huyết không đạt yêu cầu [62]. Tuy nhiên, một nghiên cứu tiền cứu mù đôi có đối chứng bằng nghiên cứu của Jerums không tìm thấy sự khác biệt đáng kể trong việc kiểm soát đường huyết ở nhóm Gliclazide so với những nhóm khác [72]. Jennings trong một tổng quan biểu đồ hồi cứu đã đánh giá tần suất hạ đường huyết ở những bệnh nhân lớn tuổi (40-65 tuổi) dùng thuốc hạ đường huyết dạng uống. Nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ xuất hiện các triệu chứng hạ đường huyết cao hơn đáng kể ở những bệnh nhân được điều trị bằng Glibenclamide so với Gliclazide ($P < 0,01$) hoặc Chlorpropamide ($P < 0,05$), mặc dù mức HbA1c tương tự [73]. Van Staa đã đánh giá tình trạng hạ đường huyết ở những bệnh nhân được điều trị bằng SU và nhận thấy tỉ lệ hạ đường huyết đối với glibenclamide cao hơn so với các SU khác bao gồm Gliclazide[74]. Inukai cho

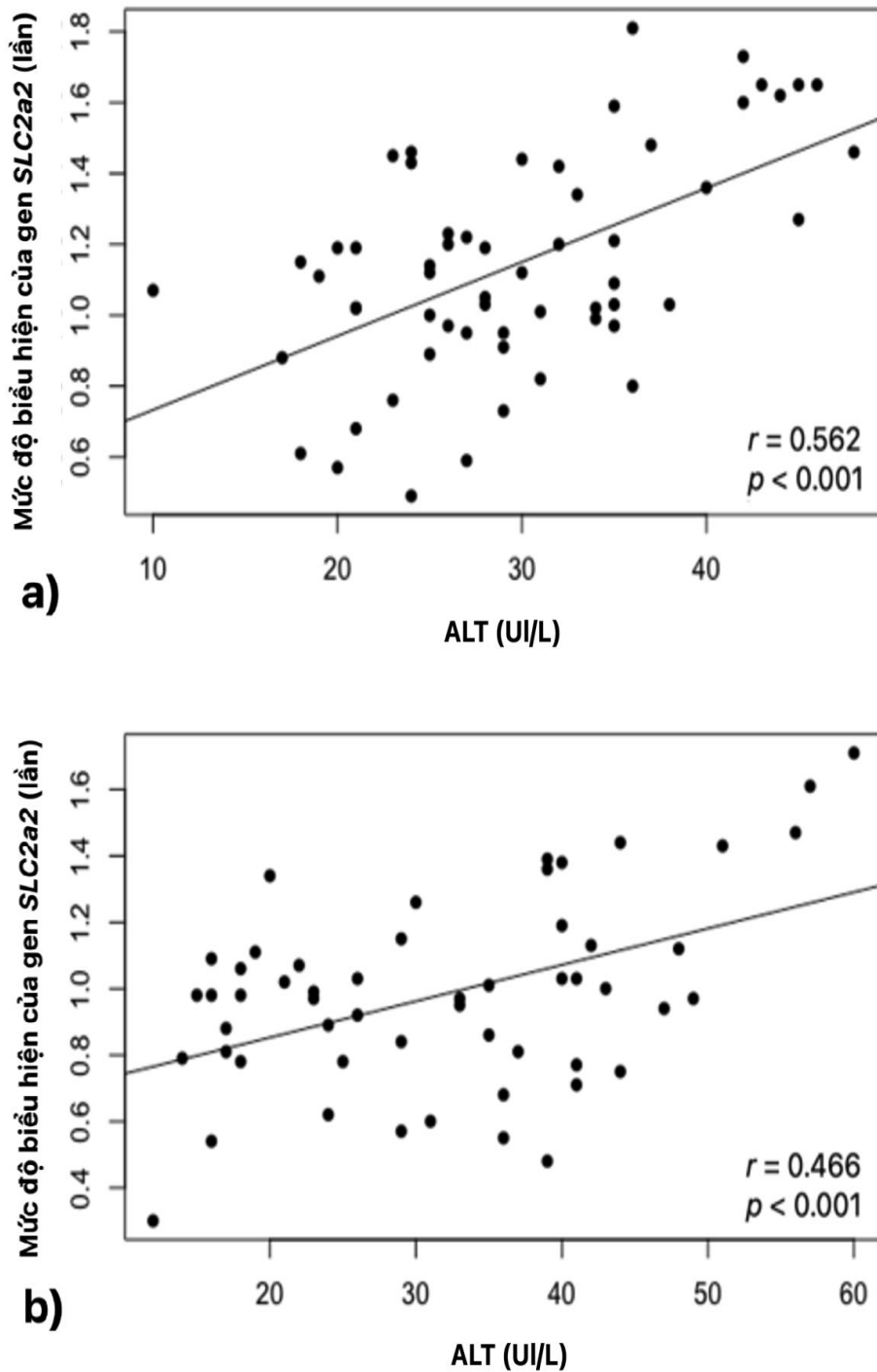
thấy không có sự khác biệt trong việc kiểm soát đường huyết (HbA1c và đường huyết lúc đói) khi bệnh nhân được chuyển sang dùng Glimepiride từ Gliclazide và Glibenclamide. Tuy nhiên, mức giảm HbA1c tốt hơn đáng kể ở nhóm chuyển sang dùng Glimepiride [75] .



Hình 3.9: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* với chỉ số AST (UI/L) trong nhóm bệnh nhân được điều trị

a) với Metformin; b) với Gliclazide.

Ngoài ra, mối tương quan giữa biểu hiện gen *SLC2a2* với các thông số chuyển hóa khác và cấu hình lipid liên quan đến bệnh TĐT2 cũng được đánh giá. Trong đó, hai dấu hiệu men gan (AST và ALT), thường được đo trong máu để đánh giá sức khỏe gan, được phát hiện có tương quan thuận và có ý nghĩa với biểu hiện *SLC2a2* khi điều trị ($P < 0,001$) (Hình 3.6 và Hình 3.7).



Hình 3.10: Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* với chỉ số ALT (UI/L) trong nhóm bệnh nhân được điều trị

a) với Metformin; b) với Gliclazide.

Hệ số tương quan giữa biểu hiện *SLC2a2* với AST và ALT ở nhóm Metformin lần lượt là 0.688 và 0.562. Ở nhóm Gliclazide hệ số tương ứng là 0.666 và 0.466. Tương tự với các chỉ số về cholesterol, các chỉ số chức năng gan có thể thay đổi thông qua tác động của Metformin và Gliclazide lên *SLC2a2*.

Nhìn chung, không có tác dụng chính nào đối với chỉ số lipid do Metformin hoặc Gliclazide gây ra trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, trong một số nghiên cứu, sự cải thiện về bất thường chỉ số lipid liên quan đến bệnh TĐT2 đã được báo cáo với liệu pháp Gliclazide [76].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh chỉ số lipid được cải thiện ở bệnh nhân rối loạn lipid máu do bệnh nhân mắc TĐT2 được chỉ định điều trị với Metformin (Scarpello và Howlett, 2008). Nghiên cứu hiện tại đã chứng minh những cải thiện đáng kể trong chỉ số lipid với liệu pháp đơn trị Gliclazide-MR, trong khi chỉ số lipid không khác biệt đáng kể so với ban đầu ở nhóm điều trị với Metformin. Bên cạnh đó, các chỉ số về TC và TG trong nhóm Gliclazide-MR giảm, tuy nhiên, vẫn nằm trong giới hạn cho phép [77].

Không có bệnh nhân nào có giá trị AST hoặc ALT cao hơn 2 lần so với bình thường ở cả hai nhóm bệnh nhân được điều trị với các loại thuốc khác nhau.

3.3 Trình tự gen *SLC2a2* và xác định các điểm xuất hiện đột biến trên gen

Trong nghiên cứu của này, giải trình tự Sanger cho gen *SLC2a2* được tiến hành nhằm tìm kiếm và xác định các điểm đột biến có thể ảnh hưởng đến biểu hiện gen trên các đối tượng bệnh nhân mắc TĐT2. Việc giải trình tự này giúp hiểu rõ hơn về vai trò của gen *SLC2a2* trong quá trình phát triển bệnh và cách nó tương tác với các yếu tố môi trường. Tổng số 10 mẫu đối chứng và 20 mẫu bệnh được chẩn đoán mắc TĐT2 được tiến hành giải trình tự cho exon 5 và exon 9.

Sau khi hoàn thành quá trình giải trình tự, trình tự gen được đọc và so

sánh trực tiếp bằng phần mềm MEGA và BioEdit. Chúng tôi đã sử dụng các gen tham chiếu có sẵn trong thư viện gen NCBI để so sánh và xác định các sự khác biệt trong trình tự gen của các bệnh nhân.



Hình 3.11: Kết quả giải trình tự và so sánh của các điểm đột biến trên các mẫu với exon 5 và exon 9 của gen *SLC2a2*.

Kết quả của nghiên cứu cho thấy sự xuất hiện của các đột biến trên gen *SLC2a2* ở hai trong số các bệnh nhân mắc TĐT2 trong nhóm điều trị bằng Metformin. Hai đột biến này là *SLC2a2* đồng hợp tử c.1127T> G (p.Met376Arg) ở exon 9 và *SLC2a2* đồng hợp tử c.609T> C (p.Ser203Ser) ở exon 5. Đáng chú ý, đột biến thứ hai không dẫn đến thay đổi trình tự axit amin protein mã hóa bởi gen *SLC2a2*, nhấn mạnh sự phức tạp của mối quan hệ giữa trình tự gen và biểu hiện gen (**Bảng 3.3**)

Bảng 3.3: Vị trí các đột biến trên exon của gen *SLC2a2*

TT	Tham chiếu	Alen 1	Alen 2	Acid amin 1	Acid amin 2	Vị trí cDNA	Vị trí acid amin	Exon	Thay đổi
BN 1	T	T	C	Ser	Ser	609	203	5	c.609T>C p.Ser203Ser
BN 2	T	T	G	Met	Arg	1127	376	9	c.1127T>G p.Met376Arg

Khi xem lại các chỉ số sinh số sinh hoá và lâm sàng của hai bệnh nhân này, chúng tôi không thấy có điều gì đặc biệt. Mặc dù vậy, các đột biến trên gen *SLC2a2* có thể dẫn đến sự thay thế axit amin trong quá trình dịch mã protein, ví dụ như đột biến c.1127T>G (p.Met376Arg) ở exon 9 [84], do codon bắt đầu AUG mã hóa methionine có cấu trúc hóa học khác nhau, do vậy, sự thay đổi này có thể gây ra thay đổi trong quá trình cuộn gấp bậc 3 và 4 của protein dẫn đến thay đổi về chức năng. Điều này đã được xác định trong nghiên cứu trước đó trên bệnh nhân mắc tiểu đường. Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng các đột biến bất hoạt gen lặn đồng hợp tử ở con người có thể dẫn đến bệnh tiểu đường ít phổ biến và ít nghiêm trọng hơn so với việc bất hoạt *SLC2a2*. Các kết quả này cung cấp thông tin quan trọng về vai trò của gen *SLC2a2* trong quá trình tiết insulin và kiểm soát đường huyết [78].

Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra, biến thể đơn nucleotide (SNPs) trong gen *SLC2a2* cũng đã được xác định và liên kết với sự chuyển đổi sang bệnh TĐT2 ở những đối tượng béo phì bị rối loạn dung nạp glucose (IGT). Ví dụ, đột biến gen rs5393 (kiểu gen AA) đã được xác định làm tăng nguy cơ mắc bệnh tiểu đường loại 2 lên gấp ba lần và đột biến gen rs11920090 ở trạng thái mất cân bằng luôn liên kết với SNP rs5400 trên gen *SLC2a2*, mã hoá cho sự thay thế axit amin T110I [79]. Sự thay thế này đã được xác định là có thể có hại, ảnh hưởng đến việc vận chuyển, cảm nhận glucose và bài tiết insulin. Tuy

nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp nào có chứa đột biến tại vị trí kể trên.

Việc phát hiện 2 đột biến trên 2 bệnh nhân, trong đó có 1 đột biến làm thay đổi trình tự acid amin. Mặc dù không ghi nhận sự khác biệt về chỉ số sinh hoá và lâm sàng của 2 bệnh nhân này, nhưng điều này cũng cho chúng ta thấy sự phức tạp trong mối quan hệ giữa trình tự gen và biểu hiện gen. Nghiên cứu này là một bước quan trọng trong việc nghiên cứu gen liên quan đến bệnh tiểu đường, và chúng tôi hy vọng rằng thông tin này sẽ đóng góp vào việc phát triển các phương pháp điều trị theo hướng mới tại Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong khuôn khổ nội dung nghiên cứu của luận văn, chúng tôi đã thu được các kết quả nổi bật như sau:

- Đã thu thập được 120 mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân mắc TĐT2 phù hợp cho nghiên cứu và 40 mẫu thuộc nhóm đối chứng khoẻ mạnh và các thông số lâm sàng, sinh hoá máu của các nhóm đối tượng nghiên cứu.
- Đã xác định được mức độ biểu hiện gen của gen *SLC2a2* trên các nhóm đối tượng nghiên cứu. Trong đó nhóm mắc bệnh tiểu đường tuýp 2 có mức độ biểu hiện gen cao gấp khoảng 1,3 lần so với nhóm chứng khoẻ mạnh. Việc sử dụng thuốc làm giảm mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* khoảng 25%.
- Đã xác định mối tương quan giữa gen *SLC2a2* với các thông số sinh hoá máu và đặc điểm lâm sàng ở 2 nhóm bệnh nhân được điều trị bằng Metformin và Gliclazide. Trong đó mức độ biểu hiện gen *SLC2a2* có tương quan thuận có ý nghĩa thống kê với các chỉ số như: HbA1c, ALT, AST, FPG. Còn các chỉ khác như BMI, WHR, TC, TG, HDL-C, LDL-C mặc dù có xác định tương quan thuận hoặc nghịch nhưng mức độ tương quan yếu và không có ý nghĩa thống kê.
- Phát hiện 2 đột biến trên exon 5 và exon 9 của gen *SLC2a2* thuộc hai bệnh nhân nằm trong nhóm được điều trị với Metformin, trong đó đột biến trên exon 9 làm thay đổi trình tự acid amin, cụ thể thay đổi từ Met sang Arg. Tuy nhiên, khi so sánh chỉ số sinh hoá và lâm sàng của hai bệnh nhân này với các bệnh nhân khác thì không phát hiện gì đặc biệt.

KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu cần được thực hiện trên cỡ mẫu lớn hơn để có thể xác định mối liên hệ giữa đột biến gen *SLC2a2* và bệnh TĐT2, đồng thời hiểu rõ hơn về tác dụng của hai thuốc điều trị Metformin và Gliclazide.
- Nghiên cứu mở rộng thêm các gen khác liên quan đến bệnh TĐT2 và các ảnh hưởng đến di truyền từ các loại thuốc điều trị hiện nay.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC

1. D.M. Nguyen, M.T. Nguyen, T.T.Bich Vo, M.N. Nghiem, **S.T. Dao**, 2023, Effects of the drugs gliclazide and metformin on solute carrier family 2 member 2 (SLC2A2) gen expression in type 2 diabetic patients in Vietnam. *Genet. Mol. Res.* 22(1): GMR19054. <https://doi.org/10.4238/gmr19054>.
2. Duc, N. M., Nghiem, M. N., Vo, T. T. B., Nguyen, M. T., & **Dao, S. T**, 2023, A cross-sectional study on the Nesfatin-1 serum levels of Vietnamese patients with pre-diabetes. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 69, e20221388.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Organización Mundial de la Salud, “<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>,” Organización Mundial de la Salud.
- [2] K. G. M. M. Alberti and P. Z. Zimmet, 1997, “Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation ORIGINAL ARTICLES,”
- [3] “2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021,” *Diabetes Care*, vol. 44, 2021, doi: 10.2337/dc21-S002.
- [4] I. D. Federation, “IDF Diabetes Atlas Tenth edition 2021,” International Diabetes Federation.
- [5] R. J. Mahler and M. L. Adler, 1999, “Type 2 Diabetes Mellitus: Update on Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no. 4, pp. 1165–1171, doi: 10.1210/jcem.84.4.5612.
- [6] C. Herder and M. Roden, 2011, “Genetics of type 2 diabetes: Pathophysiologic and clinical relevance,” *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 41, no. 6, pp. 679–692, doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02454.x.
- [7] D. Care, “Care in diabetes—2022,” *Diabetes Care*, vol. 45, p. S17, 2022.
- [8] P. Zimmet, K. Alberti, and J. Shaw, 2001, “Global and societal implications of the diabetes epidemic,” *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 782–787.
- [9] J. E. Shaw, R. A. Sicree, and P. Z. Zimmet, 2010, “Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 87, no. 1, pp. 4–14.
- [10] J. C. N. Chan *et al.*, 2009, “Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology,” *JAMA*, vol. 301, no. 20, pp. 2129–2140.
- [11] S. De Rosa, B. Arcidiacono, E. Chiefari, A. Brunetti, C. Indolfi, and D. P. Foti, 2018, “Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease: genetic and epigenetic links,” *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, p. 2.
- [12] Y. Xu, W. Pan, and H. Liu, 2010, “Self-management practices of Chinese Americans with type 2 diabetes,” *Nurs Health Sci*, vol. 12, no. 2, pp. 228–234.

- [13] S. O’Rahilly, I. Barroso, and N. J. Wareham, 2005, “Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning?,” *Science (1979)*, vol. 307, no. 5708, pp. 370–373.
- [14] J. S. Kooner *et al.*, 2011, “Genome-wide association study in people of South Asian ancestry identifies six novel susceptibility loci for type 2 diabetes,” *Nat Genet*, vol. 43, no. 10, p. 984.
- [15] C. S. Yajnik *et al.*, 2009, “FTO gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians,” *Diabetologia*, vol. 52, pp. 247–252.
- [16] Bộ y tế, 2016, “National Survey on the Risk Factors of Non-Communicable Diseases (STEPS) Viet Nam 2015,”.
- [17] Vũ Thị Thanh Huyền and H. M. H. B. C. Đ. C. T. H. Nguyễn Ngọc Tâm, 2015, “Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh đái tháo đường tại thành phố Hà Nội năm 2014,” *Tạp chí Y học Việt Nam*, vol. 1, pp. 68–73.
- [18] Hồ Phạm Thục Lan, 2017, “Dịch tễ học đái tháo đường và tiền đái tháo đường tại Việt Nam: Phân loại dựa vào HbA1C,” *Hội đái tháo đường và nội tiết thành phố Hồ Chí Minh*.
- [19] Tạ Văn Bình và cộng sự, 2003, “Dịch tễ học bệnh đái tháo đường, các yếu tố nguy cơ và các vấn đề liên quan đến quản lý bệnh đái tháo đường, các yếu tố nguy cơ và các vấn đề liên quan đến quản lý bệnh đái tháo đường tại khu vực nội thành 4 thành phố lớn.,” *Nhà xuất bản Y học*.
- [20] Nguyễn Vinh Quang, 2007, “Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh đái tháo đường týp 2 và hiệu quả biện pháp can thiệp cộng đồng tại Nam Định, Thái Bình (2002 - 2004),” *Luận án tiến sỹ. Học viện Quân Y*.
- [21] H.-G. Joost *et al.*, 2002, “Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators,” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 282, no. 4, pp. E974–E976.
- [22] B. Sun, · Hui Chen, J. Xue, P. Li, and · Xu Fu, 2023, “The role of GLUT2 in glucose metabolism in multiple organs and tissues,” *Mol Biol Rep*, vol. 50, pp. 6963–6974, doi: 10.1007/s11033-023-08535-w.

- [23] V. Yildirim and R. Bertram, 2017, “Calcium oscillation frequency-sensitive gene regulation and homeostatic compensation in pancreatic β -Cells,” *Bull Math Biol*, vol. 79, no. 6, pp. 1295–1324.
- [24] R. Santer *et al.*, 2002, “The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome,” *Hum Genet*, vol. 110, pp. 21–29.
- [25] K. Zhou *et al.*, 2016, “Variation in the glucose transporter gene SLC2A2 is associated with glycemic response to metformin,” *Nat Genet*, vol. 48, no. 9, pp. 1055–1059.
- [26] W. Ye *et al.*, 2022, “Clinical Study on the Relationship between the SNP rs8192675 (C/C) Site of SLC2A2 Gene and the Hypoglycemic Effect of Metformin in Type 2 Diabetes,” *J Healthc Eng*, vol. 2022.
- [27] B. Thorens, 2015, “GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis,” *Diabetologia*, vol. 58, no. 2, pp. 221–232.
- [28] J. Dupuis *et al.*, 2010, “New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk,” *Nat Genet*, vol. 42, no. 2, pp. 105–116.
- [29] Y. Ono and K. Kataoka, 2021, “MafA, NeuroD1, and HNF1 β synergistically activate the Slc2a2 (Glut2) gene in β -cells,” *J Mol Endocrinol*, vol. 67, no. 3, pp. 71–82.
- [30] J. C. Florez, 2017, “The pharmacogenetics of metformin,” *Diabetologia*, vol. 60, no. 9, pp. 1648–1655.
- [31] C. J. Bailey, 2017, “Metformin: historical overview,” *Diabetologia*, vol. 60, no. 9, pp. 1566–1576.
- [32] V. R. Aroda *et al.*, 2017, “Metformin for diabetes prevention: insights gained from the diabetes prevention program/diabetes prevention program outcomes study,” *Diabetologia*, vol. 60, no. 9, pp. 1601–1611.
- [33] W. H. Herman, 2015, “The cost-effectiveness of diabetes prevention: results from the Diabetes Prevention Program and the Diabetes Prevention Program

- Outcomes Study,” *Clin Diabetes Endocrinol*, vol. 1, no. 1, pp. 1–10.
- [34] E. A. Walker *et al.*, 2020, “Long-term metformin adherence in the diabetes prevention program outcomes study,” *BMJ Open Diabetes Res Care*, vol. 8, no. 1, p. e001537.
- [35] D. P. P. R. Group, 2012, “Long-term safety, tolerability, and weight loss associated with metformin in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study,” *Diabetes Care*, vol. 35, no. 4, pp. 731–737.
- [36] G. Rena, D. G. Hardie, and E. R. Pearson, 2017, “The mechanisms of action of metformin,” *Diabetologia*, vol. 60, no. 9, pp. 1577–1585.
- [37] A. Klip and L. A. Leiter, 1990, “Cellular mechanism of action of metformin,” *Diabetes Care*, vol. 13, no. 6, pp. 696–704.
- [38] R. A. Jackson *et al.*, 1987, “Mechanism of metformin action in non-insulin-dependent diabetes,” *Diabetes*, vol. 36, no. 5, pp. 632–640.
- [39] S. Wangnoo *et al.*, 2021, “Role of Gliclazide in safely navigating type 2 diabetes mellitus patients towards euglycemia: Expert opinion from India,” *Endocrine and Metabolic Science*, vol. 4, p. 100102.
- [40] C. L. Lawrence *et al.*, 2001, “Gliclazide produces high-affinity block of KATP channels in mouse isolated pancreatic beta cells but not rat heart or arterial smooth muscle cells,” *Diabetologia*, vol. 44, pp. 1019–1025.
- [41] J.-L. Viovy, 2000, “Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms,” *Rev Mod Phys*, vol. 72, no. 3, p. 813.
- [42] L. M. Baudhuin, S. A. Lagerstedt, E. W. Klee, N. Fadra, D. Oglesbee, and M. J. Ferber, 2015, “Confirming variants in next-generation sequencing panel testing by Sanger sequencing,” *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 17, no. 4, pp. 456–461.
- [43] E. Varkonyi-Gasic, R. Wu, M. Wood, E. F. Walton, and R. P. Hellens, 2007, “Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs,” *Plant Methods*, vol. 3, no. 1, pp. 1–12.
- [44] S. E. Greiman and V. V Tkach, 2016, “The numbers game: quantitative analysis

- of *Neorickettsia* sp. propagation through complex life cycle of its digenean host using realtime qPCR,” *Parasitol Res*, vol. 115, pp. 2779–2788.
- [45] R. C. Team, M. R. C. Team, M. Suggests, and S. Matrix, 2018, “Package stats,” *The R Stats Package*.
- [46] H.-Y. Kim, 2014, “Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups,” *Restor Dent Endod*, vol. 39, no. 1, pp. 74–77.
- [47] J. A. L. Minton, S. E. Flanagan, and S. Ellard, 2011, “Mutation surveyor: software for DNA sequence analysis,” *PCR Mutation Detection Protocols*, pp. 143–153.
- [48] R. Zwanzig, 1960, “Ensemble method in the theory of irreversibility,” *J Chem Phys*, vol. 33, no. 5, pp. 1338–1341.
- [49] D. M. Nathan, P. McGee, M. W. Steffes, J. M. Lachin, and D. research group, 2014, “Relationship of glycated albumin to blood glucose and HbA1c values and to retinopathy, nephropathy, and cardiovascular outcomes in the DCCT/EDIC study,” *Diabetes*, vol. 63, no. 1, pp. 282–290.
- [50] R. A. DeFronzo, A. M. Goodman, and M. M. S. Group, 1995, “Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus,” *New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 9, pp. 541–549.
- [51] L. S. Hermann, B. Scherstén, P.-O. Bitzen, T. Kjellström, F. Lindgärde, and A. Melander, 1994, “Therapeutic comparison of metformin and sulfonylurea, alone and in various combinations: a double-blind controlled study,” *Diabetes Care*, vol. 17, no. 10, pp. 1100–1109.
- [52] J. E. Foley and S. Sreenan, 2009, “Efficacy and safety comparison between the DPP-4 inhibitor vildagliptin and the sulfonylurea gliclazide after two years of monotherapy in drug-naive patients with type 2 diabetes,” *Hormone and Metabolic Research*, vol. 41, no. 12, pp. 905–909.
- [53] C. Filozof and J. Gautier, 2010, “A comparison of efficacy and safety of vildagliptin and gliclazide in combination with metformin in patients with Type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone: a 52-week,

- randomized study,” *Diabetic Medicine*, vol. 27, no. 3, pp. 318–326.
- [54] K. Landin, L. Tengborn, and U. Smith, 1991, “Treating insulin resistance in hypertension with metformin reduces both blood pressure and metabolic risk factors,” *J Intern Med*, vol. 229, no. 2, pp. 181–187.
- [55] A. M. Jennings, R. M. Wilson, and J. D. Ward, 1989, “Symptomatic hypoglycemia in NIDDM patients treated with oral hypoglycemic agents,” *Diabetes Care*, vol. 12, no. 3, pp. 203–208.
- [56] T. Van Staa, L. Abenhaim, and J. Monette, 1997, “Rates of hypoglycemia in users of sulfonylureas,” *J Clin Epidemiol*, vol. 50, no. 6, pp. 735–741.
- [57] R. Mathur, S. Dutta, T. Velpandian, and S. R. Mathur, 2015, “*Psidium guajava* Linn. leaf extract affects hepatic glucose transporter-2 to attenuate early onset of insulin resistance consequent to high fructose intake: An experimental study,” *Pharmacognosy Res*, vol. 7, no. 2, p. 166.
- [58] Y. Liu *et al.*, 2015, “Jinlida reduces insulin resistance and ameliorates liver oxidative stress in high-fat fed rats,” *J Ethnopharmacol*, vol. 162, pp. 244–252.
- [59] X. X. Wang *et al.*, 2017, “SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 13, pp. 5335–5348.
- [60] Y. Mullugeta, R. Chawla, T. Kebede, and Y. Worku, 2012, “Dyslipidemia associated with poor glycemic control in type 2 diabetes mellitus and the protective effect of metformin supplementation,” *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 27, pp. 363–369.
- [61] A. Ozder, 2014, “Lipid profile abnormalities seen in T2DM patients in primary healthcare in Turkey: a cross-sectional study,” *Lipids Health Dis*, vol. 13, pp. 1–6.
- [62] A. K. Gupta *et al.*, 2008, “Determinants of new-onset diabetes among 19,257 hypertensive patients randomized in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial–Blood Pressure Lowering Arm and the relative influence of

- antihypertensive medication,” *Diabetes Care*, vol. 31, no. 5, pp. 982–988.
- [63] Q. Qi, L. Liang, A. Doria, F. B. Hu, and L. Qi, 2012, “Genetic predisposition to dyslipidemia and type 2 diabetes risk in two prospective cohorts,” *Diabetes*, vol. 61, no. 3, pp. 745–752.
- [64] C. Andersson, A. Lyass, M. G. Larson, S. J. Robins, and R. S. Vasan, 2015, “Low-density-lipoprotein cholesterol concentrations and risk of incident diabetes: epidemiological and genetic insights from the Framingham Heart Study,” *Diabetologia*, vol. 58, pp. 2774–2780.
- [65] N. Sattar *et al.*, 2010, “Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials,” *The Lancet*, vol. 375, no. 9716, pp. 735–742.
- [66] K. Zhou *et al.*, 2016, “Variation in the glucose transporter gene SLC2A2 is associated with glycemic response to metformin,” *Nat Genet*, vol. 48, no. 9, pp. 1055–1059.
- [67] S. Lenzen, S. Lortz, and M. Tiedge, 1996, “Effects of metformin on SGLT1, GLUT2, and GLUT5 hexose transporter gene expression in small intestine from rats,” *Biochem Pharmacol*, vol. 51, no. 7, pp. 893–896.
- [68] R. A. DeFronzo, A. M. Goodman, and M. M. S. Group, 1995, “Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus,” *New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 9, pp. 541–549.
- [69] A. D. B. Harrower, 1985, “Comparison of diabetic control in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients treated with different sulphonylureas,” *Curr Med Res Opin*, vol. 9, no. 10, pp. 676–680.
- [70] G. Perriello, S. Pampanelli, C. Di Pietro, P. Brunetti, and I. P. S. Group, 2006, “Comparison of glycaemic control over 1 year with pioglitazone or gliclazide in patients with Type 2 diabetes,” *Diabetic medicine*, vol. 23, no. 3, pp. 246–252.
- [71] J. E. Foley and S. Sreenan, 2009, “Efficacy and safety comparison between the DPP-4 inhibitor vildagliptin and the sulfonylurea gliclazide after two years of

- monotherapy in drug-naive patients with type 2 diabetes,” *Hormone and Metabolic Research*, vol. 41, no. 12, pp. 905–909.
- [72] G. Jerums *et al.*, 1987, “Lack of effect of gliclazide on early diabetic nephropathy and retinopathy: a two-year controlled study,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 3, no. 2, pp. 71–80.
- [73] A. M. Jennings, R. M. Wilson, and J. D. Ward, 1989, “Symptomatic hypoglycemia in NIDDM patients treated with oral hypoglycemic agents,” *Diabetes Care*, vol. 12, no. 3, pp. 203–208.
- [74] T. Van Staa, L. Abenhaim, and J. Monette, “Rates of hypoglycemia in users of sulfonylureas,” *J Clin Epidemiol*, vol. 50, no. 6, pp. 735–741, 1997.
- [75] K. Inukai *et al.*, 2005, “Efficacy of glimepiride in Japanese type 2 diabetic subjects,” *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 68, no. 3, pp. 250–257.
- [76] G. Cathelineau, M. de Champvallins, A. Bouallouche, and B. Lesobre, 1997, “Management of newly diagnosed non-insulin-dependent diabetes mellitus in the primary care setting: effects of 2 years of gliclazide treatment—the Diadem Study,” *Metabolism*, vol. 46, pp. 31–34.
- [77] C. Erem, H. M. Ozbas, I. Nuhoglu, O. Deger, N. Civan, and H. O. Ersoz, 2014, “Comparison of effects of gliclazide, metformin and pioglitazone monotherapies on glycemic control and cardiovascular risk factors in patients with newly diagnosed uncontrolled type 2 diabetes mellitus,” *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, pp. 295–302.
- [78] M.-T. Guillam *et al.*, 1997, “Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2,” *Nat Genet*, vol. 17, no. 3, pp. 327–330.
- [79] O. Laukkanen *et al.*, 2005, “Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study,” *Diabetes*, vol. 54, no. 7, pp. 2256–2260.