



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0030298

(51)<sup>7</sup> G01N 33/569; A23L 1/30; A61K 35/74 (13) B

(21) 1-2014-00217

(22) 20/07/2012

(86) PCT/EP2012/064351 20/07/2012

(87) WO/2013/011137 A8 24/01/2013

(30) 61/572,742 21/07/2011 US; 13/552,686 19/07/2012 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/05/2014 314A

(73) BIOGAIA AB (SE)

Kungsbrogatan 3A, P.O Box 3242, S-103 64 Stockholm, Sweden

(72) VERSALOVIC, James (US); CONNOLLY, Eamonn (SE); THOMAS, Carissa Michelle (US).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC CHỦNG LỢI KHUẨN SINH AXIT LACTIC ĐỂ SỬ DỤNG TRONG VIỆC SẢN SINH CỤC BỘ HISTAMIN Ở ĐỘNG VẬT CÓ VÚ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc lợi khuẩn sinh axit lactic đặc hiệu sản sinh histamin. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm bước sàng lọc vi khuẩn có operon histidin hoạt động và chọn lọc chủng có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin. Tốt hơn, chủng vi khuẩn này được chọn lọc dựa vào khả năng sản sinh histamin ở nồng độ cao hơn 250pg/mL. Sáng chế còn đề cập đến các sản phẩm chứa chủng vi khuẩn thu được bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc lợi khuẩn sinh axit lactic đặc hiệu sản sinh histamin, sản phẩm và chế phẩm chứa tế bào của chủng vi khuẩn sinh axit lactic thu được bằng phương pháp này.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Theo định nghĩa của tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc, lợi khuẩn là những vi sinh vật còn sống khi được đưa vào cơ thể ở một lượng đủ sẽ có lợi cho sức khỏe của vật chủ. Ngày nay, một số loại vi khuẩn khác nhau được sử dụng làm lợi khuẩn, ví dụ vi khuẩn sản sinh ra axit lactic như các chủng *Lactobacillus* và *Bifidobacteria*.

Vi khuẩn sản sinh axit lactic không chỉ được sử dụng bởi lợi ích chúng đem lại cho sức khỏe của người và động vật, mà chúng còn được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm cho quá trình lên men. Hiệu quả của lợi khuẩn là có tính đặc hiệu chủng, mỗi chủng có thể đóng góp cho sức khỏe của vật chủ theo những cơ chế khác nhau. Lợi khuẩn có thể phòng ngừa hoặc ức chế sự tăng sinh của tác nhân gây bệnh, ức chế sự sản sinh độc tố từ mầm bệnh hoặc điều biến đáp ứng miễn dịch trong đường tiêu viêm và kháng viêm. Sử dụng các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic *Lactobacillus reuteri* khác nhau là liệu pháp đầy hứa hẹn để cải thiện chứng đau bụng ở trẻ nhỏ, thuyên giảm triệu chứng bệnh chàm, giảm tình trạng bệnh lý tại nơi làm việc, hạn chế lây nhiễm *Helicobacter pylori*. *L. reuteri* được coi là sinh vật ký sinh trong hệ tiêu hóa của người, hiện diện trong một số bộ phận như trong niêm mạc của thân vị dạ dày, hang vị dạ dày, tá tràng và hồi tràng. Xem ví dụ trong các patent Mỹ số 5,439,678, 5,458,875, 5,534,253, 5,837,238 và 5,849,289.

Khi tế bào *L. reuteri* sinh trưởng trong điều kiện yếm khí cùng với sự có mặt của glyxerol, chúng sẽ sản sinh ra một chất kháng khuẩn được gọi là reuterin ( $\beta$ -hydroxy propionaldehyt).

Mối quan hệ giữa vật chủ và hệ vi khuẩn ký sinh trong nó là rất phức tạp, và đối với một số loại vi khuẩn, mối quan hệ vật chủ - vi khuẩn ký sinh này đã phát triển đồng

tiến hóa trong nhiều năm. Điều này dường như là hoàn toàn chính xác đối với *Lactobacillus reuteri*. Hiểu biết của chúng ta về mối quan hệ hỗ sinh giữa hệ vi khuẩn đường ruột và vật chủ người vẫn còn đang ở trong giai đoạn trứng nước; tuy nhiên các tác giả sáng chế nhận thức rất rõ được rằng hệ khuẩn đường ruột đóng vai trò thiết yếu trong đường ruột, và trong sự phát triển của hệ thống miễn dịch, dinh dưỡng và các mối liên kết mới đang được hình thành giữa hệ khuẩn đường ruột và não bộ. Rối loạn hệ khuẩn đường ruột (dysbiosis), là sự mất cân bằng hệ khuẩn đường ruột bình thường, dẫn đến một loạt các quá trình bệnh lý như bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease-IBD), hội chứng ruột kích thích (irritable bowel syndrome-IBS), và các quá trình bệnh lý ở các bộ phận khác cách xa ruột như hội chứng rối loạn chuyển hóa. Liệu pháp điều trị tiềm năng đó là can thiệp vào hệ khuẩn đường ruột, và nghiên cứu đang nỗ lực hướng tới mục đích trong tương lai là có thể thay đổi tập đoàn vi sinh vật nhằm phòng ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý khác nhau.

Do đó, cần phải hiểu được mối tương tác đặc hiệu giữa vi khuẩn và người trong môi liên hệ với một bệnh lý cụ thể hoặc các trường hợp khác có ảnh hưởng đến sức khỏe của vật chủ, để có thể chọn lọc và sử dụng được chủng lợi khuẩn thích hợp nhất nhằm chống lại sự phát triển các bệnh lý này.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất phương pháp đặc hiệu để sản sinh histamin cục bộ ở động vật có vú, cụ thể là người, sự sản sinh cục bộ histamin bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở sự sản sinh trong đường tiêu hóa, đường niệu-sinh dục, khoang miệng, trong phổi và đường hô hấp, trên da, v.v. của cơ thể động vật có vú bằng cách chọn lọc một số chủng vi khuẩn sinh axit lactic. Vi khuẩn này có thể được đưa vào cùng với một số axit amin và/hoặc đường, được đưa vào riêng rẽ hoặc đã có tại vị trí hoạt động.

Mục đích chính của sáng chế là chọn lọc các chủng vi khuẩn có thể sản sinh histamin cục bộ ở các vị trí khác nhau, bao gồm trong đường tiêu hóa, đường niệu-sinh dục, khoang miệng, trong phổi, đường hô hấp, trên da v.v của động vật có vú.

Mục đích khác của sáng chế đó là đề xuất các sản phẩm chứa các chủng vi khuẩn này.

Mục đích khác nữa của sáng chế đó là kết hợp việc sử dụng vi khuẩn với việc sử dụng histidin, hoặc các loại thực phẩm hoặc chế phẩm chứa histadin để đảm bảo sự sản sinh histamin cục bộ.

Do vậy, sáng chế đề xuất phương pháp mới để chọn lọc tế bào vi khuẩn sinh axit lactic hữu dụng làm lợi khuẩn và dùng trong điều trị bệnh. Phương pháp mới này bao gồm việc sàng lọc và chọn lọc các chủng vi khuẩn sinh axit lactic có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin. Điều đáng ngạc nhiên là các chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn lọc bằng phương pháp này là hữu dụng làm lợi khuẩn và trong điều trị bệnh, cụ thể là trong việc tạo ra các tác dụng chống viêm, bằng cách sản sinh ra histamin cục bộ. Các tác dụng này của vi khuẩn là đáng ngạc nhiên, như được bàn luận ở phần khác trong bản mô tả, trước đây, sự hiện diện trong thực phẩm của vi khuẩn sản sinh histamin được chủ động tránh do nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe đã được thừa nhận, ví dụ như nguy cơ bị ngộ độc. Do đó, việc đưa vào cơ thể động vật có vú vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh cục bộ histamin, hoặc thực tế là sàng lọc và chọn lọc vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh cục bộ histamin dựa trên sự có mặt của operon histidin hoạt động và khả năng sản sinh histamin về mặt trực giác là trái với bộc lộ này. Thật vậy, lợi khuẩn chưa từng được sử dụng để sản sinh histamin.

Do đó, hiểu rộng ra, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú, trong đó, phương pháp này bao gồm việc sàng lọc vi khuẩn có sự hiện diện của operon histidin hoạt động và chọn lọc chủng có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin.

Operon histidin bao gồm ba gen (các thể đối vận histidin/histamin, histidin decarboxylaza pyruvoyl typ A (*HdcA*), và histidin decarboxylaza pyruvoyl typ B (*HdcB*)). Tin rằng hoạt động của mỗi gen này là rất quan trọng đối với sáng chế. Do đó, trong phương pháp sàng lọc theo sáng chế, vi khuẩn để chọn lọc được đánh giá về sự hiện diện của cả ba gen và các chủng dương tính đối với cả ba gen được chọn. Phương pháp thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để phát hiện ra sự hiện diện của ba gen, ví dụ phương pháp di truyền như PCR có thể được sử dụng. Việc sản sinh histamin ở nồng độ cao có thể là dấu hiệu của sự hiện diện đủ cả ba gen và sự hiện diện của operon

histidin hoạt động. Do vậy, phương pháp chọn lọc theo sáng chế còn bao gồm bước chọn lọc chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh histamin. Các chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh histamin ở nồng độ cao hơn được ưu tiên. Do đó, theo các phương án ưu tiên, chủng vi khuẩn được chọn lọc dựa trên khả năng sản sinh histamin ở nồng độ cao hơn 200, tốt hơn là cao hơn 250 hoặc tốt hơn nữa là cao hơn 300pg/mL, ví dụ nồng độ cao hơn 350, 400, 450, hoặc 500pg/mL. Các trị số này thường để chỉ các trị số của histamin đo được trong dịch nổi của chủng vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp thích hợp để đo mức độ sản sinh histamin là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Phương pháp đo khối phổ, cụ thể hơn là phương pháp đo khối phổ ba tứ cực được ưu tiên sử dụng và được minh họa trong bản mô tả này. Tuy nhiên, các thử nghiệm ELISA hoặc thử nghiệm miễn dịch tương đương cũng có thể được sử dụng để đánh giá và định lượng sự sản sinh histamin. Do đó, theo một số phương án của sáng chế, phương pháp chọn lọc sẽ bao gồm bước thăm dò lượng hoặc nồng độ histamin được sản sinh bởi chủng vi khuẩn cần chọn lọc. Do việc sử dụng về sau của các chủng vi khuẩn được chọn lọc bằng các phương pháp theo sáng chế, sau khi các chủng vi khuẩn sản sinh histamin được chọn lọc hoặc phân lập, các phương án khác sẽ bao gồm thêm các bước nuôi cấy hoặc nhân giống các chủng này, hoặc có thể lưu trữ các chủng vi khuẩn này để sử dụng trong tương lai.

Các bước tiếp theo này (và thực tế là các bước chọn lọc trong phương pháp theo sáng chế) cần phải được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thích hợp hỗ trợ cho sự sản sinh histamin. Môi trường nuôi cấy được ưu tiên chứa nguồn cacbon thích hợp sẽ hỗ trợ sự sản sinh histamin bởi chủng vi khuẩn này. Theo các phương án đặc biệt ưu tiên, môi trường nuôi cấy sẽ bao gồm glucoza làm nguồn cacbon và tốt hơn là không chứa sucroza, hoặc ít nhất là chỉ chứa sucroza ở nồng độ mà không làm ảnh hưởng đáng kể tới sự sản sinh histamin của chủng vi khuẩn. Ngoài ra, histidin hoặc chất tương tự histidin có thể được tạo ra, tùy ý cùng với nguồn các axit amin khác.

Theo các phương án ưu tiên, chủng vi khuẩn này là *Lactobacillus reuteri*.

Khi chủng vi khuẩn thích hợp được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, chủng này sau đó có thể được sử dụng để sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú. Do đó, chủng vi khuẩn này cũng cần phải có khả năng sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú.

Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất sản phẩm chứa tế bào của chủng vi khuẩn sinh axit lactic thu được bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế, trong đó chủng vi khuẩn sinh axit lactic này có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin để sử dụng trong sản sinh histamin cục bộ ở động vật có vú. Như đề cập trong bản mô tả, việc sử dụng được ưu tiên là sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng viêm hoặc trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh mà sẽ được lợi từ sự sản sinh histamin cục bộ. Ví dụ như, sự sản sinh cục bộ histamin có thể có tác dụng chống viêm.

Các phương án thay thế của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh histamin để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú, trong đó, chủng vi khuẩn sinh axit lactic này có operon histidin hoạt động. Các đặc điểm được ưu tiên của chủng vi khuẩn này và việc sử dụng chúng sẽ được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc phương pháp sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm việc sử dụng sản phẩm chứa tế bào của chủng sinh axit lactic thu được bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế, hoặc sử dụng chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong đó chủng vi khuẩn sinh axit lactic này có operon hoạt động và có khả năng sản sinh histamin, cho động vật có vú với lượng có hiệu quả cho phép sự sản sinh histamin cục bộ ở động vật có vú. Các đặc điểm được ưu tiên của chủng vi khuẩn này và việc sử dụng chúng trong điều trị bệnh được mô tả trong bản mô tả.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng sản phẩm chứa tế bào của chủng vi khuẩn sinh axit lactic thu được bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế, trong đó chủng vi khuẩn sinh axit lactic này có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin, trong sản xuất chế phẩm hoặc thuốc để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú. Các phương án thay thế mô tả việc sử dụng chủng vi khuẩn sinh axit lactic, trong đó chủng vi khuẩn sinh axit lactic có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin, trong sản xuất chế phẩm hoặc thuốc để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú. Các đặc điểm được ưu tiên của chủng vi khuẩn và việc sử dụng chúng trong các liệu pháp điều trị sẽ được mô tả trong bản mô tả này.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 - Định lượng histamin trong phân đoạn HILIC-HPLC. Phương pháp đo khối phổ ba tứ cực được sử dụng để định lượng sự có mặt của histamin trong khoảng lựa chọn trong phân đoạn HILIC-HPLC. Phân đoạn ức chế TNF có lượng histamin cao nhất trong tất cả các phân đoạn được thử nghiệm.

Fig.2 - Histamin tinh khiết và histamin từ *L. reuteri* 6475 ức chế sự sản sinh TNF thông qua thụ thể  $H_2$  của histamin. Histamin tinh khiết ức chế đáng kể sự sản sinh TNF, tác động này bị phong bế bởi các chất đối kháng thụ thể  $H_2$  đặc hiệu theo phương thức phụ thuộc liều. Môi trường (hoặc dịch nổi bề mặt) điều kiện chứa các thành phần được tiết ra từ chủng vi khuẩn 6475 (bao gồm histamin), ức chế đáng kể sự sản sinh TNF, tác động này bị phong bế một phần bởi các chất đối kháng thụ thể  $H_2$  đặc hiệu.  $N=3$ , giá trị  $*p < 0,05$  so với đối chứng môi trường, giá trị  $**p < 0,05$  so với histamin,  $***p < 0,05$  so với môi trường điều kiện chủng ATCC 6475 (CM). B. Nước rửa viên tế bào chủng 6457 chứa histamin ức chế sự sản sinh TNF, tác động này bị phong bế một phần bởi các chất đối kháng thụ thể  $H_2$  đặc hiệu. Phân đoạn B3, chứa histamin tương đối tinh khiết, ức chế sự sản sinh TNF, tác động này bị phong bế hoàn toàn bởi các chất đối kháng thụ thể  $H_2$  đặc hiệu.  $N=3$ , giá trị  $*p < 0,05$  so với đối chứng môi trường,  $**p < 0,05$  so với nước rửa viên tế bào chủng ATCC 6475 (CP), giá trị  $***p < 0,05$  so với phân đoạn B3.

Fig.3 - Operon histidin là quan trọng đối với kiểu hình ức chế TNF của *L. reuteri* 6475. A. Operon histidin bao gồm ba gen, thể đối vận histidin/histamin, *hdcA* và *hdcB*. B. Đột biến trong một gen bất kỳ trong operon histidin đều làm suy giảm một phần khả năng ức chế TNF của *L. reuteri* 6457.  $N=9$ , giá trị  $*p < 0,05$  so với đối chứng môi trường, giá trị  $**p < 0,05$  so với ATCC PTA 6457.

Fig.4 - *L. reuteri* 6457 làm giảm đáng kể triệu chứng sụt cân gây ra bởi thử thách TNBS, số liệu đại diện cho dữ liệu thu được từ hai thử nghiệm độc lập,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ .

Fig.5 - *L. reuteri* 6457 làm giảm đáng kể tổn thương vĩ mô ở ruột kết gây ra bởi thử thách TNBS, số liệu đại diện cho dữ liệu thu được từ hai thử nghiệm độc lập,  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$ .

Fig.6 - *L. reuteri* 6457 làm giảm đáng kể nồng độ SAA gây ra bởi thử thách TNBS, số liệu đại diện cho dữ liệu thu được từ hai thử nghiệm độc lập, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Fig.7 - thể đột biến *hdcA* dẫn đến sự giảm khả năng làm suy yếu tình trạng viêm ruột kết, số liệu đại diện cho dữ liệu thu được từ hai thử nghiệm độc lập, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Fig.8 - thể đột biến *hdcA* dẫn đến sự giảm khả năng làm suy yếu tình trạng viêm ruột kết, số liệu đại diện cho dữ liệu thu được từ hai thử nghiệm độc lập, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một nhóm lactobacilli chọn lọc được, bao gồm một số chủng *Lactobacillus reuteri* sản sinh cục bộ histamin trong điều kiện sinh trưởng đặc hiệu, và histamin được sản sinh theo cách này sẽ làm lợi cho vật chủ nhờ, ví dụ làm giảm viêm, giảm một số bệnh ung thư v.v..

#### Histamin

Histamin là hợp chất nitơ hữu cơ có liên quan đến một vài quy trình sức khỏe ở động vật có vú bao gồm đáp ứng miễn dịch cục bộ và điều hòa chức năng sinh lý trong đường ruột và hoạt động như chất dẫn truyền thần kinh. Là một phần của đáp ứng miễn dịch đối với các mầm bệnh từ bên ngoài, histamin được sản sinh bởi tế bào mast và bạch cầu ưa kiềm. Histamin có thể thu được từ phản ứng khử carboxyl của axit amin histidin, phản ứng được xúc tác bởi enzym L-histidin decarboxylaza.

Vi khuẩn có khả năng sản sinh histamin bằng cách sử dụng các enzym histidin decarboxylaza không liên quan đến những histamin được tìm thấy trong tế bào nhân thật. Đến nay, sự sản sinh histamin bởi một số chủng vi khuẩn vẫn được xem là một mối nguy hại đến sức khỏe hơn là lợi ích có thể cho người. Ví dụ, ngộ độc do các loài cá thuộc họ cá thu, một dạng bệnh không lây nhiễm qua đường ăn uống, gây ra bởi sự sản sinh histamin do vi khuẩn trong thực phẩm hỏng, cụ thể là cá. Thực phẩm và đồ uống lên men trong tự nhiên đều chứa một lượng nhỏ histamin do sự chuyển hóa tương tự được thực hiện bởi vi khuẩn lên men hoặc nấm men. Việc đưa một lượng histamin được kiểm soát từ vi khuẩn được chọn lọc có thể đem lại nhiều tác dụng có lợi đáng

ngạc nhiên hơn các tác dụng có hại như có thể được nghĩ rằng trong các nghiên cứu nêu trên.

Thụ thể histamin là nhóm các thụ thể được kết hợp với protein G với histamin làm phối tử nội sinh của chúng. Có bốn thụ thể histamin được biết đến; thụ thể  $H_1$  ( $H_1$  receptor- $H1R$ ), thụ thể  $H_2$  ( $H_2$  receptor- $H2R$ ), thụ thể  $H_3$  ( $H_3$  receptor- $H3R$ ), và thụ thể  $H_4$  ( $H_4$  receptor- $H4R$ ).

Vannier và các đồng tác giả (Histamine Suppresses Gene Expression and Synthesis of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  via Histamine  $H_2$  Receptors; J Exp Med. 1991 July 1;174(1):281-4) đã chứng minh rằng sự tổng hợp TNF- $\alpha$  gây ra bởi LPS trong tế bào đơn nhân máu ngoại vi bị ức chế bởi histamin, họ còn đề xuất rằng histamin giải phóng từ tế bào mast có thể giới hạn mức độ viêm nhiễm và các đáp ứng miễn dịch bằng cách ức chế tổng hợp xytokin cục bộ trong tế bào mang thụ thể  $H_2$ .

Hoạt tính chống viêm của histamin trước đây đã được bộc lộ bởi Wang và các đồng tác giả (Histamine Antagonizes Tumor Necrosis Factor (TNF) Signaling by Stimulating TNF Receptor Shedding from the Cell Surface and Golgi Storage Pool; J. Biol. Chem. 278(24): 21751-21760), tài liệu này đã chỉ ra rằng histamin gây ra sự suy giảm tạm thời của TNFR1 trên bề mặt, tăng lượng TNFR1 phát tán và gây ra sự chuyển động của các phân tử TNFR1 từ thể Golgi trong tế bào nội mô của người được nuôi cấy. Tiêm histamin vào da người được cấy lên chuột bị suy giảm miễn dịch đã gây ra sự phát tán TNFR1 và làm giảm sự cảm ứng qua trung gian TNF của các phân tử kết dính nội mô.

Vannier et al. và Wang et al. đã không đề cập bất kỳ điều gì về việc sử dụng các chủng vi khuẩn sản sinh histamin làm lợi khuẩn hay phương pháp chọn lọc các chủng vi khuẩn dựa trên khả năng sản sinh histamin của chúng để đảm bảo lợi ích sức khỏe nhất định cho vật chủ, chẳng hạn như tác dụng chống viêm.

Ceplene, một dạng dược phẩm của histamin dihydroclorua, được sử dụng để phòng ngừa tái phát ở những bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (acute myeloid leukemia-AML). Ceplene được dùng kết hợp với xytokin hoạt hóa miễn dịch là interleukin-2 (IL-2) với liều thấp trong giai đoạn sau khi thuyên giảm bệnh AML, tức là khi bệnh nhân đã hoàn thành hóa trị liệu ban đầu. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng Ceplene/IL-2 có thể tiêu diệt tế bào bệnh bạch cầu qua trung gian miễn dịch.

Biện pháp điều trị tiêm dưới da với chu kỳ 3 tuần một lần được đưa ra cho bệnh nhân điều trị tại nhà trong vòng 18 tháng. Các tác dụng phụ của Ceplene bao gồm tiêu chảy cấp và đau đầu. Phương pháp này giúp cho bệnh nhân thuận lợi hơn trong việc tiếp nhận histamin được sản sinh cục bộ, khi cần, thay vì tiêm dưới da; cách thức này có thể đạt được bằng cách đưa lượng histamin có nguồn gốc từ vi khuẩn vào cơ thể bệnh nhân, bằng cách sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn lọc theo sáng chế.

Trước đây, đã biết rằng vi khuẩn gram âm tạo ra histamin ví dụ như trong cá và thịt sống để ngoài nhiệt độ thường và vi khuẩn gram dương làm hỏng các thực phẩm lên men do histamin như phó mát, xúc xích, miso, nước tương, bia và rượu. Việc xác định được các vi khuẩn sản sinh histamin trong thực phẩm là rất khó khăn.

Tương tự, *Lactobacillus reuteri* trước đây đã từng được biết là có liên quan đến sự sản sinh histamin, Casas et al. (Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals.; 2000, ISSN 0891-060X) báo cáo rằng hai chủng *L. reuteri* mà Straub et. Al. tìm được (Z Lebensm Unters Forsch(1995) 201: 79- 82) đã được chứng minh là khử carboxyl của L-histindin để tạo ra histamin và các tác giả cũng cảnh báo ngược lại việc sử dụng các chủng vi khuẩn này để lên men các loại thực phẩm và sử dụng chúng làm lợi khuẩn.

Trip et al. (*HdcB*, a novel enzyme catalyzing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase; Molecular Microbiology (2011) 79(4), 861-871) đề cập tới 3 kiểu tổ chức locut gen của phản ứng khử carboxyl của histidin ở vi khuẩn Gram dương sản sinh histamin. Nhóm lớn nhất được tìm thấy trong vi khuẩn sinh axit lactic bao gồm *L. hilgardii* 0006, *L. buchneri* B301, *L. reuteri* F275 và *T. halophilus*. *Lactobacillus hilgardii* 0006 đã được chứng minh là sản sinh histamin, trong nghiên cứu được thực hiện bởi Lucas et al. (Histamine-Producing Pathway Encoded on an Unstable Plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 2005, Vol. 71, No. 3, p. 1417-1424), các tác giả còn đề cập rằng, histamin là một chất nhiễm tạp xuất hiện trong một số sản phẩm trong quá trình sinh trưởng của các loại vi khuẩn không mong muốn. Lucas et al. đã tiến hành sàng lọc và thu thập vi khuẩn sinh axit lactic có trong rượu để xác định các gen tham gia vào con đường sản sinh histamin của vi khuẩn gram dương trong rượu.

Chủng vi khuẩn sản sinh histamin *Lactobacillus buchneri* được phân lập từ phó mát Thụy Sĩ đã được cho là có liên quan đến một đợt bùng phát ngộ độc histamin (Summer et al. Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss cheese implicated in a food poisoning outbreak; Applied and Environmental Microbiology (1985), Vol. 50, Issue 4, p. 1094-1096).

Calles-Enríquez et al. (Sequencing and Transcriptional Analysis of the Streptococcus thermophiles Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential *HdcA* Expression; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2010, Vol 76, No. 18, p. 6231-6238) đã mô tả chủng vi khuẩn sinh histamin *Streptococcus thermophiles*, chất khơi mào ưa nhiệt được sử dụng để sản xuất sữa chua và một số loại phó mát. Các tác giả này còn chỉ ra rằng sự hiện diện của các chủng vi khuẩn có khả năng khử nhóm carboxyl của histidin có thể dẫn đến việc sản phẩm chứa histamin được tạo ra trong quá trình sản xuất hoặc bảo quản trước khi tiêu thụ và điều này làm nền tảng cho tầm quan trọng của việc chỉ sử dụng các chủng Gram âm sinh histamin trong sản xuất các sản phẩm lên men từ sữa.

Ngay cả khi đã biết rằng một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có thể sản sinh histamin, nhưng chưa biết chắc chắn rằng khả năng sản sinh histamin là một yếu tố quan trọng trong việc đảm bảo lợi ích sức khỏe nhất định cho vật chủ, ví dụ như đặc tính kháng viêm của một số chủng *Lactobacillus*.

Điều này có thể được sử dụng để sàng lọc và chọn lọc một số chủng lợi khuẩn *Lactobacillus* là chưa được biết hoặc không là hiển nhiên từ những bọc lộc trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

#### Tế bào mast

Tế bào mast (còn gọi là mastocyte và labrocyte) là tế bào nằm trong một số loại mô và chứa nhiều hạt nhỏ giàu histamin và heparin. Mặc dù, vai trò được biết đến nhiều nhất của tế bào này là trong dị ứng và sốc phản vệ, tế bào mast cũng đóng vai trò bảo vệ rất quan trọng, ví dụ như trong việc chữa lành vết thương, chống lại các tác nhân gây bệnh.

Tế bào mast hiện diện trong hầu hết các mô đặc trưng xung quanh các mạch máu và dây thần kinh, và đặc biệt tập chung ở gần ranh giới giữa thế giới bên ngoài và môi

trường bên trong, ví dụ như da, niêm mạc phổi và đường tiêu hóa, trong miệng, kết mạc và trong mũi.

Trong các phản ứng dị ứng, tế bào mast giữ trạng thái không hoạt động cho đến khi chất gây dị ứng liên kết với IgE đã gắn với tế bào. Các sự kiện hoạt hóa màng tế bào khác có thể khơi mào tế bào mast cho quá trình mất hạt tiếp theo hoặc có thể hoạt động hiệp đồng với quá trình truyền tín hiệu FcεRI. Histamin từ hạt này làm giãn nở tĩnh mạch nhỏ sau mao mạch, hoạt hóa nội mô, và làm tăng độ thấm thấu của mạch máu. Sự giải phóng histamin dẫn đến phù nề cục bộ (sưng), nóng, nổi đỏ, và sự thu hút các tế bào viêm khác tới vị trí giải phóng histamin. Nó cũng kích thích các đầu dây thần kinh (gây ra hiện tượng ngứa hoặc đau). Dấu hiệu trên da của sự giải phóng histamin là sự xuất hiện của các nốt đỏ, nốt phỏng. Các vết sưng và đỏ xuất hiện ngay sau khi bị muỗi đốt là một ví dụ điển hình cho phản ứng này, phản ứng này xảy ra vài giây sau khi tế bào mast bị kích thích bởi chất gây dị ứng. Các hoạt động sinh lý khác của tế bào mast ít được hiểu rõ hơn. Một vài bằng chứng cho thấy rằng tế bào mast có thể có một vai trò khá cơ bản trong miễn dịch bẩm sinh, chúng có khả năng tạo ra một loạt các cytokin quan trọng và các chất trung gian gây viêm như TNFα, chúng biểu hiện nhiều “thụ thể nhận dạng mẫu” được cho là có tham gia trong việc nhận diện các nhóm mầm bệnh rộng, và chuột không có tế bào mast dường như dễ bị mắc các loại bệnh nhiễm trùng hơn.

Xem xét độc tính của histamin từ vi khuẩn trong thực phẩm và thực tế là người ta khuyến cáo không nên sử dụng các chủng vi khuẩn sản sinh histamin trong các sản phẩm lên men (xem các ví dụ cụ thể hơn trong Calles-Enríquez et al. Sequencing and Transcriptional Analysis of the *Streptococcus thermophiles* Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential *HdcA* Expression; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2010, Vol. 76, No. 18, p. 6231-6238). Việc sử dụng một số chủng vi khuẩn *Lactobacillus* để sản sinh histamin cục bộ trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các loại bệnh khác nhau không thể được xem là hiển nhiên.

Mối quan hệ giữa vật chủ và hệ vi khuẩn ký sinh trong nó là rất phức tạp, và mối quan hệ này cũng phức tạp đối với một số loại tế bào chủ của động vật có vú, như tế bào mast. Mối quan hệ vật chủ - vi khuẩn này đã phát triển đồng tiến hóa trong nhiều năm, mối quan hệ đồng tiến hóa này bao gồm sự sản sinh các chất chuyển hóa khác

nhau của hệ vi khuẩn mà có thể có lợi cho vật chủ về các mặt dinh dưỡng, miễn dịch, v.v., và hoạt động như toàn bộ hoặc một phần các chất đối kháng, chủ vận, khử miễn cảm, v.v. các thụ thể đặc hiệu hoặc trong các quá trình khác. Do đó, cần phải hiểu được mối tương tác đặc hiệu này giữa hệ vi khuẩn và người trong mối liên quan với một bệnh lý cụ thể hoặc các trường hợp khác ảnh hưởng đến sức khỏe của vật chủ, để có thể chọn lọc và sử dụng được chủng lợi khuẩn thích hợp nhất nhằm chống lại sự phát triển bệnh này.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một nhóm lactobacilli được chọn lọc, bao gồm một số chủng *Lactobacillus reuteri* sản sinh histamin cục bộ trong điều kiện sinh trưởng cụ thể. Và trái ngược với dự đoán trước đây, histamin được sản sinh cục bộ theo cách này sẽ làm lợi cho vật chủ theo nhiều cách khác nhau, bao gồm giảm viêm, giảm một số bệnh ung thư v.v..

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các sản phẩm chứa các chủng vi khuẩn này cùng với nguồn cacbon đặc hiệu, để có được sản phẩm synbiotic.

Các mục đích và ưu điểm khác sẽ được bộc lộ đầy đủ hơn trong phần mô tả sau đây và yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Việc đưa các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, được chọn lọc bằng phương pháp theo sáng chế vào cơ thể động vật có vú sẽ dẫn đến sự sản sinh cục bộ histamin và có thể đem lại lợi ích vì nhiều lý do.

Mục đích chính của sáng chế là đề xuất phương pháp chọn lọc các chủng vi khuẩn sinh axit lactic đảm bảo tác dụng chống viêm tốt. Tốt hơn, các chủng vi khuẩn này có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa tình trạng viêm, do operon histidin và sự sản sinh histamin là cần thiết cho khả năng chống viêm của chủng vi khuẩn sinh axit lactic nhất định. Tốt hơn, các chủng vi khuẩn này có thể được sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa các quá trình viêm nhiễm trong đường tiêu hóa, đường niệu-sinh dục, khoang miệng, trong phổi và đường hô hấp, trên da v.v., trong cơ thể động vật có vú, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở viêm ruột kết, viêm ruột, hội chứng ruột kích thích, viêm túi thừa, viêm niệu, viêm âm đạo v.v.. Đã biết trước đó rằng histamin thông qua thụ thể  $H_2$  có thể làm giảm sự biểu hiện gen của TNF-alpha. Ngoài ra, tế bào mast còn có khả năng tạo ra một loạt các cytokin quan trọng và các chất trung gian gây viêm khác như TNF-alpha. Tuy nhiên, trước đây chưa có phát hiện

rằng operon histidin và sự sản sinh histamin cục bộ của một số chủng vi khuẩn được chọn lọc có thể đem lại nhiều tác dụng có lợi cho vật chủ, ví dụ, chúng là nhân tố quan trọng đóng góp vào khả năng chống viêm của chủng vi khuẩn *L. reuteri* được chọn lọc. Trước đây, cũng chưa phát hiện ra rằng việc sử dụng chủng *L. reuteri* được chọn lọc bằng phương pháp theo sáng chế trong điều trị yêu cầu cần phải có histamin.

Sản phẩm và chủng được ưu tiên dùng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa tình trạng viêm là *Lactobacillus reuteri*, cụ thể là *Lactobacillus reuteri* 6475 (ATCC PTA 6475). Theo các phương án khác của sáng chế, chủng vi khuẩn được sử dụng không phải là *Lactobacillus reuteri* 6475 (ATCC PTA 6475).

Việc sử dụng các chủng vi khuẩn, sản phẩm và chế phẩm theo sáng chế vào mục đích trị liệu như được xác định trong bản mô tả thường dẫn đến sự giảm nhẹ hoặc thuyên giảm bệnh tương ứng hoặc các triệu chứng của bệnh, ví dụ có thể dẫn đến sự giảm đáng kể mức độ viêm ở động vật có vú. Ví dụ, histamin được sản sinh cục bộ có thể hoạt hóa các thụ thể  $H_2$  trên tế bào biểu mô ruột cũng như tế bào miễn dịch để ức chế miễn dịch qua niêm mạc ở vật chủ, ví dụ thông qua sự ức chế xytokin tiền viêm. Do đó, sáng chế cho phép chuyển hóa thành phần trong thức ăn (histidin) thành histamin tại vị trí hoạt động và điều biến cục bộ đáp ứng miễn dịch của vật chủ (ví dụ trong ruột). Có thể thấy rằng sự sản sinh histamin cục bộ được đề xuất bởi sáng chế thực sự có ưu điểm so với các phương pháp khác như ăn uống qua miệng hoặc các hình thức đưa histamin vào cơ thể khác, đặc biệt là trong thực tế, phương pháp ăn uống qua đường miệng không được ủng hộ bởi các ảnh hưởng độc hại và các nguy cơ đối với sức khỏe đã được thừa nhận.

Cụ thể, trong các bệnh viêm ở đường ruột được quan tâm, việc sử dụng các chủng vi khuẩn, sản phẩm và chế phẩm theo sáng chế cho mục đích điều trị, có thể dẫn đến sự giảm đáng kể hiện tượng loét và tổn thương đường ruột (ví dụ tổn thương ruột kết), đo được bằng phương pháp tiêu chuẩn ví dụ như điểm Wallace, làm giảm đáng kể chứng sụt cân hoặc tình trạng viêm ruột, ví dụ như ruột kết.

Tác dụng làm giảm nhẹ hoặc thuyên giảm bệnh hoặc các triệu chứng của bệnh có thể đo được bằng thử nghiệm thích hợp bất kỳ. Tốt hơn, tác dụng làm giảm nhẹ hoặc thuyên giảm bệnh hoặc các triệu chứng của bệnh có ý nghĩa thống kê, tốt hơn với giá trị xác suất  $<0,05$ . Tác dụng làm giảm nhẹ hoặc thuyên giảm bệnh hoặc các triệu chứng

của bệnh này thường được xác định khi so với cá nhân hoặc tập đoàn đối chứng, ví dụ như một cá thể động vật có vú khỏe mạnh hoặc cá thể không được điều trị hoặc được điều trị bằng giả dược.

Phương thức thích hợp dùng để đưa vào cơ thể và dạng bào chế của các chủng vi khuẩn, v.v. được chọn phụ thuộc vào vị trí mong muốn histamin được sản sinh cục bộ. Cách thức đưa vào cơ thể được ưu tiên hơn đó là qua đường miệng, tuy nhiên, tương đương với một số phương pháp điều trị khu trú hoặc một số hình thức khác để đưa vào cục bộ cho da, trực tràng, âm đạo hoặc lợi cũng sẽ là thích hợp, hoặc tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp cũng có thể là thích hợp.

Mặc dù các ví dụ trong bản mô tả chứng minh việc sử dụng các chủng vi khuẩn theo sáng chế và liều dùng thích hợp để điều trị viêm ruột kết, cần phải hiểu rằng đây chỉ là một ví dụ về trạng thái viêm có thể được điều trị theo sáng chế, và các liều lượng thích hợp của chủng vi khuẩn, sản phẩm và chế phẩm theo sáng chế được xác định trong bản mô tả có thể được chọn tùy theo bệnh cần điều trị, cách thức đưa vào cơ thể và dạng bào chế liên quan.

Hỗn hợp thành phần trong chế độ ăn bao gồm histidin có thể được sử dụng để đảm bảo sự hiện diện của histidin và do đó làm tăng hiệu quả của các vi khuẩn. Histidin có thể được dùng một mình hoặc cùng với vi khuẩn.

Một cách đảm bảo sự cung cấp đầy đủ histidin của vi khuẩn là ăn thực phẩm giàu histidin, bao gồm nhưng không giới hạn ở protein đậu nành, phó mát, trứng, thịt gà và thịt lợn.

Operon histidin trong vi khuẩn đã được chứng minh là cải thiện khả năng sinh trưởng trong điều kiện pH thấp hoặc hạn chế nguồn năng lượng (Calles-Enriquez et al.), nhưng operon histidin đã không được kết hợp với các đặc tính chống viêm của các chủng vi khuẩn *L. reuteri*.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn bằng phương pháp theo sáng chế trong điều trị bệnh ung thư. Histamin kết hợp với IL-2 đã được sử dụng để điều trị AML. Sử dụng các chủng vi khuẩn theo sáng chế sẽ dẫn đến sự sản sinh histamin cục bộ, kết hợp với IL-2 có thể được sử dụng để điều trị AML.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng được chọn lọc để làm giảm nguy cơ dị ứng thực phẩm, các phản ứng dị ứng khác hoặc các bệnh tự miễn khác. Tính toàn thân tăng lên trong histamin trước đây được biết đến như một hệ quả của dị ứng gây ra bởi quá trình mất hạt của tế bào mast. Khi đưa chủng vi khuẩn được chọn lọc theo sáng chế này vào cơ thể người nhận, histamin được sản sinh cục bộ sẽ dẫn đến hiệu quả khử mẫn cảm làm giảm dị ứng hoặc các bệnh tự miễn khác.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng vi khuẩn axit lactic sản sinh histamin để làm giảm nguy cơ mắc tiêu chảy khi đi du lịch. Bệnh nhân được điều trị bằng thuốc ức chế histamin có nguy cơ bị tiêu chảy khi đi du lịch cao hơn. Nguy cơ tăng này có thể được trung hòa bằng cách đưa vào cơ thể vi khuẩn sinh axit lactic được chọn lọc bằng phương pháp theo sáng chế.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn lọc trong điều trị bệnh xơ cứng rải rác. Histamin đã được đề xuất là một phân tử quan trọng cho việc phát triển phương pháp điều trị mới đối với bệnh xơ cứng rải rác và các chủng được chọn lọc bằng phương pháp theo sáng chế sẽ cung cấp histamin cho bệnh nhân.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng vi khuẩn sản sinh histamin như một biện pháp điều trị chống viêm trên da, sử dụng histidin và các chất tương tự histadin có sẵn trong da. Do histidin là cơ chất cho axit urocanic, một chất được da sản sinh do chiếu tia UV và axit urocanic này có đặc tính kháng viêm trên da.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn lọc để ức chế sự hoạt hóa ERK1/2.

Mục đích khác của sáng chế là ức chế TNF alpha.

Mục đích khác của sáng chế là làm giảm viêm, cục bộ hoặc toàn thân.

Mục đích khác của sáng chế là để tăng cường hiện tượng xuất bào từ bong nước tiếp giáp bằng cách ức chế ERK1/2.

Mục đích khác của sáng chế là thúc đẩy tế bào gốc phôi người tự tái tạo bằng cách ức chế ERK1/2.

Mục đích khác của sáng chế là cảm ứng sự biểu hiện ABCA1 của đại thực bào và đưa cholesterol ra ngoài bằng cách ức chế ERK1/2.

Mục đích khác của sáng chế là làm giảm các chứng phì đại tim và suy tim bằng cách ức chế ERK1/2.

Mục đích khác của sáng chế là làm giảm sự tăng sinh của một số bệnh ung thư bao gồm bệnh bạch cầu (ví dụ như AML) hoặc các khối u ác tính. Do đó, tốt hơn các bệnh ung thư này là các bệnh có thể được điều trị bằng cách sử dụng các chủng vi khuẩn, các sản phẩm và chế phẩm theo sáng chế.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn lọc để sản sinh histamin trong các điều kiện nhất định như một chất dẫn truyền thần kinh ví dụ trong các tương tác ở đường niệu-sinh dục với hệ thần kinh trung ương và truyền tín hiệu thần kinh ở bộ phận bị đau. Vai trò làm chất dẫn truyền thần kinh có thể được mở rộng để tác động lên nhu động ruột (để điều trị táo bón hoặc tiêu chảy) và truyền tín hiệu đau trong ruột.

Mục đích khác của sáng chế là sử dụng các chủng vi khuẩn được chọn lọc để tác động đến trực ruột – não bởi vì LAB được chọn lọc sẽ sản sinh histamin và tác động đến nhận thức đau trong nội tạng và truyền tín hiệu trong hệ thần kinh trong ruột. Như vậy, có thể thấy rằng, sáng chế có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa loại bệnh bất kỳ được hưởng lợi từ sự sản sinh histamin cục bộ hoặc phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh bất kỳ có thể được điều trị nhờ sử dụng cục bộ histamin.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các sản phẩm chứa các chủng vi khuẩn này.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các sản phẩm chứa các chủng vi khuẩn này cùng với nguồn cacbon đặc hiệu, để có được sản phẩm symbiotic, sẽ thông qua kích thích đặc hiệu chủng vi khuẩn sản sinh histamin, giúp nâng cao hiệu phòng và điều trị bệnh.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các sản phẩm chứa các chủng vi khuẩn này cùng với histidin, bao gồm các chất tương tự histidin hoặc các sản phẩm hoặc chế phẩm chứa histidin. Tốt hơn, hỗn hợp này được đưa vào cơ thể qua đường miệng dưới dạng viên nang bảo vệ để giải phóng thành phần bên trong ở phần dưới của đường ruột, nhằm đảm bảo cho sự sống của histidin và vi khuẩn tại vị trí hoạt động.

Mục đích khác của sáng chế là kết hợp việc đưa vào cơ thể các chủng vi khuẩn này với chế độ ăn uống giàu histidin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm để sử dụng trong điều trị như đã được đề cập trong bản mô tả, trong đó việc sử dụng này còn bao gồm việc đưa vào cơ thể của bệnh nhân ít nhất một tác nhân trị liệu hoặc chất dinh dưỡng bổ sung. Theo các phương án này, tác nhân trị liệu bổ sung có thể là tác nhân bất kỳ hữu dụng trong việc điều trị bệnh, ví dụ tác nhân chống viêm hoặc tác nhân miễn dịch trị liệu như chemokin hoặc xytokin (ví dụ như IL-2).

Theo các phương án ưu tiên, tác nhân bổ sung này bao gồm histidin hoặc chất tương tự histidin. Nguồn cacbon thích hợp hỗ trợ cho sự sản sinh histamin bởi chủng vi khuẩn, hoặc hỗn hợp của chúng.

Các tác nhân bổ sung này có thể được đưa vào cơ thể cùng với các chủng vi khuẩn theo sáng chế hoặc có thể được đưa vào riêng rẽ. Ngoài ra, các tác nhân bổ sung này cũng có thể được đưa vào cùng lúc với các chủng vi khuẩn theo sáng chế hoặc ở các thời điểm khác nhau. Cách thức đưa vào cơ thể thích hợp và việc xác định thời điểm đưa vào cơ thể có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực phụ thuộc vào loại tác nhân bổ sung được sử dụng.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm bao gồm:

(i) chủng vi khuẩn sinh axit lactic thu được bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế (hoặc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh histamin như được định nghĩa khác trong bản mô tả), trong đó, chủng vi khuẩn sinh axit lactic này có operon histidin hoạt động và có thể sản sinh histamin; và

(ii) ít nhất một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm nguồn cacbon thích hợp hỗ trợ cho việc sản sinh histamin bởi chủng vi khuẩn này, nguồn histidin hoặc chất tương tự histidin, và hỗn hợp của chúng.

Trong các sản phẩm, chế phẩm và sử dụng theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả, tốt hơn, histidin hoặc các chất tương tự histidin này ở dạng thực phẩm hoặc thực phẩm bổ sung chứa histidin hoặc các chất tương tự histidin, hoặc nguồn cacbon bao gồm glucoza. Tốt hơn, nguồn cacbon này không chứa sucroza, hoặc ít nhất là chỉ bao

gồm sucroza ở mức độ không gây ảnh hưởng đáng kể tới sự sản sinh histamin của các chủng vi khuẩn. Tuy ý, các nguồn axit amin khác cũng có thể tùy chọn được đề xuất.

Theo các phương án thay thế, các chủng vi khuẩn được xác định tại phần (i) có thể được kết hợp với thành phần khác hữu ích trong việc điều trị bệnh, ví dụ, tác nhân trị liệu bổ sung, ví dụ tác nhân chống viêm hoặc tác nhân trị liệu miễn dịch bổ sung như chemokin hoặc xytokin (ví dụ như IL-2).

*Lactobacillus reuteri* là loài vi khuẩn sinh axit lactic lên men dị hình, ký sinh tự nhiên trong đường ruột của người và động vật. Một số chủng lợi khuẩn *L. reuteri* có khả năng ức chế sản sinh TNF $\alpha$  trong khi các chủng lợi khuẩn *L. reuteri* khác làm tăng sản sinh TNF $\alpha$  của người.

Sáng chế có thể được thực hiện nhờ các nghiên cứu về cơ chế của chủng lợi khuẩn *L. reuteri* 6457 và các chủng khác đã chứng minh hiệu quả của chúng khi hoạt hóa tế bào dòng tủy của người. Các chất chuyển hóa của *L. reuteri* được phân tách bằng cách sử dụng HILIC-HPLC, và histamin được xác định bằng phép đo phổ NMR và đo khối phổ. Định lượng histamin bằng phép đo khối phổ ba tứ cực đã chứng tỏ rằng chủng *L. reuteri* 6457 sản sinh histamin ở nồng độ tương đối cao khi được sinh trưởng trong môi trường tối thiểu chứa glucoza. Các nghiên cứu ở mức độ phiên mã gen trước đây cho rằng hai gen trong operon histidin của *L. reuteri* có thể đóng một vai trò trong sự ức chế TNF bởi chủng vi khuẩn 6475. Việc gây đột biến định hướng các gen này đã cho thấy mỗi gen trong operon histidin, thể đối vận histidin/histamin, *HdcA*, và *HdcB*, đóng vai trò quan trọng đối với kiểu hình ức chế TNF của chủng 6475. Các nghiên cứu về cơ chế đã chứng minh rằng histamin ức chế TNF bằng cách truyền tín hiệu thông qua thụ thể H<sub>2</sub> chứ không phải thụ thể H<sub>1</sub>. Sự truyền tín hiệu thông qua thụ thể H<sub>2</sub> làm tăng cAMP nội bào làm hoạt hóa PKA. Hoạt tính của PKA là cần thiết cho sự ức chế TNF bởi histamin. Histamin phong bế hoạt động của đường truyền tín hiệu MEK-ERK của MAPK.

Histamin được biết đến nhiều hơn bởi các tác dụng tiền viêm trong dị ứng và sốc phản vệ, nhưng một số nghiên cứu đã chứng minh chức năng chống viêm của histamin. Các nghiên cứu in vitro đã chứng minh rằng histamin có thể ức chế sự sản sinh các xytokin tiền viêm, IL-1, IL-12, và TNF từ bạch cầu đơn nhân của người và đại thực bào được kích thích bởi LPS và hiệu ứng này được đảo ngược bởi các chất đối kháng thụ

thể  $H_2$ . Ngoài ra, histamin có thể kích thích sự sản sinh cytokin chống viêm, IL-10, thông qua các thụ thể  $H_2$ . Sự truyền tín hiệu qua thụ thể  $H_2$  dẫn đến sự giảm biểu hiện của các thụ thể CD14, là thụ thể tham gia vào sự nhận dạng LPS, trên bề mặt của bạch cầu đơn nhân của người. Thụ thể TNF cũng bị ảnh hưởng bởi histamin. Sự truyền tín hiệu thông qua thụ thể  $H_1$  gây cảm ứng sự phát tán ở cả TNFR1 và TNFR2. Các nghiên cứu *in vivo* cũng cho thấy vai trò chống viêm đối với histamin. Biện pháp điều trị bằng dimaprit, chất chủ vận thụ thể  $H_2$  đặc hiệu làm giảm nồng độ TNF trong huyết tương ở mô hình thử nghiệm chuột bị sốc do nội độc tố (thử nghiệm LPS) và viêm gan (LPS và galactosamin). Histamin là chất bảo vệ trong mô hình thử nghiệm chuột bị tổn thương gan do LPS gây ra, và những tác động này đã bị suy yếu trong chuột bị phá vỡ thụ thể  $H_2$ . Trong ruột, histamin có thể giúp bảo vệ chống lại nhiễm khuẩn. Sự truyền tín hiệu qua thụ thể  $H_2$  trong các miếng đắp của Peyer giúp phòng ngừa nhiễm khuẩn gây ra bởi *Yersinia enterocolitica*.

Tác dụng của histamin có thể được xác định qua sự biểu hiện của thụ thể histamin trên tế bào đích. Trong tế bào T, hiệu quả của histamin phụ thuộc vào thụ thể histamin nào được hoạt hóa.

Bằng cách truyền tín hiệu qua thụ thể  $H_1$ , histamin làm tăng cường các phản ứng kiểu  $T_H1$  nhưng lại ức chế các phản ứng của  $T_H1$  và  $T_H2$  qua thụ thể  $H_2$ . Nghiên cứu đã được thực hiện để xem xét sự biểu hiện của thụ thể histamin trong đường tiêu hóa của người. Nhiều loại tế bào được kiểm tra biểu hiện nhiều thụ thể histamin. Ví dụ, tế bào miễn dịch, bao gồm đại thực bào, có biểu hiện cao các thụ thể  $H_1$  và  $H_2$  và đã được chứng minh là biểu hiện thấp thụ thể  $H_4$ . Sự tăng tế bào mast và histamin được cho là có liên quan đến sự quá mẫn cảm trong nội tạng đi kèm với IBS. Số lượng và hoạt tính của tế bào mast tăng lên ở gần vị trí phân bố dây thần kinh trong niêm mạc ruột kết có thể dẫn đến gia tăng cảm nhận đau bụng. Nghiên cứu với ketotifen, một chất ổn định tế bào mast, đã chứng minh ngưỡng đau gia tăng ở bệnh nhân có IBS, giảm các triệu chứng của IBS, nhưng không có sự thay đổi về số lượng hoặc hoạt tính (được xác định bởi sự giải phóng histamin và tryptaza) của tế bào mast trong mô sinh thiết trực tràng. Hiệu quả của ketotifen trong việc cải thiện IBS có thể không đem lại sự ổn định của tế bào mast, nhưng có thể đóng góp một vai trò khác như một chất đối kháng thụ thể  $H_1$ . Nếu sự hoạt hóa thụ thể  $H_1$  được kết hợp với phản ứng tiền viêm, ngăn chặn hoạt động của nó với ketotifen có thể cho phép histamin được sản sinh từ tế bào mast hoặc hệ vi

sinh vật đường ruột, như *L. reuteri*, để chỉ truyền tín hiệu thông qua thụ thể  $H_2$ . Như các tác giả sáng chế đã chứng minh, việc truyền tín hiệu thông qua thụ thể  $H_2$  có thể ngăn chặn sự sản sinh TNF và tạo ra tác dụng kháng viêm. Cơ chế ketotifen này có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu mới kết hợp các chất đối kháng thụ thể  $H_1$  với hiệu ứng probiotic của chủng vi khuẩn *L. reuteri*.

Ngoài ra, việc thay đổi nguồn cacbon của môi trường nuôi cấy từ glucoza sang sucroza là đủ để ức chế kiểu hình ức chế TNF của chủng vi khuẩn được chọn lọc, ví dụ chủng vi khuẩn *L. reuteri* 6475. Ngoài ra, sự điều hòa xuống đáng kể của cả ba gen có trong operon histidin đã được quan sát với điều kiện sinh trưởng có sucroza.

Việc xác định histamin là hợp chất chống viêm được sản sinh bởi các chủng lợi khuẩn *Lactobacillus* được chọn lọc sẽ giúp xác định các ứng dụng trong trị liệu của chủng lợi khuẩn này. Các nghiên cứu về cơ chế đã liên kết sự hoạt hóa thụ thể  $H_2$  trên tế bào THP-1 với histamin và sự ức chế hoạt hóa ERK. Sự hoạt hóa ERK tham gia vào nhiều chức năng của tế bào bên cạnh sự sản sinh TNF. Sự hoạt hóa ERK tham gia vào quá trình tăng sinh, tạo khối u, quá trình biệt hóa, và sự sống của tế bào. Kết quả cho thấy vai trò của các chủng được chọn lọc như *L. reuteri* 6475 trong việc bảo vệ chống lại bệnh ung thư bằng cách ức chế viêm, quá trình tăng sinh tế bào, và sự chết tế bào theo chương trình bằng cách ức chế sự hoạt hóa ERK. Ngoài ra, histamin là chất dẫn truyền thần kinh đã biết. Sự sản sinh histamin từ các chủng được chọn lọc có thể ảnh hưởng đến sự truyền tín hiệu trong hệ thần kinh trong ruột, ảnh hưởng đến cảm nhận đau và nhu động ruột. Để đảm bảo việc sản sinh histamin tại vị trí hoạt động, vi khuẩn cùng với histidin tốt hơn được cung cấp vào vị trí đó. Histidin có thể được đưa vào cơ thể cùng với vi khuẩn hoặc riêng rẽ, chế độ ăn giàu histidin cũng có thể làm tăng sự sản sinh histamin.

Sáng chế đề xuất một số chủng vi khuẩn sinh axit lactic và phương pháp chọn lọc các chủng vi khuẩn này và các sản phẩm chứa các chủng vi khuẩn này. Vi khuẩn được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp sàng lọc đối với operon histidin, ngạc nhiên là sự hiện diện của operon histidin hoạt động đã được chứng minh là cần thiết cho các tác động có lợi khác nhau như các đặc tính điều biến miễn dịch của các chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn lọc.

Các mục đích và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn đối với người đọc và được dự tính rằng các mục đích và ưu điểm này đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với viện dẫn đến các ví dụ không giới hạn sau đây:

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

| Các chủng vi khuẩn                     | Mô tả                                | Nguồn                       |
|----------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475        | Phân lập từ sữa mẹ người<br>Phân Lan | BioGaia AB<br>(Raleigh, NC) |
| <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::JP577 | Đột biến chèn đoạn                   | Nghiên cứu này              |
| <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::1229  | Đột biến chèn đoạn                   | Nghiên cứu này              |
| <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::1230  | Đột biến chèn đoạn                   | Nghiên cứu này              |
| <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475::1231  | Đột biến chèn đoạn                   | Nghiên cứu này              |

Bảng 2. Phân tích ở mức độ phiên mã gen (Transcriptomic) của operon histidin trong chủng vi khuẩn *L. reuteri* 6475 đột biến.

| So sánh                       | Gen <i>HdcB</i> |              | Histidin<br>decarboxylaza,<br>pyruvoyl typ A<br>( <i>HdcA</i> ) |           | Thẻ đối vận<br>Histidin/Histamin |           |
|-------------------------------|-----------------|--------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
|                               | Thay đổi<br>lần | Giá<br>trị p | Thay<br>đổi lần                                                 | Giá trị p | Thay đổi<br>lần                  | Giá trị p |
| CFAS <sup>*</sup> (23)/6475   | -2,3            | <0,05        | -1,1                                                            | 0,68      | -1,2                             | 0,36      |
| THFS1 <sup>*</sup> /6475      | -1,33           | 0,60         | -3,28                                                           | <0,05     | -3,45                            | <0,001    |
| Sucroza <sup>§</sup> /Glucosa | -11,8           | <0,01        | -30,1                                                           | <0,001    | -5,5                             | <0,001    |
| THFS2/6475                    | -               | -            | 1,2                                                             | 0,7       | 0,8                              | 0,2       |
| PocR/6475                     | -               | -            | 2,4                                                             | 0,10      | 1,3                              | 0,66      |

\*Các đột biến chèn đoạn làm mất khả năng ức chế sự sản sinh TNF so với chủng vi khuẩn 6475 kiểu dại. CFAS: axit béo cyclopropan syntaza, THFS1: tetrahydrofolat syntaza 1, THFS2: tetrahydrofolat syntaza 2.

§Chủng vi khuẩn 6475 kiểu dại sinh trưởng trong LDMIIIS so với chủng vi khuẩn 6475 kiểu dại sinh trưởng trong IDMIIG. Chủng vi khuẩn 6475 kiểu dại sinh trưởng trong LDMIIIS mất khả năng ức chế sự sản sinh TNF.

#### Ví dụ 1

Sản sinh histamin bởi các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được chọn lọc

Các chủng vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Tất cả các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này được mô tả trong bảng 1. *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 được phân lập từ sữa mẹ người Phần Lan (có sẵn ở ATCC, Manassas, VA, USA). Các chủng vi khuẩn *L. reuteri* ATCC PTA 6475, ATCC 6475 JP577, ATCC 6475 1229, ATCC 6475 1230, và ATCC 6475 1231 sẽ được gọi tắt là các chủng 6475, JP577, 1229, 1230, và 1231, tương ứng, trong suốt bản mô tả này.

Các chủng *L. reuteri* được nuôi trong điều kiện yếm khí trong 16 đến 18 giờ trong môi trường deMan, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ), và cấy vào 2L môi trường bán xác định, LDMIII (OD<sub>600</sub> được điều chỉnh đến 0,1), đã được mô tả trước đó. Nguồn cacbon là glucoza, LDMIIIG, hoặc sucroza, LDMIIIS. Các chủng nuôi cấy được sinh trưởng trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị kỵ khí (MACS MG-500, Microbiology International, Frederick, MD) được cung cấp hỗn hợp gồm 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, và 80% N<sub>2</sub>. Các mẫu được lấy vào các thời điểm khác nhau theo sự sinh trưởng bằng cách đo OD<sub>600</sub>. Ở pha cân bằng (24 giờ), tế bào được tạo viên từ 2L dịch nuôi cấy (4000 x g, 10 phút). Các viên tế bào và phần dịch nổi không chứa tế bào được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C trước khi tiếp tục xử lý để phân tách bằng HPLC và thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học ức chế TNF.

Dòng tế bào và các thuốc thử

Các thử nghiệm in vitro được thực hiện với tế bào THP-1 (dòng tế bào bạch cầu đơn nhân to của người, ATCC, Manassas, VA) được duy trì trong RPMI (ATCC) và huyết thanh bào thai bò được bất hoạt bằng nhiệt (Invitrogen, Carlsbad, CA) ở 37°C, 5%

CO<sub>2</sub>. Các kháng thể MEK 1/2, phospho- MEK 1/2, ERK 1/2, và phospho-ERK 1/2 và chất ức chế MEK U0126 của hãng Cell Signaling Technology (Danvers, MA) và kháng thể  $\beta$ -Actin của hãng Abcam (Cambridge, MA). Tất cả các thuốc thử khác của hãng Sigma (St Louis, MO).

#### Tách các yếu tố liên kết thành tế bào bằng HILIC-HPLC

Các viên tế bào (7g) từ chủng 6475 được sinh trưởng trong LDMIII<sup>G</sup> hoặc LDMIII<sup>S</sup> được rửa với 30mL axetonitril 50%/axit trifloaxetic (TFA) 0,1% trên nước đá lạnh. Huyền phù tế bào được ly tâm trong 10 phút, 4000 x g ở 4°C. Dịch nổi trên bề mặt được lọc qua màng lọc polyvinyliden florua (PVDF) (cỡ lỗ 0,45 $\mu$ m, Millipore, Bedford, MA), được đông khô, và tạo huyền phù lại trong 10mL axit formic 0,1%. Mẫu được tạo huyền phù lại được phân đoạn theo kích cỡ bằng thiết bị lọc ly tâm Amicon Ultra-15 sử dụng màng ultracel-3 (Millipore, Bedford, MA). Làm khô dịch lọc (9mL) xuống còn 1mL bằng chân không tốc độ cao, và sử dụng 0,75mL cho phân tích HILIC - HPLC. Hòa tan mẫu với axetonitril 100% trước khi chạy trên cột PolyLC hydroxyetyl với gradient của axetonitril 100-0%, axit formic 0,1%. Các mẫu được chạy trong 25 phút và thu được 25 phân đoạn (A1-C1) tại 10mL/phút/ống. 3mL từ mỗi phân đoạn được đông khô, tạo huyền phù lại trong 3mL axit axetic 0,1%, và được đông khô một lần nữa để thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học ức chế TNF.

#### Thử nghiệm sinh học ức chế TNF và TNF ELISA

Các dịch nổi của vi khuẩn (10mL) từ dịch nuôi cấy LDMIII sau 24 giờ được lọc khử trùng bằng màng lọc PVDF (cỡ lỗ 0,22 $\mu$ m, Millipore) và phân đoạn theo kích cỡ như mô tả trên đây. 1mL dịch lọc <3 kDa được làm khô bằng chân không tốc độ cao và được tạo huyền phù lại trong môi trường RPMI. Các mẫu dịch nổi đã được xử lý gọi là môi trường điều kiện. Tất cả các dịch nổi được chuẩn hóa theo thể tích đến OD<sub>600</sub> = 1,0. Phân đoạn đông khô từ phân tách bằng HILIC-HPLC được tạo huyền phù lại trong 400 $\mu$ L amoni bicarbonat 10mg/mL, làm khô trong chân không tốc độ cao và được tạo huyền phù lại trong 400 $\mu$ L môi trường RPMI. Môi trường điều kiện và các phân đoạn nước rửa viên tế bào được thử nghiệm về khả năng điều biến sự sản sinh TNF trong tế bào bạch cầu đơn nhân to. Tóm lại, tế bào THP-1 (khoảng 5x10<sup>4</sup> tế bào) được kích thích để sản sinh TNF bằng cách bổ sung 100ng/mL Pam<sub>3</sub>Cys-SKKKK x 3 HCl (EMC Microcollections, Tuebingen, Đức) như đã mô tả ở trên. Chất ức chế - chất đối kháng thụ

thể H<sub>2</sub>, ranitidin và ximetidin ( $10^{-4} - 10^{-6}$ M), chất đối kháng thụ thể H<sub>1</sub>, indometaxin ( $10^{-5} - 10^{-6}$ M), chất ức chế MEK, U0126 (10 $\mu$ M), và chất ức chế PKA, H89 (N-[2-(p-bromoxinnylamino)ethyl]-5-isoquinolinsulfonamid dihydroclorua) ( $10^{-5}$ M) – đã được bổ sung vào tế bào THP-1, theo sau là môi trường điều kiện *L. reuteri* hoặc các phân đoạn nước rửa viên tế bào (5% thể tích/thể tích), histamin ( $10^{-5}$ M), hoặc dibutyl cAMP ( $10^{-3} - 10^{-7}$ M). Các đĩa được ủ ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub> trong 3,5 giờ. Tế bào THP-1 được tạo viên (3000 x g, 5 phút, 4°C), thử nghiệm ELISA định lượng được sử dụng để định lượng TNF có trong dịch nội tế bào THP-1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Hợp chất ức chế TNF của *L. reuteri* 6475 được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng tương tác ưa nước – sắc ký lỏng hiệu năng cao (“hydrophilic interaction liquid chromatography - high performance liquid chromatography”-HILIC-HPLC).

Các viên tế bào vi khuẩn được rửa để loại bỏ các hợp chất liên kết lỏng lẻo với bề mặt tế bào. Các thành phần của nước rửa viên tế bào được phân tách dựa trên tính kỵ nước bằng cách sử dụng HILIC-HPLC, và 25 phân đoạn thu được đã được thử nghiệm về sự duy trì các hợp chất ức chế TNF. *L. reuteri* 6475 sinh trưởng trong môi trường tối thiểu với glucoza là nguồn cacbon duy nhất sản sinh các yếu tố ức chế TNF mà được giữ lại trong 3 phân đoạn của HILIC-HPLC riêng biệt (B3, B5 và B6, dữ liệu không được thể hiện trong bản mô tả). *L. reuteri* 6475 sinh trưởng với sucroza là nguồn cacbon duy nhất mất kiểu hình ức chế TNF và được dùng làm mẫu đối chứng âm. Không có phân đoạn nào trong số các phân đoạn của HILIC-HPLC từ nước rửa viên tế bào 6475 sinh trưởng trên sucroza thể hiện sự ức chế đáng kể TNF (dữ liệu không thể hiện).

Histamin được xác định trong phân đoạn ức chế TNF của HILIC-HPLC bởi phép đo quang phổ NMRR và đo khối phổ.

Phân đoạn B3 của HILIC-HPLC ức chế TNF được phân tích bởi <sup>1</sup>H NMR và so sánh với phân đoạn liền kề B4 không ức chế TNF. Một loạt đỉnh duy nhất với sự thay đổi hóa học giữa 7,0-7,5 ppm, là điểm đặc trưng của hợp chất thơm, được quan sát thấy trong phân đoạn B3 nhưng không có trong phân đoạn B4 (dữ liệu không được thể hiện). Cụm hợp chất thơm này được tiếp tục phân tích bằng NMR 2 chiều (2D) sự gắn kết một lượng tử dị nhân (heteronuclear single quantum coherence - HSQC) để xác định thành phần của

nó. Các hợp chất thơm bao gồm tryptophan, phenylalanin, histamin, và một hợp chất không xác định. Tryptophan và phenylalanin là các thành phần của môi trường nuôi cấy vi khuẩn trong khi histamin thì không phải. Các kết quả này đã được xác nhận bằng cách sử dụng phương pháp NMR 2D bổ sung, quang phổ tương quan tổng (total correlation spectroscopy - TOCSY). Histamin là một amin nguồn gốc sinh vật được tạo ra từ histidin nhờ histidin decarboxylaza bởi một số vi khuẩn lên men bao gồm lactobacilli. Histamin cũng đã được xác định trong phân đoạn B3 nhờ sử dụng phương pháp đo khối phổ thời gian bay điện phun (electrospray time-of-flight mass spectrometry - ESI TOF MS). Histamin không được biến đổi cộng hóa trị dựa trên mô hình phân mảnh của nó trong phân tích MS/MS. Phân tích phân đoạn B3 tương ứng của *L. reuteri* 6475 sinh trưởng trong môi trường glucoza bằng ESI TOF MS đã không cho thấy histamin bất kỳ. *L. reuteri* 6475 sinh trưởng trong môi trường glucoza sản sinh histamin hiện diện trong phân đoạn ức chế TNF của HILIC-HPLC.

Histamin được định lượng trong các phân đoạn HILIC-HPLC chọn lọc bằng cách sử dụng phép đo khối phổ ba tứ cực.

Phép đo khối phổ ba tứ cực là phương pháp được xác định có độ nhạy cao để định lượng các hợp chất phân tử nhỏ. Histamin được định lượng trong phạm vi chọn lọc của các phân đoạn HILIC-HPLC từ *L. reuteri* 6475 glucoza (B2-B7) và sucroza (B2-B9) cũng như dịch nổi nuôi cấy vi khuẩn. Nồng độ histamin cao (>300 ng/ml) tương quan với khả năng ức chế TNF của các phân đoạn HILIC-HPLC (Fig.1). Nồng độ histamin thấp đo được ở phần lớn các phân đoạn được khảo sát, bao gồm phân đoạn từ 6475 sucroza (Fig.1). Khả năng ức chế sản sinh TNF của histamin dường như là phụ thuộc vào nồng độ.

Histamin tổng hợp và histamin được sản sinh bởi *L. reuteri* 6174 ức chế sự sản sinh TNF qua thụ thể  $H_2$

Histamin có thể ức chế đáng kể sự sản sinh TNF từ tế bào bạch cầu đơn nhân to của người được hoạt hóa bởi TLR2 (THP-1) (Fig.4A). Histamin có thể truyền tín hiệu thông qua bốn thụ thể histamin khác nhau, tuy nhiên tế bào bạch cầu đơn nhân to chỉ biểu hiện nồng độ cao của các thụ thể  $H_1$  và  $H_2$ . Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy tác dụng của histamin trong việc sản sinh TNF thông qua thụ thể  $H_2$ . Các chất đối kháng đặc hiệu thụ thể  $H_1$  và  $H_2$  được sử dụng để xác định thụ thể nào trung hòa tác dụng của histamin

lên tế bào THP-1. Các chất đối kháng đặc hiệu thụ thể  $H_2$  cụ thể, ranitidin và ximetidin, có thể ngăn chặn sự ức chế TNF bởi histamine theo cách phụ thuộc vào nồng độ (Fig.2A). Phân tích đo dòng tế bào với các kháng thể đặc hiệu thụ thể  $H_2$  cho thấy tế bào THP-1 biểu hiện cao thụ thể  $H_2$  (dữ liệu không thể hiện). Chất đối kháng đặc hiệu thụ thể  $H_1$ , indometaxin, không có tác dụng ức chế TNF của histamin (Fig.2A). Histamin ngăn chặn sản sinh TNF từ tế bào THP-1 được hoạt hóa bởi TLR2 thông qua truyền tín hiệu qua thụ thể  $H_2$ . Môi trường điều kiện *L. reuteri* 6475 chứa histamin ức chế đáng kể TNF so với đối chứng môi trường, và tác dụng này bị chặn một phần bởi các chất đối kháng thụ thể  $H_2$  chứ không phải các chất đối kháng thụ thể  $H_1$  (Fig.2A). Sự ức chế TNF bị chặn một phần cho thấy rằng histamin hiện diện trong môi trường điều kiện 6475 truyền tín hiệu thông qua thụ thể  $H_2$  nhưng các yếu tố ức chế TNF khác hành động thông qua các cơ chế thay thế khác cũng có thể hiện diện trong môi trường điều kiện. Nước rửa viên tế bào chứa histamin của chủng 6475 cũng ức chế sản sinh TNF (Fig.2B). Như đã thấy với môi trường điều kiện 6475, chất đối kháng thụ thể  $H_2$  ngăn chặn một phần tác dụng của nước rửa viên tế bào 6475 (Fig.2B), cho thấy nhiều modulin miễn dịch hiện diện trong nước rửa viên tế bào không được tách phân đoạn. Hiệu quả của phân đoạn B3 ức chế TNF, mà chứa lượng lớn histamin tinh khiết, đã hoàn toàn bị chặn bởi việc bổ sung các chất đối kháng thụ thể  $H_2$  (Fig.2B).

## Ví dụ 2

Chọn lọc các chủng vi khuẩn sản sinh histamin

Xác định/chọn lọc các chủng vi khuẩn sản sinh histamin

Các chủng vi khuẩn cần kiểm tra và có thể được chọn lọc được nuôi cấy trong điều kiện yếm khí trong 16 đến 18 giờ trong môi trường deMan, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ), và cấy vào 2L môi trường bán xác định, LDMIII (OD<sub>600</sub> được điều chỉnh đến 0,1). Nguồn cacbon là glucoza, LDMIIIG. Mỗi mẻ cấy được nuôi cấy trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị nuôi cấy kỵ khí (MACS MG-500, Microbiology International, Frederick, MD) được cấp hỗn hợp khí gồm 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, và 80% N<sub>2</sub>. Các mẫu được lấy tại các thời điểm khác nhau theo sự sinh trưởng bằng cách đo OD<sub>600</sub>. Ở phân cân bằng (24 giờ), tế bào được lấy mẫu để phân tích bằng cách sử dụng phương pháp PCR thời gian thực để kiểm tra sự hiện diện của ba gen, thể đối vận histidin/histamin, *HdcA*, và *HdcB*.

Đối với các chủng dương tính với ba gen, mức độ histamin được sản sinh sẽ được xác định bằng phương pháp đo khối phổ ba tứ cực. Các chủng có sự sản sinh histamin cao nhất (>250 pg/ml) sẽ được chọn. Sự sản sinh histamin cũng có thể được đánh giá và định lượng bằng thử nghiệm ELISA hoặc thử nghiệm miễn dịch.

### Ví dụ 3

#### Chung minh sự điều hòa miễn dịch

##### Operon histidin đóng góp vào kiểu hình ức chế TNF của *L. reuteri* 6475

Ba gen có vẻ như là một phần của một operon tham gia vào sự sản sinh histamin của *L. reuteri* 6475. Các gen này là thể đối vận histidin/histamin, các histidin decarboxylaza pyruvoyl typ A (*HdcA*), và *HdcB* (Fig.3A). Các nghiên cứu ở mức độ phiên mã trước đây cho rằng gen đối vận histidin/histamin và *HdcA* có thể là quan trọng đối với kiểu hình ức chế TNF của chủng 6475. Cả 3 gen đều được điều hòa giảm mạnh mẽ ở chủng 6475 được nuôi cấy trong môi trường sucroza (mất ức chế TNF) so với 6475 sinh trưởng trong môi trường glucos (bảng 2). Ngoài ra, ít nhất một gen trong operon được điều hòa giảm ở hai thể đột biến mà mất ức chế TNF (bảng 2). Các thể đột biến này đã được nghiên cứu trước đó và mặc dù các sản phẩm của gen không có đặc tính ức chế TNF, các gen dường như là quan trọng đối với các kiểu hình kháng viêm của 6475. Ngược lại, 2 thể đột biến không bị mất khả năng ức chế TNF được chứng minh là không điều hòa giảm bất kỳ gen nào trong operon histidin (bảng 2). Các đột biến được tạo ra ở mỗi trong số 3 gen này bằng cách đưa chèn bộ ba kết thúc sớm vào trình tự gen (các chủng 1229, 1230 và 1231). Đột biến cũng được tạo ra ở gen không liên quan, gen kháng rifampixin, để dùng làm đối chứng âm (chủng JP577). Đột biến ở chỉ một trong các gen trong operon histidin là đủ để gây ra sự mất một phần sự ức chế TNF so với hủng kiểu dại (Fig.3B), đề xuất rằng mỗi một trong các gen này là quan trọng đối với kiểu hình ức chế TNF của chủng vi khuẩn *L. reuteri* 6475. Sự mất một phần hoạt tính cho thấy các modulin miễn dịch hoạt tính khác vẫn được sản sinh bởi *L. reuteri* 6475.

Sự hoạt hóa ERK1/2 là cần thiết cho sự sản sinh TNF bởi tế bào bạch cầu đơn nhân to được kích thích bởi TLR2

ERK1/2 được hoạt hóa bằng cách phosphoryl hóa từ MAPKK, MEK1/2 ngược chiều, và đã được chứng minh trước đây là quan trọng đối với sản sinh TNF. Tế bào

THP-1 được xử lý bằng chất ức chế MEK1/2 đặc hiệu, U0126, cho các khoảng thời gian khác nhau trước khi kích thích bằng chất chủ vận TLR2 để ngăn chặn sự hoạt hóa ERK1/2. Xử lý bằng U0126 trong 30 phút là đủ để ngăn chặn sản sinh TNF (dữ liệu không được thể hiện). ERK1/2 được hoạt hóa sau khi kích thích bằng TLR2 và là quan trọng để kích thích sản sinh TNF trong hệ thống mô hình của tác giả.

Sự kích thích thụ thể  $H_2$  dẫn đến sự gia tăng cAMP trong tế bào

Thụ thể  $H_2$  là thụ thể liên kết protein G có thể hoạt hóa adenylat cyclaza và tăng cAMP trong tế bào. TNF có thể bị ức chế ở mức độ phiên mã bởi cAMP và các chất tương tự cAMP. Tế bào THP-1 được kích thích bằng chất chủ vận TLR2, với sự có mặt của đối chứng môi trường, dịch nổi bề mặt 6475 hoặc histamin có hoặc không có chất đối kháng thụ thể  $H_2$  và mức độ cAMP nội bào được đo. Dịch nổi *L. reuteri* 6475 gây ra sự gia tăng cAMP nhỏ nhưng đáng kể (dữ liệu không được thể hiện). Xử lý bằng chất đối kháng  $H_2$  ngăn chặn tác dụng này. Sự gia tăng cAMP cũng được nhìn thấy với việc điều trị bằng histamin, và hiệu quả đã bị chặn lại bởi chất đối kháng  $H_2$  (dữ liệu không được thể hiện). Một chất tổng hợp tương tự của cAMP, dibutyryl cAMP (dcAMP), được bổ sung vào tế bào THP-1 được kích thích bởi TLR2 và tác dụng lên sự sản sinh TNF được theo dõi. Việc bổ sung dcAMP ( $10^{-5}$  -  $10^{-3}$ M) là đủ để ức chế sản sinh TNF (dữ liệu không được thể hiện). Sự kích thích thụ thể  $H_2$  của histamin dẫn đến sự gia tăng cAMP, điều này có thể ngăn chặn sản sinh TNF sau đó trong tế bào bạch cầu đơn nhân to được hoạt hóa.

Hoạt tính của protein kinaza A (PKA) là quan trọng đối với sự ức chế TNF bởi *L. reuteri* 6475, histamin, và dcAMP

Tăng nồng độ cAMP có thể hoạt hóa PKA và do đó ức chế đường truyền tín hiệu ERK MAPK sau đó. Để xác định xem hoạt tính của PKA có quan trọng đối với sự ức chế TNF của histamin được sản sinh bởi chủng 4675 hay không, tế bào THP-1 được hoạt hóa được xử lý bằng chất ức chế PKA đặc hiệu, H89, với sự hiện diện của dịch nổi 6475, phân đoạn B3, histamin hoặc các nồng độ khác nhau của dcAMP. Việc bổ sung H89 ngăn chặn một phần sự ức chế TNF bởi tất cả các hợp chất ức chế TNF thông thường (dữ liệu không được thể hiện). Do đó, hoạt tính của PKA là quan trọng đối với sự ức chế TNF của histamin và dcAMP.

Sự truyền tín hiệu thông qua thụ thể  $H_2$  ngăn chặn sự hoạt hóa MEK1/2 và

## ERK1/2

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng PKA có thể ức chế sự hoạt hóa Ras/Raf của MEK và do đó ức chế sự truyền tín hiệu EPK MAPK. Xử lý tế bào THP-1 đã hoạt hóa bằng dịch nổi 6475, histamin hoặc U0126 ngăn chặn sự phosphoryl hóa cả MEK1/2 và ERK1/2 sau đó so với đối chứng môi trường (dữ liệu không được thể hiện). Xử lý bằng chất đối kháng thụ thể  $H_2$  khôi phục sự hoạt hóa cả MEK1/2 và ERK1/2 (dữ liệu không được thể hiện). Không có sự khác biệt về mức độ protein MEK1/2 và ERK1/2 với bất kỳ tùy chọn xử lý nào. Histamin từ chủng 6475 ức chế sự hoạt hóa MEK và ERK sau đó dẫn đến giảm sản sinh TNF từ tế bào tủy được kích thích bởi TLR2.

Do đó, những thử nghiệm trên cho thấy sự kích thích thụ thể  $H_2$  dẫn đến sự gia tăng cAMP, hoạt hóa Protein Kinaza A (PKA) và ức chế đường truyền tín hiệu MEK-ERK của MAPK. Như đã mô tả ở trên, các nghiên cứu cơ chế đã được thực hiện để xác định tác động của histamin lên các đường truyền tín hiệu của protein kinaza được hoạt hóa bởi chất gây phân bào (Mitogen Activated Protein Kinase - MAPK). Sự ức chế đường truyền tín hiệu MEK-ERK bằng chất ức chế đặc hiệu MEK là đủ để ngăn chặn sản sinh TNF. Điều trị tế bào THP-1 được hoạt hóa bằng dịch nổi chủng 6475 hoặc histamin làm gia tăng cAMP trong tế bào. Sự gia tăng cAMP đã bị chặn lại bởi ranitidin, một chất đối kháng thụ thể  $H_2$  đặc hiệu. Điều trị tế bào THP-1 được kích thích bởi TLR2 bằng chất tổng hợp tương tự của cAMP, dcAMP, là đủ để ức chế sản sinh TNF. Sự ức chế hoạt tính của PKA ngăn chặn một phần sự ức chế TNF bởi các hợp chất ức chế TNF trước đó trong môi trường điều kiện 6475, phân đoạn B3, histamin, và dcAMP. Điều trị tế bào THP1 đã hoạt hóa bằng môi trường điều kiện 6475, histamin, hoặc U0126 ức chế sự hoạt hóa MEK1/2, tác dụng này bị ngăn chặn bởi sự hiện diện của ranitidin. Điều trị tế bào THP-1 đã hoạt hóa bằng môi trường điều kiện 6475, histamin hoặc U0126 ức chế sự hoạt hóa ERK1/2, tác dụng này bị ngăn chặn bởi sự hiện diện của ranitidin.

## Ví dụ 4

Phát hiện MEK1/2 và ERK1/2 bằng phương pháp thẩm tách western

Tế bào THP-1 được ly giải trong đệm ly giải giữ trong nước đá lạnh bao gồm 50mM Tris, pH 7,4, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 1mM  $Na_3VO_4$ , 1% thể tích/thể tích Nonidet P40, 0,2% v/v  $NaN_3$ , và các chất ức chế proteaza và phosphataza. Dịch ly giải được ủ trên nước đá trong 30 phút, xoáy mỗi 10 phút, và làm trong bằng

cách ly tâm ở 13.000 x g trong 10 phút ở 4°C. Nồng độ protein được đo bằng cách sử dụng kit Quant-iT™ Protein Assay (Invitrogen) và một huỳnh quang kế bit lượng tử theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các lượng protein bằng nhau được nạp vào gel điện di.

Phân tích sự hoạt hóa ERK1/2 được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể phospho-ERK1/2 đặc hiệu. Dịch chiết tế bào được nạp vào gel 10% SDS-polyacrylamit và được chuyển đến màng polyvinyliden diflorua (Bio-Rad, Hercules, CA). Màng được chặn qua đêm ở nhiệt độ 4 độ C trong đệm chặn (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE). Sau nhiều lần rửa, màng được dò bởi các kháng thể đặc hiệu ERK1/2, phospho-ERK1/2 hoặc  $\beta$ -Actin được pha loãng trong đệm chặn (Li-Cor) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, màng được ủ với kháng thể thứ cấp liên hợp với peroxidaza của cây cải ngựa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và các vết sau đó được hiện hình bằng phương pháp dò bằng chất phát quang hóa học. Phân tích sự hoạt hóa MEK1/2 được thực hiện như mô tả ở trên ngoại trừ việc ủ kháng thể sơ cấp qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

#### Ví dụ 5

Thể đột biến *hdcA* làm giảm khả năng làm thuyên giảm bệnh viêm ruột kết

Chủng vi khuẩn và nuôi cấy

Các thể đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp oligonucleotit trung gian bởi RecT. *L. reuteri* biểu hiện RecT (chủng RPB0000) được sử dụng để tạo các đột biến ở *rpoB* (locus tag HMPREF0536\_0828 (ZP\_03961568)) và các gen đích nằm trong cụm gen histidin histidin decarboxylaza HMPREF0536\_1229 (ZP\_03961969), HMPREF0536\_1230 (ZP\_03961970) and HMPREF0536\_1231 (ZP\_03961971) để tạo ra các chủng tương ứng là RPRB3002, RPRB3004, RPRB3005 và RPRB3006. Các đột biến đã được xác nhận bằng phương pháp PCR, và tính toàn vẹn đã được khẳng định bằng phương pháp phân tích theo trình tự.

*L. reuteri* ATCC PTA 6475 và thể đột biến gen histidin decarboxylaza (*hdcA*) được nuôi cấy trong môi trường deMan, Rogosa, Sharpe (Difco, Franklin Lakes, NJ) ở 37°C trong thiết bị kỵ khí (MACS MG-500, Microbiology International, Frederick, MD) được cung cấp với một hỗn hợp của 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, và 80% N<sub>2</sub>.

Chuẩn bị tế bào *L. reuteri* và đưa vào cơ thể chuột

Một khuẩn lạc đơn của mỗi chủng *L. reuteri* được cấy vào 10mL môi trường MRS

và cho sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện yếm khí trong 18-20 giờ. Điều chỉnh vi khuẩn để OD600=0,03 để cấy vào 40mL MRS để bắt đầu quá trình lên men và sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong điều kiện yếm khí trong 5,5 giờ (OD600≈2,5, vi khuẩn đang ở trong giai đoạn cấp số nhân tại thời điểm này). Tế bào được tạo viên nhẹ nhàng (2500 x g, RT, 4 phút) và tạo huyền phù lại trong MRS ở nồng độ  $25 \times 10^9$  CFU/mL. Môi trường MRS vô trùng được sử dụng làm đối chứng môi trường. Mỗi con chuột cái 8 tuần tuổi BALB/c được nhận một liều vừa chuẩn bị của chủng *L. reuteri* 6475 kiểu dại hoặc thể đột biến hdcA hoặc MRS (0,2mL mỗi lần) mỗi ngày trong 7 ngày bằng ống thông miệng dạ dày sau 10 ngày thích nghi. Tất cả các thử nghiệm trên chuột được thực hiện theo các quy trình chuẩn đã được duyệt (AN-4199; animal facility of Baylor College of Medicine). Chuột (45 ngày tuổi) được nhận về từ Harlan Laboratories (Houston, TX) và được duy trì trong điều kiện không có mầm bệnh riêng trong lồng có bộ phận lọc ở trên (5 con chuột mỗi lồng) và có thể tiếp cận với nguồn nước cất tự do và động vật gặm nhấm Harlan Chow 2918. Chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm khác nhau.

Gây bệnh viêm ruột kết cấp tính bằng cách sử dụng thuốc xổ trực tràng axit trinitrobenzen sulfonic (TNBS). Viêm ruột kết khởi phát 6 giờ trước khi ống thứ 6 được đưa vào. Chuột được gây mê bằng cách cho hít liên tục isofluran. Dung dịch TNBS 5% trong nước (Sigma-Aldrich, USA) được pha loãng với một thể tích tương đương etanol tuyệt đối và được đưa vào trực tràng với liều 100 mg/kg trọng lượng cơ thể. Chuột được giữ đầu hướng xuống dưới theo phương thẳng đứng trong 2 phút sau khi dùng thuốc xổ để đảm bảo sự giữ lại hoàn toàn các thuốc xổ ở trong ruột kết. Chuột đối chứng nhận được 50% etanol trong PBS. Chuột được cân trước khi đưa TNBS vào cơ thể và 2 ngày sau khi đưa TNBS vào cơ thể. Sau đó chuột sẽ bị giết. Tình trạng viêm và tổn thương ruột kết được xác định bởi sự giảm cân nặng, số điểm vĩ mô và nồng độ SAA trong huyết thanh.

#### Đánh giá vĩ mô bệnh viêm ruột kết

Ruột kết được thu gom và mở ra theo chiều dọc, hình ảnh được ghi lại bằng máy ảnh kỹ thuật số. Tình trạng viêm và tổn thương ruột kết được xác định theo các tiêu chuẩn Wallace (Morris et al., 1989). Mỗi đoạn ruột kết đều được cho điểm mù. Thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng GraphPad Prism phiên bản 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Thử nghiệm Kruskal-Wallis được sử dụng để phát hiện sự khác biệt đáng

kể giữa các nhóm được bao gồm trong phân tích. Kết quả được tóm tắt theo kết quả trung bình và trong khoảng tứ phân vị.

Đo protein A dạng tinh bột trong huyết tương (serum amyloid protein A - SAA) dưới dạng dấu hiệu viêm toàn thân

Các mẫu máu được thu gom bằng cách đâm vào tim, chống đông và ly tâm trong 10 phút ở 13.000 vòng/phút để tách huyết tương. Nồng độ dạng tinh bột A trong huyết tương (SAA) trong các mẫu huyết tương được đo bằng cách sử dụng kit ELISA của hãng ALPCO (Salem, NH) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. SAA là protein ở giai đoạn cấp tính chỉ báo sự viêm toàn thân ở chuột mà tương quan với mức độ trầm trọng của bệnh viêm ruột kết.

#### Kết quả

*L. reuteri* 6475 bảo vệ chuột chống lại bệnh viêm ruột kết cấp tính gây ra bởi TNBS

Tác dụng chống viêm của *L. reuteri* 6475 được thử nghiệm trong mô hình chuột bị viêm ruột kết cấp tính gây ra bởi TNBS. Các con chuột được nhận *L. reuteri* 6475 bằng ống thông miệng dạ dày mỗi ngày được so sánh với các con chuột nhận đối chứng môi trường. Chuột được thử với PBS thay vì TNBS còn được khảo sát về đối chứng âm viêm ruột kết.

Các hình vẽ Fig.4 đến Fig.6 thể hiện dữ liệu từ hai thử nghiệm độc lập. Đối chứng âm viêm ruột kết nhận PBS thay vì TNBS qua đường trực tràng bị sụt cân rất ít (hoặc thậm trí tăng cân), ít tổn thương ruột kết và nồng độ SAA trong huyết thanh thấp. Chuột bị viêm ruột kết nhận môi trường MRS và TNBS/ETOH tiến triển viêm ruột kết nặng đặc trưng bởi sự sụt cân mạnh, loét kết hợp với viêm ở ruột kết, các vị trí tổn thương lớn lan rộng hơn 1cm và nồng độ SAA trong huyết thanh tăng đáng kể. Ống thông miệng dạ dày cùng với *L. reuteri* 6475 làm giảm đáng kể tình trạng sụt cân, viêm nhiễm rộng trong ruột kết và nồng độ SAA trong huyết thanh, cho thấy rằng *L. reuteri* 6475 có tác dụng làm giảm đáng kể bệnh viêm ruột kết.

Thế đột biến *hdcA* làm giảm khả năng làm thuyên giảm bệnh viêm ruột kết.

Sử dụng mô hình chuột tương tự, các tác giả sáng chế đã khảo sát xem gen *hdcA*, là gen mã hóa histidin decarboxylaza có cần cho tác dụng chống viêm của *L. reuteri* 6475

hay không. Các con chuột cái 8 tuần tuổi BLAB/c được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm lần lượt được nhận *L. reuteri* 6475 kiểu dại hoặc thể đột biến *hdcA* hoặc môi trường MRS. Fig.7 và Fig.8 thể hiện dữ liệu từ hai thử nghiệm độc lập. Một lần nữa, ống thông miệng dạ dày với *L. reuteri* 6475 làm giảm đáng kể tình trạng sụt cân và tổn thương ruột kết khi so với nhóm nhận đối chứng môi trường. Chuột nhận thể đột biến *hdcA* làm tăng đáng kể tình trạng sụt cân và sự viêm nhiễm diện rộng ở ruột kết khi so với chuột nhận vi khuẩn kiểu dại, cho thấy rằng thể đột biến *hdcA* làm giảm khả năng làm thuyên giảm bệnh viêm ruột kết.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Phương pháp chọn lọc chủng lợi khuẩn sinh axit lactic để sử dụng trong việc sản sinh cục bộ histamin ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm bước sàng lọc vi khuẩn có operon histidin hoạt động và chọn lọc chủng vi khuẩn có operon histidin hoạt động và có khả năng sản sinh histamin.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chủng vi khuẩn này được chọn lọc dựa vào khả năng sản sinh histamin ở nồng độ lớn hơn 250pg/mL.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó chủng vi khuẩn này là *Lactobacillus reuteri*.

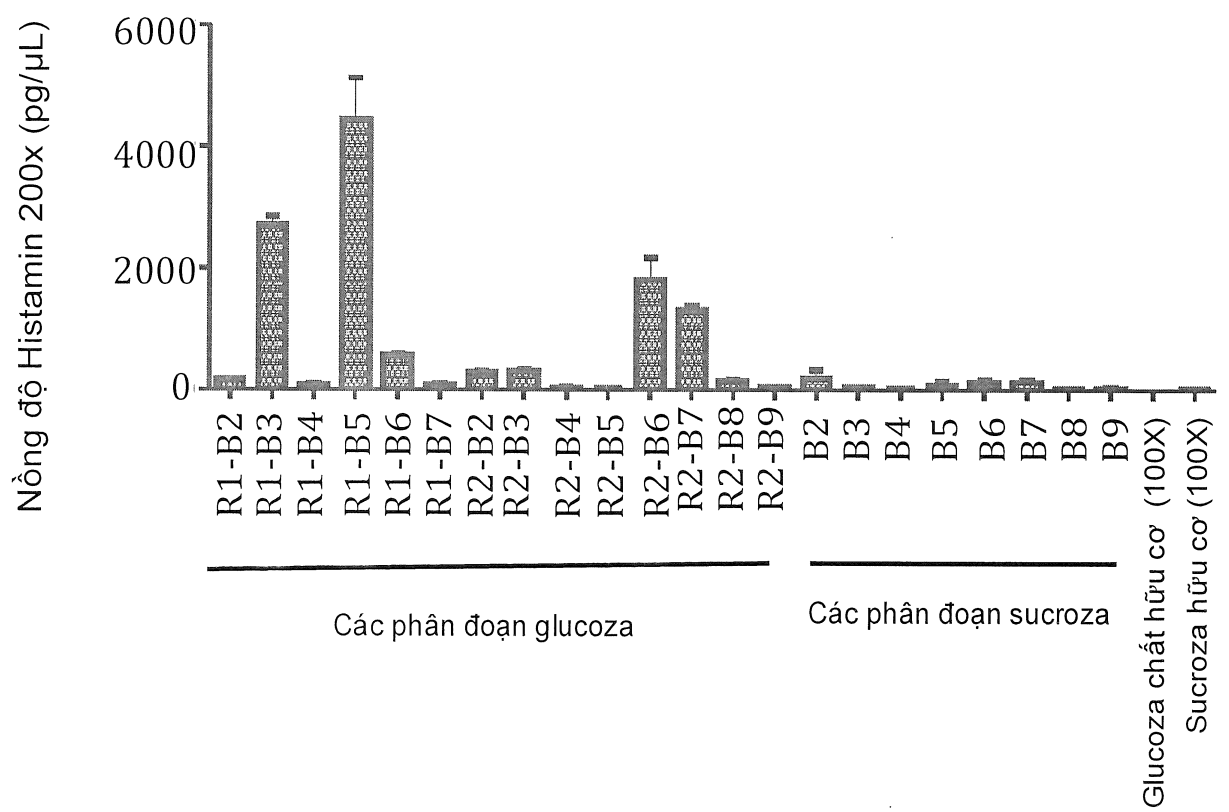


Fig.1

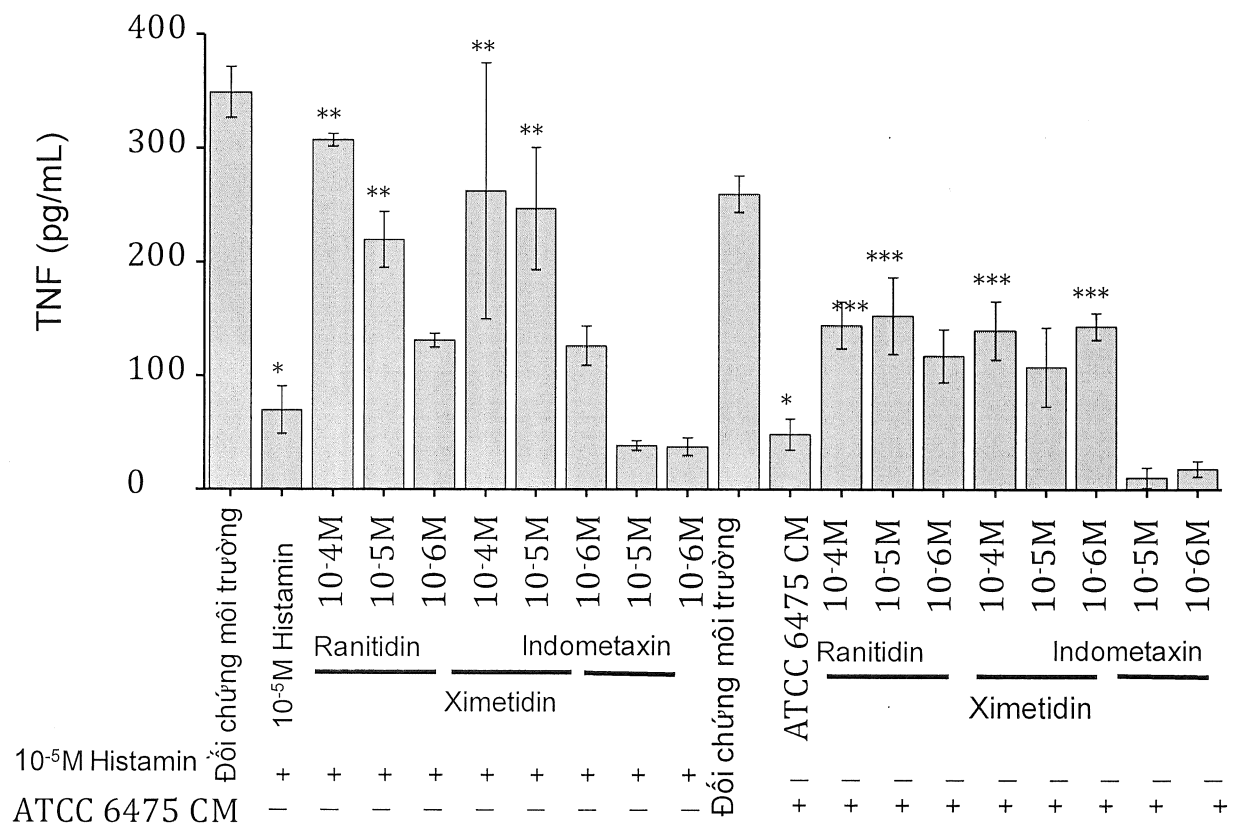
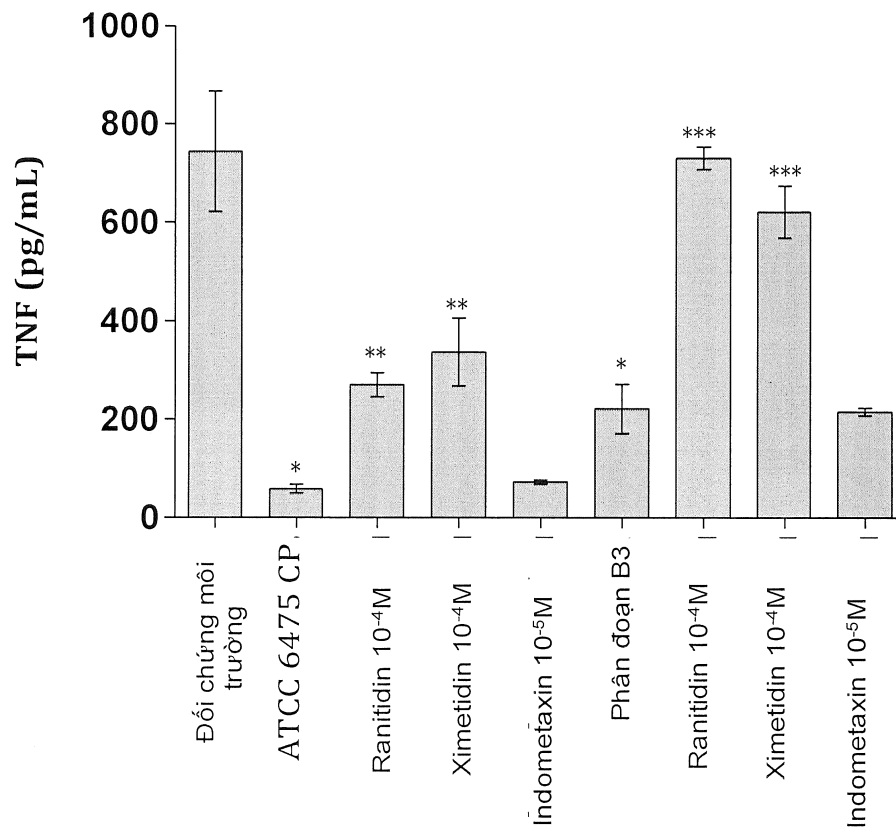


Fig.2A

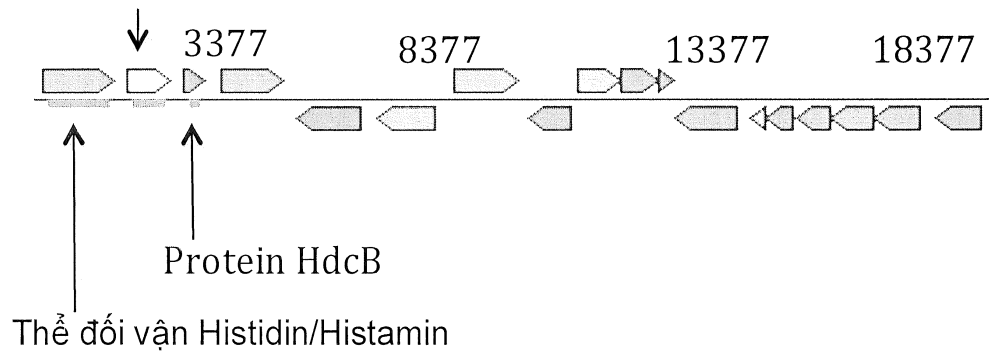


|                                |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nước rửa viên tế bào ATCC 6475 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| ATCC 6475 Phân đoạn B3         | - | - | - | - | + | + | + | + |

Fig.2B

A

Histidin decarboxylaza pyruvoyl typ A



B

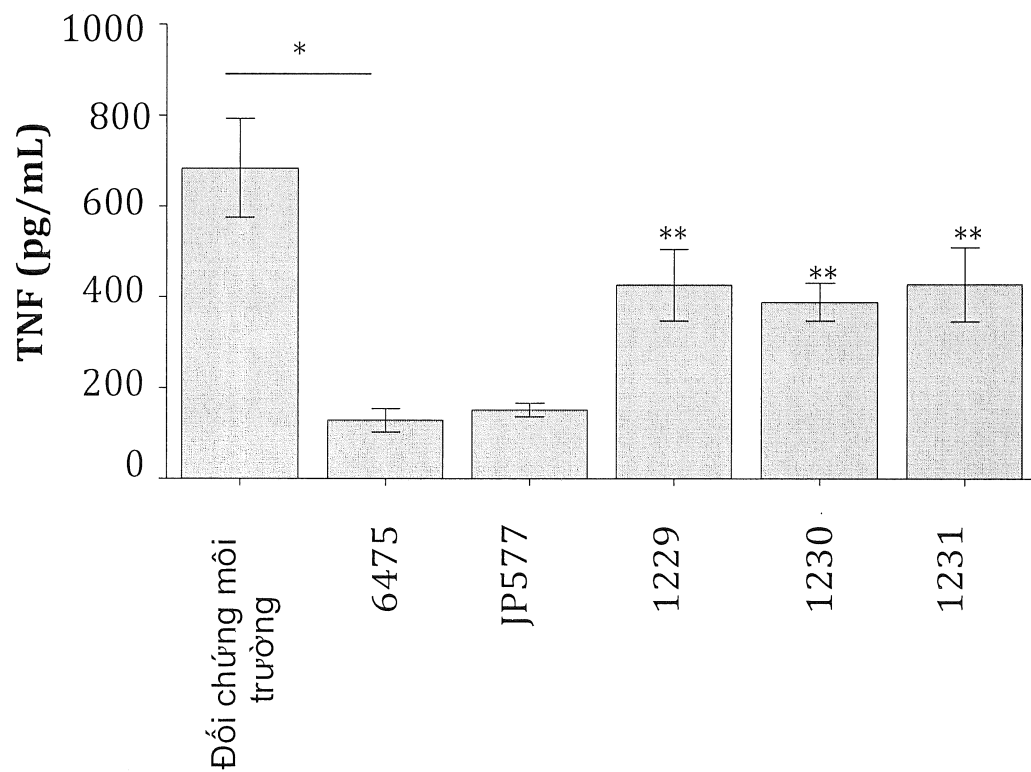


Fig.3

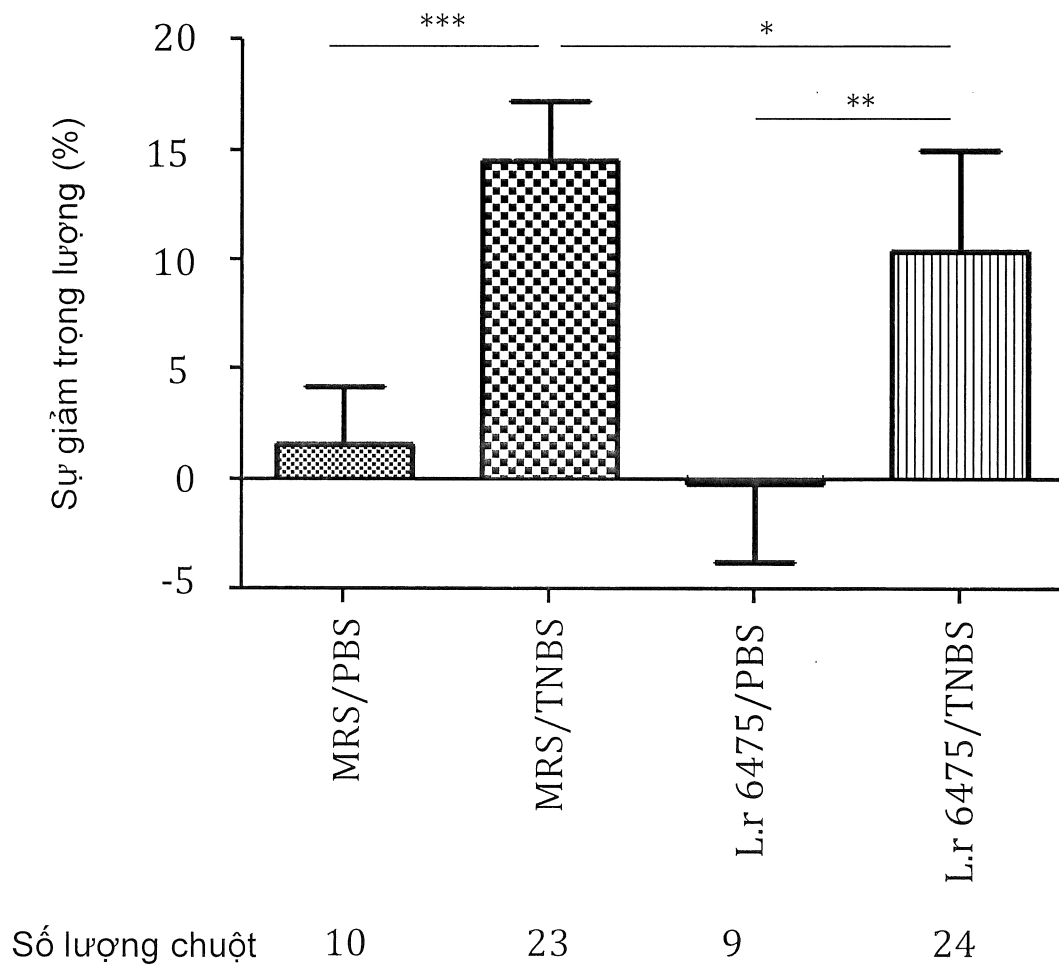


Fig.4

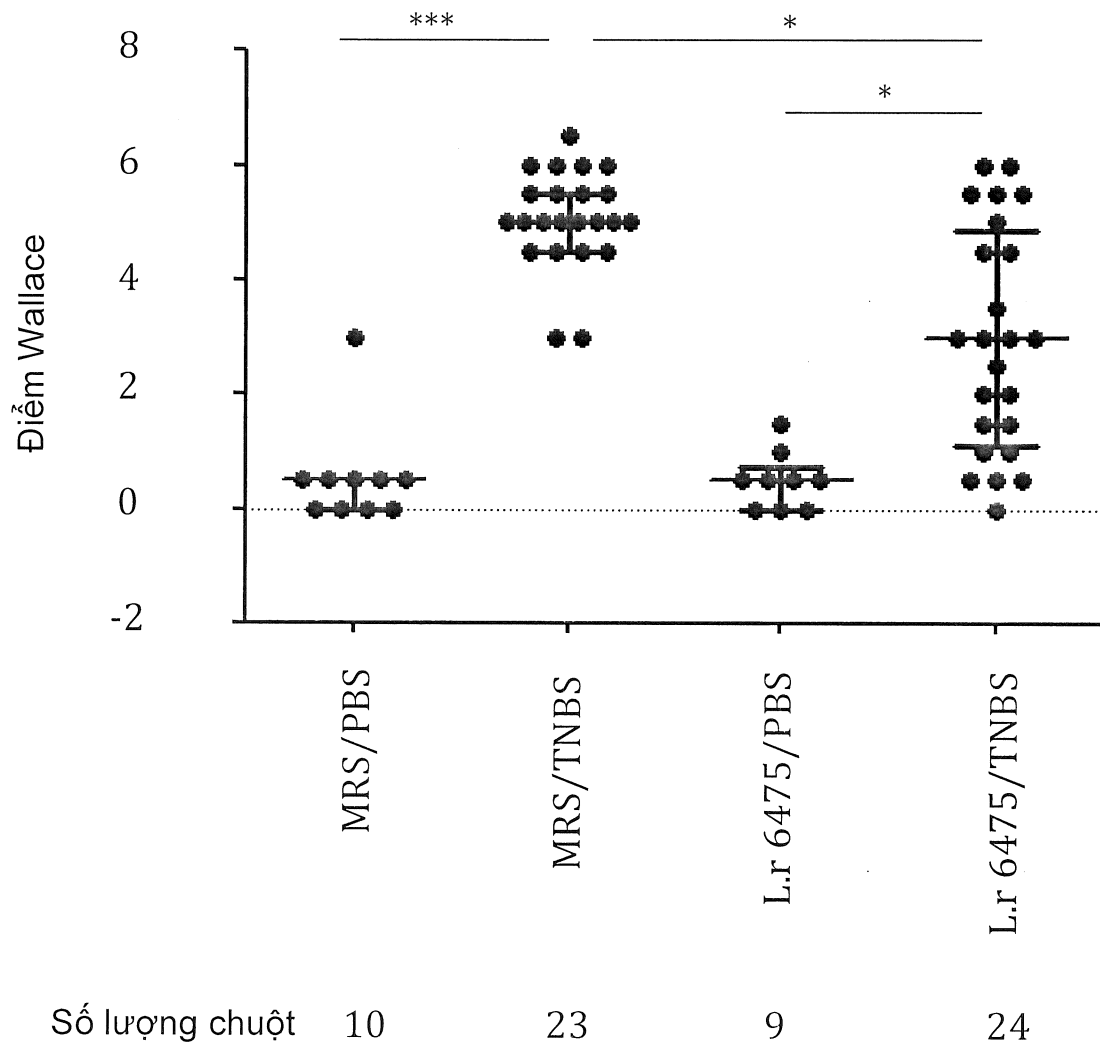


Fig.5

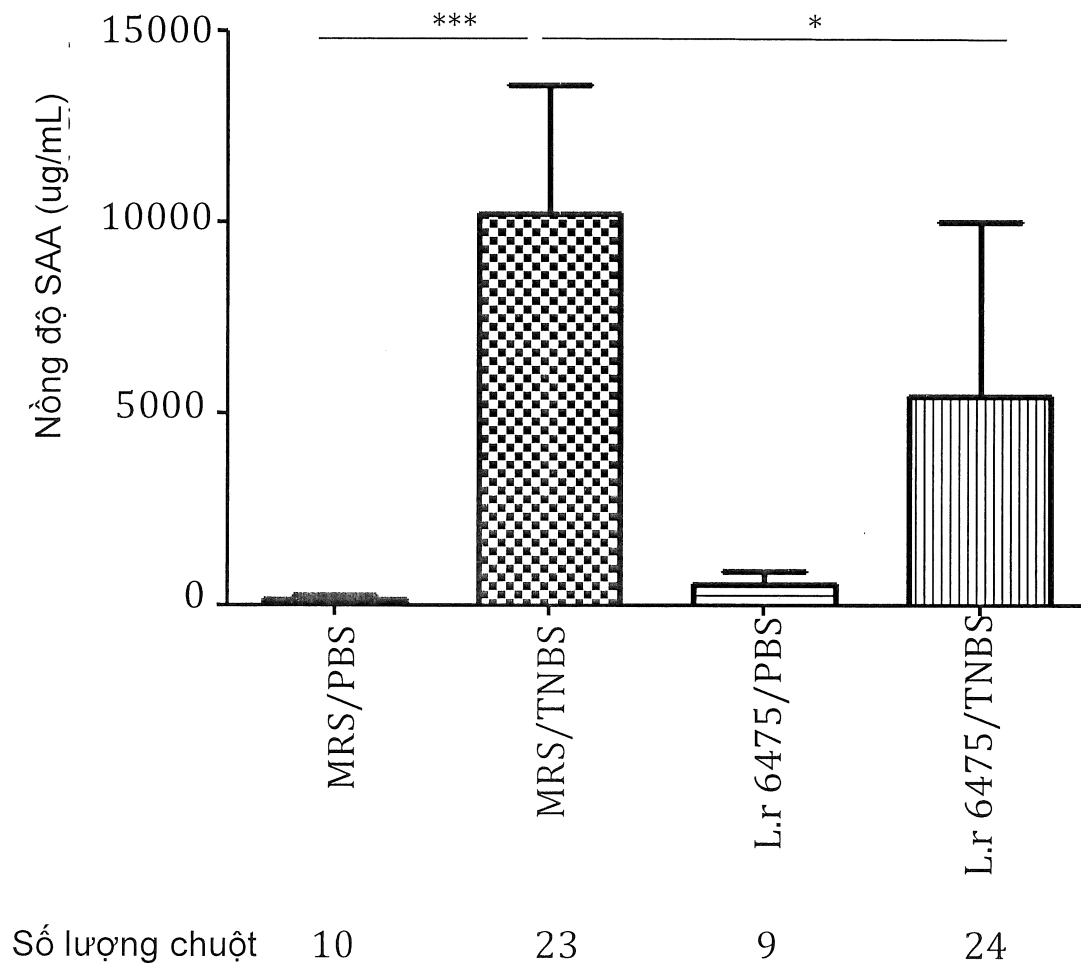


Fig.6

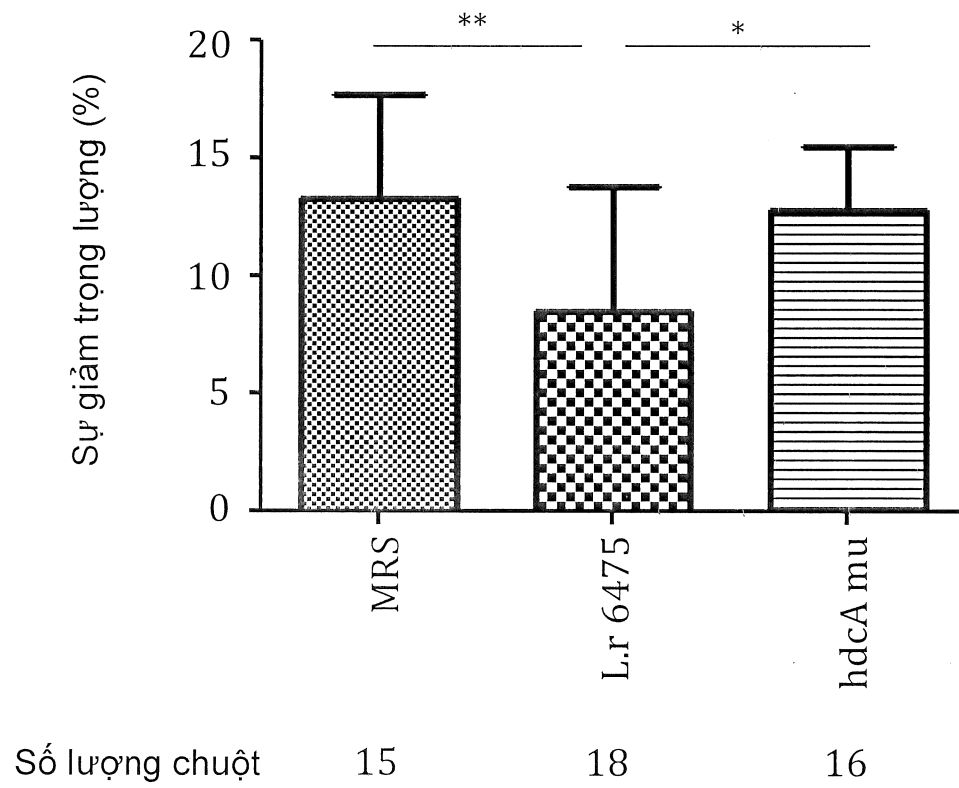


Fig.7

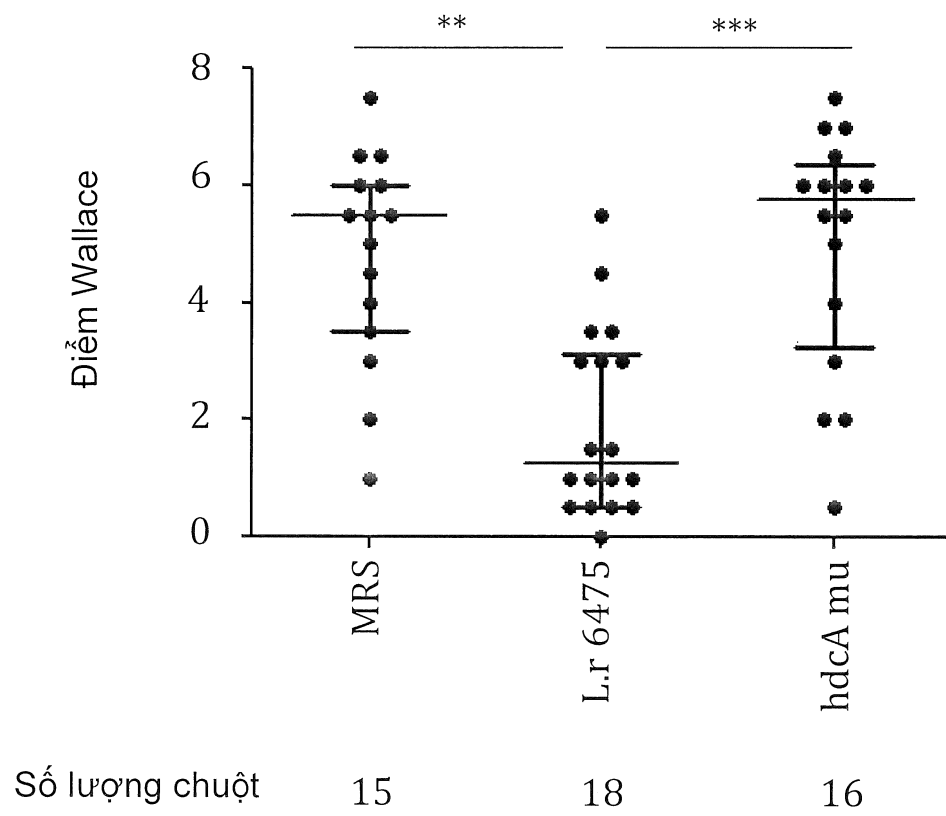


Fig.8