



(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)



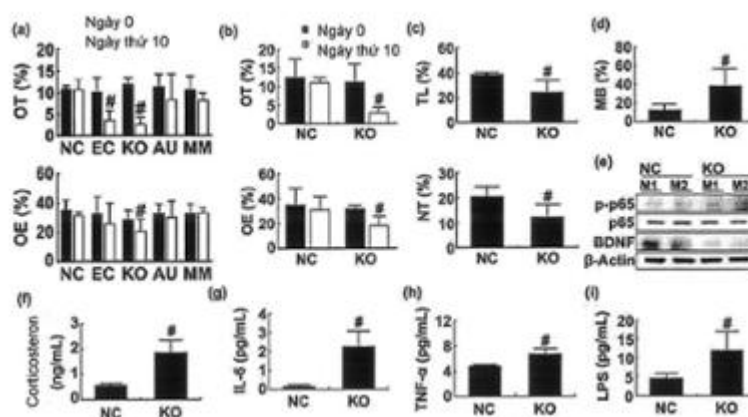
1-0037574

(51)^{2020.01} C12N 1/20; A61K 35/745; A61P 25/00; (13) B
A23L 33/135; A61K 35/747

- (21) 1-2020-02190 (22) 28/09/2018
(86) PCT/KR2018/011607 28/09/2018 (87) WO2019/066599 04/04/2019
(30) 10-2017-0127422 29/09/2017 KR
(45) 27/11/2023 428 (43) 27/07/2020 388ASC
(73) 1. UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE
UNIVERSITY (KR)
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu Yongin-Si Gyeonggi-do 17104 Republic of
Korea
2. NAVIPHARM CO, LTD (KR)
5, Jangan-ro 448beon-gil, Jangan-gu Suwon-si Gyeonggi-do 16209, Republic of
Korea
(72) KIM, Dong-Hyun (KR); HAN, Myung Joo (KR).
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) VI KHUẨN LACTIC, DƯỢC PHẨM VÀ THỰC PHẨM CHỨC NĂNG CHỨA VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vi khuẩn lactic, và cụ thể hơn là đề cập đến dược phẩm bao gồm vi khuẩn lactic *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P) hoặc *Bifidobacterium adolescentis* NK98 (KCCM12297P), có tác dụng phòng và điều trị bệnh tâm thần hoặc bệnh viêm. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và thực phẩm chức năng chứa vi khuẩn này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi khuẩn lactic *Lactobacillus reuteri* và *Bifidobacterium adolescentis*, và cụ thể hơn là đề cập đến chế phẩm bao gồm các vi khuẩn lactic có ích trong phòng và điều trị bệnh về tâm thần hoặc bệnh viêm nhiễm. Sáng chế cũng đề cập đến đến được phẩm và thực phẩm chức năng chứa vi khuẩn lactic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong xã hội hiện nay, các bệnh về tâm thần (còn được gọi là rối loạn thần kinh) bao gồm lo âu, trầm cảm, tâm thần phân liệt, v.v... đang gia tăng do sự gia tăng nhanh chóng của tình trạng căng thẳng v.v... Cụ thể là, xu hướng ngày càng nhiều bệnh nhân bị rối loạn tâm thần như trầm cảm, lo lắng, và tương tự do các nguyên nhân khác nhau như xã hội và cấu trúc trong thời hiện đại của chúng ta tràn ngập chủ nghĩa cá nhân.

Trong trường hợp nghiêm trọng, bệnh nhân bị rối loạn tâm thần có thể tiến triển đến hành vi tự tử. Cụ thể là, kết quả một số báo cáo cho thấy rằng, một nửa số bệnh nhân trầm cảm có ý định tự tử. Trong thực tế, 10-15% trong số bệnh nhân đó thực sự tự tử.

Rối loạn tâm thần chưa có tiêu chí rõ ràng và khách quan để đánh giá, do đó các triệu chứng có thể thay đổi tùy thuộc vào bệnh nhân tương ứng. Nếu có nghi ngờ bất kỳ về rối loạn tâm thần, phác đồ điều trị cần tuân thủ yêu cầu theo chẩn đoán và kiểm tra chính xác. Tuy nhiên, thực tế là việc điều trị đúng cách không được thực hiện do xã hội có thái độ tiêu cực đối với các phương pháp điều trị tại bệnh viện đối với các rối loạn tâm thần. Ngoài ra, các loại thuốc như thuốc chống trầm cảm, v.v... được sử dụng để điều trị rối loạn tâm thần không cho thấy hiệu quả điều trị thỏa đáng và có thể gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng như bệnh tim mạch, thúc đẩy ý định tự tử và tương tự, do đó các loại thuốc này bị hạn chế sử dụng.

Mặt khác, do kết quả của nghiên cứu liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm tự nhiên, được phẩm để điều trị rối loạn tâm thần bằng chất chiết *Fomes fomentarius* và chất chiết *Litospermum erythrorhizon* được bộc lộ trong đơn sáng chế Hàn Quốc có số công bố 10-

2017-0061457, nhưng vẫn cần các nghiên cứu tiếp theo về vi khuẩn lactic hữu hiệu có khả năng điều trị rối loạn tâm thần.

Trên cơ sở đó, các tác giả sáng chế đã xác định rằng các rối loạn tâm thần có thể được chẩn đoán do sự thay đổi của hệ vi khuẩn đường ruột, trong khi nghiên cứu tác nhân phòng và điều trị các rối loạn tâm thần, và xác định thêm rằng các vi khuẩn lactic được phân lập từ phân người và phân chuột cho thấy hiệu quả ức chế yếu tố gây bệnh thoái hóa thần kinh, làm giảm các hành vi lo lắng và trầm cảm và tương tự, như vậy vi khuẩn lactic có thể được sử dụng một cách hữu ích trong phòng hoặc điều trị các bệnh về tâm thần, cụ thể là các bệnh thoái hóa thần kinh và rối loạn tâm thần, do đó hoàn thành sáng chế.

Tài liệu tham khảo

Tài liệu sáng chế

Tài liệu bằng sáng chế 1: Sáng chế Hàn Quốc có số công bố 10-2017-0061457

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất vi khuẩn lactic.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất được phẩm bao gồm vi khuẩn lactic để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất được phẩm bao gồm vi khuẩn lactic để phòng hoặc điều trị một bệnh viêm nhiễm.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất được phẩm để chẩn đoán bệnh về tâm thần, bao gồm chế phẩm để đo mức vi sinh vật đường ruột.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh về tâm thần, bao gồm: bước đo mức vi sinh vật đường ruột từ phân của một cá nhân nghi ngờ mắc bệnh về tâm thần; và một bước so sánh mức vi sinh vật đường ruột nói trên với mức vi sinh vật đường ruột trong phân của nhóm đối chứng không bị bệnh về tâm thần.

Theo một khía cạnh, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất vi khuẩn lactic.

Cụ thể là, theo sáng chế, vi khuẩn lactic có thể là *Lactobacillus reuteri* NK33 (tổ chức lưu ký: Trung tâm nuôi cấy Vi sinh vật Hàn Quốc (KCCM), ngày gửi: 04 tháng 8 năm 2017, số truy nhập: KCCM12090P) hoặc *Bifidobium* NK98 (tổ chức lưu ký: KCCM, ngày gửi: 03 tháng 8 năm 2018, số truy nhập: KCCM12297P).

Lactobacillus reuteri (*L. reuteri*) NK33 hoặc *Bifidobacterium adolescentis* (*B. adolescentis*) NK98 theo sáng chế được đặc trưng bởi vi khuẩn lactic được phân lập và xác định từ phân người hoặc chuột.

Trình tự rADN 16S để nhận dạng và phân loại *L. reuteri* NK33 theo sáng chế giống như trình tự định danh số (ID SEQ NO:) 1 được đính kèm trong bản mô tả này. Do đó, *L. reuteri* NK33 theo sáng chế có thể bao gồm rADN 16S của SEQ ID NO: 1. Kết quả phân tích trình tự rADN 16S của ID SEQ NO: 1, trình tự này tương đồng 99% với trình tự của các chủng *L. reuteri* đã biết, do đó cho thấy mối quan hệ phát sinh phân tử cao nhất với *L. reuteri*. Do đó, vi khuẩn lactic nói trên được xác định là *L. reuteri*, được đặt tên là *L. reuteri* NK33, và được gửi đến KCCM vào ngày 04 tháng 8 năm 2017 (số truy nhập: KCCM12090P).

L. reuteri NK33 theo sáng chế là vi khuẩn gram dương và loại tế bào của chúng là dạng hình que. Cụ thể hơn là, các đặc điểm sinh lý của *L. reuteri* NK33 có thể được phân tích theo phương pháp thông thường trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, trong đó các kết quả được trình bày trên bảng 3 sau đây. Cụ thể là, *L. reuteri* NK33 có thể sử dụng nguồn cacbon được chọn từ nhóm bao gồm L-arabinoza, D-riboza, D-xyloza, D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza, D-manoza, manitol, sorbitol, N-axetyl-glucosamin, amygdalin, arbutin, esculin, salixin, xenlobioza, maltoza, lactoza, melibioza, sucroza, trehaloza, melezitoza, rafinoza, gentiobioza, D-turanoza và gluconat.

Trình tự rADN 16S để nhận dạng và phân loại *B. adolescentis* NK98 theo sáng chế giống như ID SEQ NO: 38 được đính kèm ở đây. Do đó, *B. adolescentis* NK98 theo sáng chế có thể bao gồm rADN 16S của SEQ ID NO: 38. Kết quả phân tích trình tự rADN 16S của SEQ ID NO: 38, trình tự này tương đồng 98% so với chủng *B. adolescentis* đã biết, do đó cho thấy mối quan hệ phát sinh phân tử cao nhất với *B. adolescentis*. Do đó, vi khuẩn lactic nói trên được xác định là *B. adolescentis*, được đặt tên là *B. adolescentis* NK98, và được gửi đến KCCM vào ngày 03 tháng 8 năm 2018 (số truy nhập: KCCM12297P).

Các đặc điểm sinh lý của *B. adolescentis* NK98 theo sáng chế có thể được phân tích theo phương pháp thông thường trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, trong đó kết quả được trình bày trên bảng sau 4. Cụ thể là, *B. adolescentis* NK98 có thể sử dụng nguồn cacbon được chọn từ nhóm bao gồm D-glucoza, D-manitol, D-lactoza, D-saccharoza, D-maltoza, salixin, D-xyloza, L-arabinoza, gelatin, esculin sắt xitrat, D-xenlobioza, D-rafinoza và D-trehaloza.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm vi khuẩn lactic để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần.

Theo sáng chế, vi khuẩn lactic có thể là *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* NK98 hoặc hỗn hợp của chúng.

L. reuteri NK33 và *B. adolescentis* NK98, theo sáng chế giống như mô tả ở trên.

Cụ thể là, vi khuẩn lactic có trong được phẩm theo sáng chế có thể là tế bào vi khuẩn sống, tế bào vi khuẩn chết, sản phẩm nuôi cấy, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết từ chúng, nhưng loại bất kỳ của vi khuẩn lactic cũng có thể được sử dụng mà không giới hạn, miễn là có thể đạt được hiệu quả phòng hoặc điều trị đối với bệnh về tâm thần.

Theo sáng chế, thuật ngữ “sản phẩm nuôi cấy” có nghĩa là sản phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn lactic trong môi trường lỏng hoặc môi trường rắn, và là khái niệm bao gồm vi khuẩn lactic theo sáng chế.

Bệnh về tâm thần theo sáng chế có thể là bệnh thoái hóa thần kinh hoặc rối loạn tâm thần.

Cụ thể là, bệnh về tâm thần theo sáng chế có thể là rối loạn tâm thần, và rối loạn tâm thần có thể là một hoặc nhiều chứng rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm lo lắng, trầm cảm, rối loạn tâm trạng, mất ngủ, rối loạn ảo giác, rối loạn ám ảnh, đau nửa đầu, căng thẳng, rối loạn trí nhớ, rối loạn nhận thức và rối loạn chú ý.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, kết quả cho thấy rằng, khi *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 được sử dụng cho mô hình động vật với các hành vi gây căng thẳng, lo lắng và trầm cảm do căng thẳng gây ra đã giảm đáng kể; hoạt tính của NF- κ B bị ức chế ở vùng hải mã của mô hình động vật bị căng thẳng gây ra; biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não tăng lên; và lượng corticosteron, IL-6, TNF- α và lipopolysaccharit (LPS), là các thông số căng thẳng trong máu, được làm giảm. Kết quả cũng

cho phép xác định rằng được phẩm chứa vi khuẩn lactic có thể được sử dụng một cách hữu ích trong phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, cụ thể là rối loạn tâm thần.

Cụ thể là, bệnh về tâm thần theo sáng chế có thể là bệnh thoái hóa thần kinh, trong đó bệnh thoái hóa thần kinh có thể là bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh thoái hóa tiểu não, hội chứng Tourette, mất điều hòa vận động Friedrich, bệnh Machado-Joseph, mất trí nhớ, loạn trương lực cơ, liệt trên nhân tiến triển, và sa sút trí tuệ trán-thái dương.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, đã xác định được rằng, khi các tế bào thần kinh được xử lý bằng vi khuẩn lactic cùng với một loại hormon gây căng thẳng corticosteron, hoạt tính của NF- κ B (vốn là chất gây ra các bệnh thoái hóa thần kinh như Alzheimer) bị ức chế, và sự biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF), vốn giảm ở tuổi già, mất trí nhớ và tương tự, tăng lên đồng thời (Bảng 5 và 6). Kết quả cũng cho phép xác định rằng được phẩm chứa vi khuẩn lactic nói trên có thể được sử dụng một cách hữu ích trong phòng và điều trị bệnh về tâm thần, cụ thể là bệnh thoái hóa thần kinh.

Ngoài ra, theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, đã xác định được rằng, khi sử dụng đồng thời *L. reuteri* NK33 và *B. adolescentis* NK98, hiệu quả cải thiện bệnh về tâm thần, cụ thể là hiệu quả giảm căng thẳng, tăng đáng kể so với từng nhóm chỉ dùng vi khuẩn lactic nói trên (Bảng 20).

Theo sáng chế, được phẩm có thể bao gồm *B. adolescentis* IM38 KCCM11807P.

B. adolescentis IM38 KCCM11807P là vi khuẩn được đề xuất trong sáng chế Hàn Quốc có số công bố 10-2017-0090359, và có thể dễ dàng có sẵn dựa vào sáng chế Hàn Quốc có số công bố 10-2017-0090359.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, đã xác định được rằng, khi *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 và *B. adolescentis* IM38 được sử dụng đồng thời cho mô hình động vật bị căng thẳng, lo lắng và hành vi trầm cảm do căng thẳng gây ra, và lượng corticosteron, vốn là thông số căng thẳng trong máu, được làm giảm.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất được phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm, được phẩm bao gồm *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* NK98 hoặc hỗn hợp của chúng.

L. reuteri NK33 và *B. adolescentis* NK98 theo sáng chế giống như mô tả ở trên.

Cụ thể là, vi khuẩn lactic có trong được phẩm theo sáng chế có thể là tế bào vi khuẩn sống, tế bào vi khuẩn chết, sản phẩm nuôi cấy, sản phẩm nghiền hoặc chất chiết từ chúng, nhưng loại bất kỳ từ vi khuẩn lactic đều có thể được sử dụng mà không giới hạn, miễn là có thể đạt được hiệu quả phòng hoặc điều trị đối với bệnh viêm.

Theo sáng chế, thuật ngữ “sản phẩm nuôi cấy” có nghĩa là sản phẩm thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn lactic trong môi trường lỏng hoặc môi trường rắn, và là khái niệm bao gồm vi khuẩn lactic theo sáng chế.

Bệnh viêm theo sáng chế có thể là bệnh được chọn từ nhóm bao gồm viêm khớp, bệnh gút, viêm gan, hen suyễn, béo phì, viêm giác mạc, viêm dạ dày, viêm ruột, viêm thận, viêm đại tràng, bệnh lao, viêm phế quản, viêm màng phổi, viêm phúc mạc, viêm cột sống, viêm tụy, đau viêm, viêm niệu đạo, viêm bàng quang, viêm âm đạo, xơ cứng động mạch, nhiễm trùng máu, bỏng, viêm da, viêm nha chu và viêm lợi.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, đã xác định được rằng, khi đại thực bào được phân lập từ chuột được xử lý bằng vi khuẩn lactic nói trên cùng với lipopolysaccharit (LPS), chất gây phản ứng viêm, phản ứng viêm bị ức chế đáng kể (Bảng 5 và 6). Kết quả cũng cho phép xác định rằng được phẩm chứa vi khuẩn lactic nói trên theo sáng chế có thể được sử dụng một cách hữu ích trong phòng và điều trị bệnh viêm nhiễm.

Cụ thể là, bệnh viêm có thể là viêm đại tràng.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, đã xác định được rằng, khi *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 được sử dụng cho một mô hình động vật bị viêm đại tràng do căng thẳng, chiều dài đại tràng (là chỉ số viêm đại tràng) được phục hồi ở mức bình thường, và lượng myeloperoxidaza, COX-2 và iNOS (là các thông số viêm đại tràng) đã giảm và hoạt động của TNF- α cũng giảm (Fig.15 và Bảng 15). Kết quả cũng cho phép xác định rằng được phẩm bao gồm *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 có thể được sử dụng một cách hữu ích trong phòng và điều trị bệnh viêm, cụ thể là viêm đại tràng.

Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, hoặc dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh viêm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều dược phẩm bằng các phương pháp phổ biến đã được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật, thành phần hoạt tính của dược phẩm có thể được cung cấp nhờ quá trình giải phóng nhanh, chậm, hoặc kéo dài sau khi được sử dụng cho động vật có vú. Trong bào chế dạng liều, dược phẩm theo sáng chế có thể còn bao gồm thêm chất mang dược dụng, trong đó chất mang không ức chế hoạt tính của vi khuẩn lactic.

Chất mang dược dụng có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, những loại được sử dụng thông thường, cụ thể như, lactoza, dextroza, sucroza, sorbitol, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, nhựa cây keo, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silicat, xenluloza, methyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, polyvinyl pyrolidon, nước, methyl hydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, bột khoáng (talc), magie stearat, dầu khoáng và tương tự. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất pha loãng hoặc tá dược như chất độn, chất bổ sung, chất kết dính, chất làm ẩm, chất phân rã, chất hoạt động bề mặt, v.v..., và các chất phụ gia dược dụng khác.

Liều của dược phẩm theo sáng chế cần phải là lượng có tác dụng dược lý. Lượng “có tác dụng dược lý” có nghĩa là lượng đủ để phòng hoặc điều trị các bệnh về tâm thần hoặc bệnh viêm nhiễm với tỷ lệ lợi ích/rủi ro hợp lý có thể áp dụng cho điều trị y tế. Mức liều hiệu quả có thể được lựa chọn khác nhau bởi người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật theo các yếu tố như phương pháp công thức hóa, tình trạng và cân nặng của bệnh nhân, giới tính, tuổi và mức độ bệnh của bệnh nhân, dạng thuốc, đường dùng thuốc và thời gian, tốc độ bài tiết, độ nhạy phản ứng, v.v... Lượng hiệu quả có thể thay đổi tùy theo cách điều trị, sử dụng tá dược và khả năng được sử dụng với các thuốc khác, khi được xác định bởi người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Tuy nhiên, trong trường hợp chế phẩm dạng uống, để đạt được hiệu quả tốt hơn, dược phẩm theo sáng chế thường có thể được sử dụng cho người lớn với lượng 0,0001-100 mg/kg thể trọng mỗi ngày, tốt nhất là 0,001-100 mg/kg thể trọng mỗi ngày. Khi chế phẩm được sử dụng như được trình bày ở trên, *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 theo sáng chế có thể được sử dụng với số lượng 1×10^2 CFU/60kg đến 1×10^{11} CFU/60kg mỗi ngày. Liều hàng ngày có thể được sử dụng một lần một ngày, hoặc chia thành nhiều lần một ngày. Liều lượng nói trên không giới hạn phạm vi của sáng chế theo khía cạnh bất kỳ.

Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, hoặc dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh viêm theo sáng chế có thể được sử dụng cho động vật có vú như chuột, gia súc, người, v.v... thông qua các con đường khác nhau. Cụ thể là, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng đường uống hoặc tiêm tĩnh mạch (cụ thể là, sử dụng hoặc tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da hoặc tiêm trong màng bụng), nhưng tốt nhất có thể dùng qua đường uống. Dạng bào chế rắn để uống có thể bao gồm dạng bột, hạt, viên nén, viên nang, viên nang mềm, thuốc viên, v.v... Dạng bào chế lỏng để uống có thể bao gồm hỗn dịch, dịch lỏng, nhũ tương, xi-rô, dạng xịt, v.v..., nhưng cũng có thể bao gồm các tá dược khác nhau, cụ thể như, chất làm ẩm, chất tạo ngọt, chất tạo hương vị, chất bảo quản, v.v... ngoài nước và parafin lỏng, các chất pha loãng đơn giản thường được sử dụng. Dạng bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được sử dụng bằng cách được công thức hóa thành dạng liều để sử dụng bên ngoài và dạng liều vô trùng tiêm được như dung dịch vô trùng, dịch lỏng, dung môi không chứa nước, hỗn dịch, nhũ tương, thuốc nhỏ mắt, thuốc mỡ tra mắt, xi-rô, thuốc đạn, thuốc xịt, v.v... theo các phương pháp tương ứng thông thường, và tốt nhất là có thể được sử dụng bằng cách bào chế dược phẩm dạng kem, gel, cao dán, thuốc mỡ, thuốc cao, kem dưỡng da, thuốc mỡ tra mắt, thuốc nhỏ mắt, hồ nhão, nhưng không giới hạn. Chế phẩm để dùng tại chỗ có thể là dạng khan hoặc nước tùy thuộc vào một đơn thuốc lâm sàng. Dưới dạng dung môi không chứa nước và chất tạo hỗn dịch, propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ô liu, este tiêm như etyl oleat, v.v... có thể được sử dụng. Dưới dạng chất nền của thuốc đạn ở trên, witepsol, macrogol, tween 61, bơ cacao, dầu laurin, glyxerogelatin, v.v... có thể được sử dụng.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, bao gồm một bước sử dụng *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* NK98 hoặc hỗn hợp của chúng cho đối tượng.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp để phòng hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm, bao gồm một bước sử dụng *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* NK98 hoặc hỗn hợp của chúng cho đối tượng.

Các thuật ngữ “*L. reuteri* NK33”, “*Bifidobacterium adolescentis* NK98”, “sử dụng”, “bệnh về tâm thần”, “bệnh viêm” và tương tự theo sáng chế giống như được mô tả ở trên.

Đối tượng là động vật, và có thể điển hình là động vật có vú, trong đó việc điều trị bằng cách sử dụng vi khuẩn lactic có thể cho thấy hiệu quả có lợi. Ví dụ thích hợp về đối

tượng có thể bao gồm các loài linh trưởng như người, cũng như chuột, khỉ, chó, mèo, bò, ngựa, lợn, cừu hoặc dê. Ngoài ra, đối tượng cũng có thể bao gồm tất cả các cá nhân có triệu chứng của bệnh về tâm thần hoặc bệnh viêm, hoặc có nguy cơ có triệu chứng đó.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng để phòng hoặc cải thiện bệnh về tâm thần, thực phẩm bao gồm *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* NK98 hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu trên, sáng chế đề xuất thực phẩm chức năng để phòng hoặc cải thiện bệnh viêm nhiễm, thực phẩm bao gồm *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* NK98 hoặc hỗn hợp của chúng.

Các thuật ngữ “*L. reuteri* NK33”, “*Bifidobacterium adolescentis* NK98”, “sử dụng”, “bệnh về tâm thần”, “bệnh viêm” và tương tự theo sáng chế giống như được mô tả ở trên.

Thực phẩm chức năng, tập trung vào chức năng điều biến cơ thể của thực phẩm, là thực phẩm được cung cấp giá trị gia tăng bằng phương pháp vật lý, sinh hóa hoặc sinh học, để thực phẩm có thể hoạt động để thể hiện các chức năng của chúng cho mục đích cụ thể. Thành phần của thực phẩm chức năng được thiết kế và chế biến để phát huy đầy đủ chức năng điều chỉnh cơ thể của nó trong cơ thể, có liên quan đến việc bảo vệ cơ thể sống, điều chỉnh nhịp điệu cơ thể, phòng bệnh tật và giúp phục hồi sức khỏe cho đối tượng bị bệnh, và có thể bao gồm phụ gia thực phẩm, được chấp nhận như thực phẩm, chất tạo ngọt hoặc nguyên liệu chức năng.

Trong trường hợp sử dụng *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 theo sáng chế làm thực phẩm chức năng (hoặc phụ gia đồ uống chức năng), vi khuẩn lactic có thể được thêm vào khi chúng được sử dụng cùng với các thành phần thực phẩm hoặc thực phẩm khác, hoặc sử dụng một cách thích hợp theo phương pháp thông thường. Một lượng hỗn hợp của vi khuẩn lactic có thể được xác định một cách thích hợp tùy thuộc vào mục đích sử dụng của chúng (phòng ngừa, cải thiện sức khỏe hoặc điều trị).

Thực phẩm chức năng có thể chứa nhiều chất dinh dưỡng, vitamin, khoáng chất (chất điện giải), các chất tạo hương vị như chất tạo hương tổng hợp, chất tạo hương tự nhiên và các loại tương tự, chất tạo màu và chất tăng cường (phô mai, sôcôla, v.v...), axit pectic và muối của chúng, axit hữu cơ, chất làm đặc keo bảo vệ, chất điều chỉnh pH, chất ổn định, chất bảo quản, glyxerin, rượu, chất bão hòa khí cacbonic được sử dụng trong đồ uống có ga, v.v...

Ngoài ra, thực phẩm chức năng theo sáng chế có thể bao gồm thịt quả để pha chế đồ uống từ trái cây và rau quả. Các thành phần trên có thể được sử dụng độc lập hoặc kết hợp với nhau, và tỷ lệ các chất phụ gia thường được chọn từ khoảng 0,001-50 phần trọng lượng so với tổng trọng lượng của chế phẩm.

Loại thực phẩm chức năng không bị giới hạn cụ thể. Loại thực phẩm có thể bổ sung vi khuẩn lactic bao gồm xúc xích, thịt, bánh mì, sôcôla, đồ ăn nhẹ, kẹo, bánh kẹo, ramen, bánh piza, mì, kẹo mềm, các sản phẩm từ sữa bao gồm kem, súp, đồ uống, trà, đồ uống có lợi cho sức khỏe, đồ uống có cồn, phức hợp vitamin, v.v... Trong trường hợp được pha chế thành đồ uống, thành phần chất lỏng được thêm vào đồ uống ngoài các vi khuẩn lactic có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, chất tạo hương vị, cacbohydrat tự nhiên hoặc tương tự làm thành phần bổ sung giống như có trong đồ uống thông thường. Các cacbohydrat tự nhiên có thể là monosacarit (cụ thể như glucoza, fructoza, v.v...), disacarit (cụ thể như maltoza, sucroza, v.v...) và polysacarit (cụ thể như dextrin, xyclodextrin, v.v...), cũng như đường các loại rượu đường như xylitol, sorbitol, erythritol, v.v...

Theo khía cạnh khác, để đạt được các mục tiêu đã nêu, sáng chế đề xuất được phẩm dùng để chẩn đoán bệnh về tâm thần, bao gồm chế phẩm để đo mức vi sinh vật đường ruột.

Thuật ngữ như “bệnh về tâm thần” theo sáng chế giống như mô tả ở trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ “vi sinh vật đường ruột” là đề cập đến vi sinh vật có trong đường tiêu hóa, cụ thể là vi sinh vật có trong ruột, trong đó vi sinh vật đường ruột có thể là một hoặc nhiều loại vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn (bacteroidetes), xạ khuẩn (actinobacteria), vi khuẩn firmicutes, vi khuẩn bifido (bifidobacteria), trực khuẩn lactic (lactobacilli), các ngành vi khuẩn β -proteobacteria, δ -proteobacteria, γ -proteobacteria, ϵ -proteobacteria và họ vi khuẩn đường ruột (enterobacteriaceae).

Cụ thể là, được phẩm để chẩn đoán theo sáng chế có thể chẩn đoán bệnh về tâm thần, nếu có sự gia tăng mức độ của một hoặc nhiều loại vi khuẩn được lựa chọn từ nhóm bao gồm β -proteobacteria, δ -proteobacteria, γ -proteobacteria, ϵ -proteobacteria và enterobacteriaceae trong số các vi sinh vật đường ruột; được phẩm có thể chẩn đoán bệnh về tâm thần, nếu có sự suy giảm mức độ của một hay nhiều vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm bacteroidetes, actinobacteria, firmicutes, bifidobacteria và lactobacilli trong số các vi sinh vật đường ruột; và được phẩm có thể chẩn đoán bệnh về tâm thần, nếu có sự gia tăng mức độ của một hay

nhiều vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm β -proteobacteria, δ -proteobacteria, γ -proteobacteria, ϵ -proteobacteria và enterobacteriaceae trong số các vi sinh vật đường ruột, nếu có sự suy giảm mức độ của một hay nhiều vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm bacteroidetes, actinobacteria, firmicutes, bifidobacteria và lactobacilli trong số các vi sinh vật đường ruột.

Cụ thể là, enterobacteriaceae có sự gia tăng, có thể là một hoặc nhiều loại vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* và *Morganella morganii*.

Ngoài ra, lactobacilli có sự gia tăng, có thể là một hay nhiều loại vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri*, *L. johnsonii* và *L. rhamnosus* và Bifidobacteria có sự gia tăng có thể là *B. animalis*.

Dược phẩm để chẩn đoán bệnh về tâm thần, được đề xuất theo sáng chế, bao gồm chế phẩm có khả năng đo mức vi sinh vật đường ruột, trong đó sự xuất hiện của bệnh về tâm thần đối với một cá thể có thể được xác định bằng cách đo mức vi sinh vật đường ruột từ phân được lấy từ cá thể, những người cần được xác định về sự xuất hiện của bệnh về tâm thần, bằng các chế phẩm có trong dược phẩm. Cá thể có thể là động vật, tốt nhất là động vật có vú, cụ thể như các loài linh trưởng như người, cũng như chuột, khỉ, chó, mèo, bò, ngựa, lợn, cừu hoặc dê.

Chế phẩm có thể được sử dụng để xác định xem bệnh về tâm thần có xảy ra với cá thể hay không, bằng cách đo mức vi sinh vật đường ruột được phân lập từ phân của cá thể nói trên.

Chế phẩm có khả năng đo mức vi sinh vật đường ruột có thể cụ thể là môi, đầu dò hoặc tương tự, có khả năng đo mức độ gen cụ thể của vi sinh vật đường ruột; có thể là kháng thể, aptame hoặc tương tự, có khả năng đo mức protein được biểu thị từ gen cụ thể; có thể là đoạn môi, đầu dò hoặc tương tự, để phân tích định lượng trình tự rADN 16S của vi sinh vật đường ruột; và có thể là chế phẩm cho phản ứng giải trình tự ADN thế hệ mới bằng phương pháp tổng hợp, không điện di (giải trình tự pyro), v.v... để phân tích định lượng trình tự ADN bộ gen của vi sinh vật đường ruột, nhưng không giới hạn, miễn là chế phẩm có thể được sử dụng để phân tích định lượng vi sinh vật đường ruột phân lập từ phân của cá thể.

Cụ thể là, môi đặc hiệu cho firmicutes, vi sinh vật đường ruột nói trên, có thể là cặp môi bao gồm SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3; môi đặc hiệu cho bacteroidetes có thể là cặp

môi bao gồm SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5; mỗi đặc hiệu cho β -proteobacteria có thể là cặp môi bao gồm SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7; mỗi đặc hiệu cho δ/γ -proteobacteria có thể là cặp môi bao gồm SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9; mỗi đặc hiệu cho ϵ -proteobacteria có thể là cặp môi bao gồm SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11; mỗi đặc hiệu cho actinobacteria có thể là cặp môi bao gồm SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13; và mỗi đặc hiệu cho enterobacteriaceae có thể là cặp môi bao gồm SEQ ID NO: 18 và SEQ ID NO: 19.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, mức vi sinh vật đường ruột được đo bằng cách thực hiện phương pháp giải trình tự pyro bằng chế phẩm dùng cho giải trình tự pyro có chứa đoạn môi được mã hóa SEQ ID NO: 2 đến SEQ ID NO: 19 trên bảng 1 (ví dụ thí nghiệm 3).

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm thêm chế phẩm để đo một lượng lipopolysaccharit (LPS). Cụ thể là, chế phẩm để đo lượng lipopolysaccharit (LPS) nói trên có thể là chế phẩm thường được sử dụng để đo lượng lipopolysaccharit (LPS), cụ thể là chế phẩm có trong bộ xét nghiệm Limulus amoebocyte lysate (LAL), nhưng không giới hạn.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, đã xác định được rằng lượng lipopolysaccharit (LPS) tăng lên do phân tích phân của mô hình động vật bị rối loạn tâm thần gây ra (Fig.1, 2, 7 và 11).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ chẩn đoán bệnh về tâm thần, bao gồm dược phẩm nói trên.

Bộ sản phẩm theo sáng chế có thể bao gồm hộp thu mẫu có khả năng thu thập phân của một cá thể để xác định về sự xuất hiện của bệnh về tâm thần bằng cách sử dụng dược phẩm nói trên; dung dịch đệm để chiết vi sinh vật đường ruột trong phân; phương tiện đo được sử dụng để đo vi sinh vật đường ruột; và tương tự.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh về tâm thần, bao gồm: bước đo mức vi sinh vật đường ruột từ phân được lấy từ cá thể bị nghi ngờ về bệnh về tâm thần; và bước so sánh mức vi sinh vật đường ruột với mức vi sinh vật đường ruột trong phân của một nhóm đối chứng, chứ không phải là của bệnh về tâm thần.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất một phương pháp cung cấp thông tin để chẩn đoán bệnh về tâm thần, bao gồm: một bước đo mức vi sinh vật đường ruột từ phân của một cá nhân nghi

ngờ về bệnh về tâm thần; và một bước so sánh mức vi sinh vật đường ruột nói với mức vi sinh vật đường ruột trong phân của nhóm đối chứng, chứ không phải là trong phân của nhóm người bị bệnh về tâm thần.

Phân có nghĩa là phân được lấy và thu thập từ một cá thể như một mẫu để đo mức vi sinh vật đường ruột.

Cụ thể là, vi sinh vật đường ruột có thể là một hoặc nhiều loại được lựa chọn từ nhóm bao gồm bacteroidetes, actinobacteria, firmicutes, bifidobacteria và lactobacilli, β -proteobacteria, δ -proteobacteria, γ -proteobacteria, ϵ -proteobacteria.

Phương pháp chẩn đoán bệnh về tâm thần hoặc cung cấp thông tin theo sáng chế có thể chẩn đoán liệu bệnh về tâm thần xảy ra hay có nguy cơ xảy ra bằng cách xác định một loại vi sinh vật, trong đó mức độ tăng lên, trong số các vi sinh vật đường ruột nói trên.

Cụ thể là, phương pháp chẩn đoán bệnh về tâm thần hoặc cung cấp thông tin trên đó có thể bao gồm thêm một bước xác định một cá nhân, có mức vi sinh vật đường ruột tăng lên, vì bệnh về tâm thần bằng cách so sánh mức vi sinh vật đường ruột trong phân của một cá nhân nghi ngờ về bệnh về tâm thần với một mức vi sinh vật đường ruột trong phân của nhóm đối chứng, chứ không phải là bệnh về tâm thần.

Các vi sinh vật đường ruột, có mức độ tăng lên, có thể là một hoặc nhiều vi khuẩn được lựa chọn từ nhóm bao gồm β -proteobacteria, δ -proteobacteria, γ -proteobacteria, ϵ -proteobacteria và enterobacteriaceae.

Cụ thể là, enterobacteriaceae có thể là một hay nhiều loại vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *K. oxytoca*, *E. coli* và *M. morganii*.

Ngoài ra, phương pháp chẩn đoán bệnh về tâm thần hoặc cung cấp thông tin theo sáng chế có thể chẩn đoán liệu bệnh về tâm thần xảy ra hay có nguy cơ xảy ra bằng cách xác định vi sinh vật có mức độ giảm, trong số các vi sinh vật đường ruột nói trên.

Thuật ngữ như “bệnh về tâm thần”, v.v..., theo sáng chế giống như mô tả ở trên.

Cụ thể là, phương pháp chẩn đoán bệnh về tâm thần hoặc cung cấp thông tin có thể bao gồm thêm bước xác định một cá thể, có mức vi sinh vật đường ruột giảm vì bệnh về tâm thần, bằng cách so sánh mức vi sinh vật đường ruột trong phân của cá thể nghi ngờ bị bệnh

về tâm thần với mức vi sinh vật đường ruột trong phân của nhóm đối chứng, mà không phải là nhóm bệnh nhân tâm thần.

Các vi sinh vật đường ruột, có mức độ giảm, có thể là một hay nhiều loại vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm bacteroidetes, actinobacteria, firmicutes, bifidobacteria và lactobacilli.

Ngoài ra, lactobacilli có thể là một hay nhiều loại vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri*, *L. johnsonii* và *L. rhamnosus*, và Bifidobacteria có thể là *B. Animalis*.

Theo phương án thực hiện mẫu của sáng chế, do kết quả của việc xác định sự thay đổi trong hệ vi khuẩn đường ruột bằng cách sử dụng phân được lấy từ mô hình động vật bị gây căng thẳng, cụ thể như căng thẳng do bất động, căng thẳng do kháng sinh hoặc tương tự, kết quả xác định cho thấy rằng mức β -proteobacteria, δ -proteobacteria, γ -proteobacteria, ϵ -proteobacteria và enterobacteriaceae tăng lên, và mức bacteroidetes, actinobacteria, firmicutes, bifidobacteria và lactobacilli giảm xuống so với mô hình động vật không bị căng thẳng (Fig.2, 6, 8, 10 và 12). Cụ thể, kết quả xác định cho thấy rằng, các vi khuẩn enterobacteriaceae cụ thể có mức tăng là *K. oxytoca*, *E. coli* và *M. morganii*; các vi khuẩn lactobacilli cụ thể có mức giảm là *L. reuteri*, *L. johnsonii* và *L. rhamnosus*; và vi khuẩn bifidobacteria cụ thể có mức giảm là *B. Animalis*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng vi khuẩn lactic để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần. Cụ thể là, sáng chế đề xuất sử dụng *L. reuteri* NK33 để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần. Ngoài ra, sáng chế đề xuất sử dụng *B. adolescentis* NK98 để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng vi khuẩn lactic để phòng hoặc điều trị một bệnh viêm nhiễm. Cụ thể là, sáng chế đề xuất sử dụng *L. reuteri* NK33 để phòng hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm. Ngoài ra, sáng chế đề xuất sử dụng *B. adolescentis* NK98 để phòng hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng chế phẩm bao gồm vi khuẩn lactic trong bào chế thuốc để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần. Cụ thể là, sáng chế đề xuất sử dụng chế phẩm bao gồm *L. reuteri* NK33 trong bào chế thuốc để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần. Ngoài ra, sáng chế đề xuất sử dụng được phẩm bao gồm *B. adolescentis* NK98 trong bào chế thuốc để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần.

Các thuật ngữ “*L. reuteri* NK33,” “*B. adolescentis* NK98,” “bệnh về tâm thần,” “bệnh viêm” và tương tự theo sáng chế giống như được mô tả trên đây.

Các giá trị số được sử dụng trong phần mô tả nên được diễn giải để bao gồm phạm vi tương đương của chúng, trừ khi có quy định khác.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ ưu tiên để làm rõ hơn về sáng chế. Tuy nhiên, các ví dụ sau chỉ được cung cấp nhằm mục đích minh họa sáng chế mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Vi khuẩn lactic theo sáng chế, cụ thể là *L. reuteri* NK33 hoặc *B. adolescentis* NK98 có tác dụng ức chế yếu tố gây bệnh thoái hóa thần kinh và làm giảm các hành vi gây lo âu và trầm cảm. Do đó, vi khuẩn lactic theo sáng chế có thể được sử dụng làm dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, và hiệu quả trong phòng và điều trị bệnh thoái hóa thần kinh và rối loạn tâm thần.

Ngoài ra, vi khuẩn lactic theo sáng chế có hiệu quả trong ức chế phản ứng viêm, và do đó có thể được sử dụng trong dược để phòng hoặc điều trị bệnh viêm nhiễm, và hiệu quả trong phòng và điều trị viêm đại tràng.

Hơn nữa, chế phẩm để đo mức vi sinh vật đường ruột theo sáng chế có hiệu quả trong chẩn đoán bệnh về tâm thần bằng cách đo mức vi sinh vật đường ruột.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 cho thấy kết quả đo hành vi lo lắng và các chỉ số máu liên quan đến chuột (IS) bị căng thẳng do bất động; (a) là biểu đồ xác định thời gian dành cho các cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) giảm là kết quả của bài kiểm tra mê cung được nâng cao; (b) là biểu đồ xác định thời gian ở vùng sáng giảm do bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; (c) là biểu đồ xác định hành vi vùi bi tăng lên trong thử nghiệm vùi bi; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã và mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm; (e) là biểu đồ xác định corticosteron trong máu tăng lên; (f) là một biểu đồ xác định IL-6 trong máu tăng lên; (g) là biểu đồ xác định rằng TNF- α trong máu tăng lên; và (h) là biểu đồ xác định lipopolysaccharit (LPS) trong máu được tăng lên;

Fig.2 (a) là sơ đồ xác định có sự thay đổi trong hệ vi khuẩn đường ruột trong phân của chuột (IS) bị căng thẳng do bất động; và Fig.2 (b) là biểu đồ xác định có sự gia tăng lipopolysaccharit (LPS) trong phân của chuột (IS) bị căng thẳng do bất động;

Fig.3 là hình thể hiện kết quả đo các chỉ số viêm đại tràng liên quan đến chuột (IS) bị căng thẳng do bất động; (a) là biểu đồ xác định rằng có sự suy giảm chiều dài đại tràng của chuột (IS) bị căng thẳng do bất động; (b) là biểu đồ xác định rằng myeloperoxidaza tăng lên trong đại tràng; (c) là một biểu đồ xác định rằng TNF- α tăng lên trong đại tràng; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên và sự biểu hiện của COX-2 và iNOS tăng lên trong đại tràng; và (e) là hình ảnh xác định occludin và claudin-1 giảm trong đại tràng;

Fig.4 là hình thể hiện kết quả xác định trạng thái của mô hình động vật (FIS), được cho sử dụng phân của mô hình động vật bị căng thẳng do bất động; (a) là một biểu đồ xác định thời gian dành cho các cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) giảm là kết quả của bài kiểm tra mê cung được nâng cao; (b) là biểu đồ xác định thời gian ở vùng sáng giảm do bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; (c) là một biểu đồ xác định hành vi vùi bị tăng lên trong thử nghiệm vùi bi; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã và mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm; (e) là một biểu đồ xác định chiều dài đại tràng giảm; và (f) là biểu đồ xác định myeloperoxidaza tăng lên trong đại tràng;

Fig.5 là hình thể hiện kết quả đo các chỉ số máu liên quan đến mô hình động vật (FIS) được cho sử dụng phân của mô hình động vật bị căng thẳng do bất động; (a) là biểu đồ xác định corticosteron trong máu tăng lên; (b) là biểu đồ xác định IL-6 trong máu tăng lên; và (c) là biểu đồ xác định TNF- α trong máu tăng lên;

Fig.6 là hình thể hiện kết quả xác định sự thay đổi các chỉ số viêm đại tràng và hệ vi khuẩn đường ruột liên quan đến mô hình động vật (FIS) được cho sử dụng phân của mô hình động vật bị căng thẳng do bất động; (a) là biểu đồ xác định TNF- α tăng lên; (b) là biểu đồ xác định IL-6 tăng lên trong đại tràng; (c) là biểu đồ xác định IL-10 giảm trong đại tràng; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên và sự biểu hiện của COX-2 và iNOS tăng lên trong đại tràng; và (e) là sơ đồ xác định hệ vi khuẩn đường ruột trong phân bị thay đổi;

Fig.7 là hình thể hiện kết quả đo hành vi lo lắng và các chỉ số máu liên quan đến chuột (AP) bị căng thẳng do kháng sinh; (a) là biểu đồ xác định thời gian dành cho các cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) giảm là kết quả của bài kiểm tra mê cung được nâng cao; (b) là biểu đồ xác định thời gian ở vùng sáng giảm do bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; (c) là biểu đồ xác định hành vi vùi bị tăng lên trong thử nghiệm vùi bị; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã và mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm; (e) là biểu đồ xác định corticosteron trong máu tăng lên; (f) là biểu đồ xác định IL-6 trong máu tăng lên; (g) là biểu đồ xác định TNF- α trong máu tăng lên; và (h) là biểu đồ xác định lipopolysaccharit (LPS) trong máu tăng lên;

Fig.8 (a) là sơ đồ xác định có sự thay đổi trong hệ vi khuẩn đường ruột trong phân của chuột (AP) bị căng thẳng do kháng sinh; và Fig.8 (b) là biểu đồ xác định có sự gia tăng lipopolysaccharit (LPS) trong phân của chuột (AP) bị căng thẳng do kháng sinh;

Fig.9 là hình thể hiện kết quả đo các chỉ số viêm đại tràng liên quan đến chuột (AP) bị căng thẳng do kháng sinh; (a) là biểu đồ xác định có sự suy giảm chiều dài của đại tràng; (b) là biểu đồ xác định myeloperoxidaza tăng lên trong đại tràng; (c) là biểu đồ xác định TNF- α tăng lên trong đại tràng; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên và sự biểu hiện của COX-2 và iNOS tăng lên trong đại tràng; và (e) là hình ảnh xác định occludin và claudin-1 giảm trong đại tràng;

Fig.10 (A) là sơ đồ xác định vi khuẩn nào tăng lên do nuôi cấy phân chuột (IS) bị căng thẳng do bất động và phân của chuột (AP) bị căng thẳng do kháng sinh trong môi trường chọn lọc; và Fig.10 (B) là sơ đồ xác định vi khuẩn nào giảm do nuôi cấy phân chuột (IS) bị căng thẳng do bất động và phân chuột (AP) bị căng thẳng do kháng sinh trong môi trường chọn lọc;

Fig.11 là hình thể hiện kết quả đo hành vi lo lắng và các chỉ số máu liên quan đến chuột (AP) được cho sử dụng vi sinh vật tăng lên trong phân chuột bị căng thẳng do bất động và căng thẳng do kháng sinh; (a) là biểu đồ xác định thời gian dành cho các cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) đã giảm đáng kể trong nhóm được cho sử dụng *K. oxytoca*, là kết quả của bài kiểm tra mê cung được nâng cao với chuột được cho sử dụng *K. oxytoca* (KO), *E. coli* (EC), *Aerococcus urinaeequi* (AU) và *M. morganii* (MM); (b) là biểu đồ xác định thời gian dành cho các cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) giảm do kết quả của bài

kiểm tra mê cung được nâng cao với chuột được cho sử dụng *K. oxytoca* (KO); (c) là biểu đồ xác định thời gian ở vùng sáng giảm do bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; (d) là biểu đồ xác định hành vi vùi bi tăng lên trong thử nghiệm vùi bi; (e) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã và mức độ biểu hiện của yếu tố gây suy nhược thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm; (f) là biểu đồ xác định corticosteron trong máu tăng lên; (g) là biểu đồ xác định IL-6 trong máu tăng lên; (h) là biểu đồ xác định TNF- α trong máu tăng lên; và (i) là biểu đồ xác định lipopolysaccharit (LPS) trong máu tăng lên;

Fig.12 (a) là sơ đồ xác định có sự thay đổi trong hệ vi khuẩn đường ruột trong phân của chuột (KO) được sử dụng *K. oxytoca*; và Fig.12 (b) là biểu đồ xác định có sự gia tăng lipopolysaccharit (LPS) trong phân của chuột (KO) được sử dụng *K. oxytoca*;

Fig.13 là hình thể hiện kết quả đo các chỉ số viêm đại tràng liên quan đến chuột (KO) được sử dụng *K. oxytoca*; (a) là biểu đồ xác định chiều dài của đại tràng giảm; (b) là biểu đồ xác định myeloperoxidaza tăng lên trong đại tràng; (c) là biểu đồ xác định TNF- α tăng lên trong đại tràng; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên và sự biểu hiện của COX-2 và iNOS tăng lên trong đại tràng; và (e) là hình ảnh xác định occludin và claudin-1 giảm trong đại tràng;

Fig.14 là hình thể hiện kết quả đo các hành vi lo lắng liên quan đến và so sánh các chỉ số máu giữa nhóm (IS), trong đó chuột bị căng thẳng do bất động được sử dụng dung dịch nước muối sinh lý và nhóm được sử dụng *L. reuteri* NK33 (IS + LR), vi khuẩn lactic; (a) là biểu đồ xác định thời gian dành cho cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) tăng lên do kết quả của bài kiểm tra mê cung được nâng cao với nhóm được sử dụng *L. reuteri* NK33 (IS + LR), vi khuẩn lactic; (b) là biểu đồ xác định thời gian trong vùng sáng tăng lên do kết quả của bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; (c) là biểu đồ xác định hành vi vùi bi giảm trong thử nghiệm vùi bi; (d) là hình ảnh xác định hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) bị ức chế ở vùng hải mã và mức độ biểu hiện của yếu tố gây suy nhược thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) tăng lên; (e) là biểu đồ xác định corticosteron trong máu giảm; (f) là biểu đồ xác định IL-6 trong máu giảm; và (g) là biểu đồ xác định TNF- α trong máu giảm;

Fig.15 là hình thể hiện kết quả đo các chỉ số viêm đại tràng liên quan đến nhóm (IS), trong đó chuột bị căng thẳng do bất động được sử dụng dung dịch nước muối sinh lý và nhóm được sử dụng *L. reuteri* NK33 (IS + LR), vi khuẩn axit lactic; (a) là biểu đồ xác định độ dài của đại tràng được phục hồi; (b) là biểu đồ xác định myeloperoxidaza giảm trong đại tràng;

(c) là biểu đồ xác định TNF- α giảm trong đại tràng; và (d) là hình ảnh xác định hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) giảm và các biểu hiện của COX-2 và iNOS giảm trong đại tràng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ và ví dụ thí nghiệm ưu tiên để làm rõ sáng chế. Tuy nhiên, các ví dụ và ví dụ thí nghiệm sau đây chỉ được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ thí nghiệm 1. Mô hình động vật bị rối loạn tâm thần

(1) Căng thẳng do bất động

Để gây ra một rối loạn tâm thần như lo lắng, trầm cảm, căng thẳng hoặc tương tự, một con chuột đã được gắn vào một thiết bị gây căng thẳng do bất động hình trụ 3 x 10 cm, để chuột không thể di chuyển trong đó.

Cụ thể là, để chuẩn bị chuột bị gây lo lắng bởi căng thẳng do bất động, chuột đã được cố định vào thiết bị, đã bị gây căng thẳng do bất động lặp lại năm lần, theo cách chuột bị giữ đầu hai giờ một lần mỗi ngày, và sau đó thí nghiệm hành vi được thực hiện trong hai giờ sau khi lần gây căng thẳng do bất động cuối cùng.

Ngoài ra, để chuẩn bị chuột bị gây trầm cảm bởi căng thẳng do bất động, chuột đã được cố định vào thiết bị, đã bị gây căng thẳng do bất động lặp lại liên tục một lần mỗi ngày trong hai ngày, theo cách chuột bị giữ đầu của nó trong 12 giờ. Chuột được cho sử dụng vi khuẩn lactic mỗi ngày một lần trong năm ngày, và thí nghiệm hành vi được thực hiện trong một giờ sau khi dùng thuốc cuối cùng.

(2) Căng thẳng do kháng sinh

Để gây rối loạn tâm thần như lo lắng, trầm cảm, căng thẳng hoặc tương tự, chuột được tiêm ampicillin (100 mg/kg) trong hai ngày liên tiếp. Hành vi lo lắng đã được đo trong 10 ngày sau khi dùng thuốc.

(3) Phương pháp thí nghiệm trên mô hình động vật bị rối loạn tâm thần

Đối với mô hình chuột bị căng thẳng do bất động gây ra, vi khuẩn lactic hoặc dung dịch muối sinh lý được sử dụng tùy thuộc vào nhóm thí nghiệm một lần mỗi ngày trong ba ngày kể từ ngày 7 sau khi bắt đầu gây căng thẳng do bất động. Đối với mô hình chuột bị căng thẳng do kháng sinh, vi khuẩn lactic hoặc dung dịch muối sinh lý được sử dụng tùy theo nhóm thí nghiệm một lần mỗi ngày trong ba ngày kể từ ngày 7 sau khi bắt đầu gây căng thẳng do kháng sinh.

Hành vi lo lắng đã được đo trong năm giờ sau khi chuột được sử dụng vi khuẩn lactic hoặc dung dịch muối sinh lý, và các chỉ số máu (corticosteron, IL-6, TNF- α , v.v...) được đo bằng cách thu thập máu trong một giờ sau khi kết thúc bài kiểm tra mê cung được nâng cao.

Ví dụ thí nghiệm 2. Phương pháp đo hành vi để chẩn đoán căng thẳng

(1) Bài kiểm tra mê cung được nâng cao (EPM)

Mê cung được nâng cao là thiết bị thí nghiệm để đo lường mức độ rối loạn tâm thần như căng thẳng, lo lắng hoặc tương tự. Thiết bị thí nghiệm mê cung được nâng cao được sử dụng trong thí nghiệm theo sáng chế là thiết bị thủy tinh nhựa dẻo màu đen, trong đó hai cánh tay mở (30 x 7 cm) và hai cánh tay kín (30 x 7 cm) với các vách cao 20 cm và cao hơn sàn 50 cm, mỗi cánh tay kéo dài 7 cm từ một nền tảng trung tâm. Trong thí nghiệm, chuột được đặt trong mê cung được nâng cao trong phòng, trong phòng có máy quay video 20 Lux được lắp đặt ở cao, và sau đó chuyển động của chuột đã được ghi lại.

Cụ thể là, chuột C57BL/6 (đực, 19-22 g) được đặt ở giữa mê cung được nâng cao, theo cách một đầu chuột hướng về phía cánh tay mở. Thời gian dành cho cánh tay mở và đóng cũng như số lần đi vào cánh tay được đo trong năm phút. Một lần đi vào cánh tay được định nghĩa là một trường hợp trong đó chuột đi vào một cánh tay với tất cả bốn chân.

Trong toàn bộ thời gian thí nghiệm, thời gian dành cho cánh tay mở (OT) được tính bằng $[\text{Thời gian dành cho cánh tay mở (OT)} / (\text{Thời gian dành cho cánh tay mở (OT)} + \text{Thời gian dành cho cánh tay kín})] \times 100$. Và thời gian đi vào cánh tay mở (OE) được tính toán bằng $[\text{thời gian đi vào cánh tay mở (OE)} / (\text{thời gian đi vào cánh tay mở (OE)} + \text{thời gian đi vào cánh tay đóng})] \times 100$. Sau khi kết thúc mỗi thử nghiệm hành vi, mùi được loại bỏ bằng etanol 70%.

Theo một cách giải thích đã biết về kết quả xét nghiệm, kết quả được giải thích rằng, triệu chứng rối loạn tâm thần như lo lắng, trầm cảm hoặc tương tự xảy ra, nếu OT và OE giảm.

(2) Bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối

Thiết bị được sử dụng cho bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối bao gồm vùng sáng (21 x 42 x 25 cm, đi-ốt trắng 390 Lux) và vùng tối (21 x 42 x 25 cm, 2 Lux), có kích thước và được phân vùng bằng cánh cửa (7,5 x 7,5 cm). Chuột được đặt trong khu vực sáng và được quan sát trong năm phút, trong thời gian ở khu vực sáng và số lần chuyển sang khu vực sáng được đo. Sau khi kết thúc mỗi thí nghiệm hành vi, mùi được loại bỏ bằng etanol 70%.

Theo cách giải thích đã biết về kết quả xét nghiệm, kết quả được giải thích rằng triệu chứng rối loạn tâm thần như lo lắng, trầm cảm hoặc tương tự xảy ra, nếu thời gian ở vùng sáng và số lần chuyển sang vùng sáng giảm.

(3) Thử nghiệm vùi bi

Chuột được đặt trong lồng trong suốt chứa đầy mùn cưa sâu 5 cm, và ở đó trong 15 phút. Sau đó, 25 viên bi (trong suốt, đường kính 2 cm) được đặt trên mùn cưa với khoảng cách 5 cm. Chuột được đặt lại ở giữa một bên và số lượng viên bi mà con chuột vùi trong 30 phút đã được đo.

Theo cách giải thích đã biết về kết quả xét nghiệm, kết quả đã được giải thích rằng triệu chứng rối loạn tâm thần như lo lắng, trầm cảm hoặc tương tự xảy ra, nếu hành vi vùi và giấu bi của chuột tăng lên.

(4) Thử nghiệm bơi cưỡng bức (FST)

Theo một phương pháp của Porsolt và cộng sự, (Porsolt RD, Le Pichon, Jalfre M (1977) *Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments*, Nature, Vol. 266; pp. 730-732), nước ở $25 \pm 1^\circ\text{C}$ được đổ vào bể nước 40 cm chiều cao và 20 cm đường kính, cho đến khi mực nước đạt 25 cm. Chuột trong phòng thí nghiệm được đưa vào từng bể và ở đó tổng cộng sáu phút, trong đó hai phút đầu tiên không được đo là thời gian thích nghi, và sau đó trong bốn phút cuối, thời gian bất động của động vật thí nghiệm đã được đo. Sự bất động có nghĩa là trạng thái chuột trôi nổi trong nước bất động ngoại trừ chuyển động ít nhất để giữ đầu chỉ ở trên mặt nước.

(5) Bài kiểm tra treo đuôi (TST)

Theo một phương pháp của Steru và cộng sự (Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) *The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice*, Psychopharmacology, Vol. 85; pp. 367-370), chuột được treo lên trong một thùng chứa đường kính 35 cm và cao 50 cm bằng cách đặt một thiết bị cố định cách đầu đuôi chuột khoảng 1 cm, sao cho chuột bị treo lơ lửng cách sàn 50 cm. Tổng cộng trong sáu phút, thời gian bất động của động vật thí nghiệm đã được đo.

Ví dụ thí nghiệm 3. Thí nghiệm xác định hệ vi khuẩn đường ruột

Phản ứng chuỗi polyme hóa (PCR) thời gian thực hoặc phản ứng giải trình tự pyro 454 đã được thực hiện để xác định tỷ lệ của firmicutes, proteobacteria, actinobacteria, bacteroidetes và tương tự trong một hệ vi khuẩn đường ruột.

Cụ thể là, ADN từ phân thu được từ mô hình động vật được phân lập bằng bộ kit nhỏ gọn xét nghiệm phân QIAamp ADN (Qiagen, Đức). Phản ứng giải trình tự pyro được thực hiện bằng môi mã hóa (miền từ V1 đến V3 của gen rADN 16S của vi khuẩn). qPCR được phân tích bằng môi được trình bày trên bảng 1 sau đây.

Bảng 1

Loại	Trình tự (5'-3')	
<i>Firmicutes</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 2) GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 3) AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC
<i>Bacteroidetes</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 4) GTT TAA TTC GAT GAT ACG CGA G
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 5) TTA ASC CGA CAC CTC ACG G
<i>β-Proteobacteria</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 6) AAC GCG AAA AAC CTT ACC TAC C
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 7) TGC CCT TTC GTA GCA ACT AGT G
<i>δ/γ-Proteobacteria</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 8) GCT AAC GCA TTA AGT RYC CCG
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 9) GCC ATG CRG CAC CTG TCT
<i>ϵ-Proteobacteria</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 10) TAG GCT TGA CAT TGA TAG AAT C

	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 11) CTT ACG AAG GCA GTC TCC TTA
<i>Actinobacteria</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 12) TGT AGC GGT GGA ATG CGC
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 13) AAT TAA GCC ACA TGC TCC GCT
<i>TM</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 14) AYT GGG CGT AAA GAG TTG C
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 15) TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T
<i>Verrucomicrobia</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 16) TCA KGT CAG TAT GGC CCT TAT
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 17) CAG TTT TYA GGA TTT CCT CCG CC
<i>Enterobacteriaceae</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 18) CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 19) CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC
<i>Escherichia coli</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 20) CGC GTA CTA TAC GCC ATG AAC GTA
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 21) ACC GTT GAT CAC TTC GGT CAG G
<i>Klebsiella spp.</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 22) GAT ACG GAG TAT GCC TTT ACG GTG
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 23) TAG CCT TTA TCA AGC GGA TAC TGG
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 24) GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 25) ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT
<i>Morganella morganii</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 26) CTC GCA CCA TCA GAT GAA CCC ATA T
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 27) CAA AGC ATC TCT GCT AAG TTC TCT GGA TG
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 28) GAA CGC AYT GGC CCA A
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 29) TCC ATT GTG GCC GAT CAG T
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 30) CAC TAG ACG CAT GTC TAG AG
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 31) AGT CTC TCA ACT CGG CTA TG
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 32) TCA TGA TTT ACA TTT GAG TG
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 33) GAC CAT GCG GTC CAA GTT GTT

<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 34) CGC CCT TAA CAG CAG TCT TC
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 35) GCC CTC CGT ATG CTT AAA CC
rADN 16S vi khuẩn	Xuôi (F)	(SEQ ID NO: 36) TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A
	Ngược (R)	(SEQ ID NO: 37) GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT

Ví dụ thí nghiệm 4. Phương pháp đo lipopolysacarit

(1) Phương pháp đo lipopolysacarit trong phân

Phân (20 mg) được tạo huyền phù trong 30 ml dung dịch đệm phosphat (PBS), sau đó vi sinh vật trong phân được nghiền bằng phương pháp xử lý siêu âm trong một giờ, và sau đó được ly tâm ở 500 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi trên được lọc bằng màng lọc 0,45 μm , sau đó được lọc lại bằng màng lọc 0,22 μm , tiếp theo được xử lý ở 70°C trong 10 phút, sau đó được sử dụng làm mẫu thử. Đối với mẫu thử nói trên, lipopolysacarit được đo bằng bộ kit xét nghiệm Limulus amoebocyte lysate (LAL) (Cape Cod Inc., East Falmouth, MA, U.S.A.).

(2) Phương pháp đo lipopolysacarit trong máu

Máu được pha loãng 10 lần với PBS, sau đó được ly tâm rồi dịch nổi được xử lý ở 0°C trong 10 phút. Dịch nổi thu được được lọc bằng màng lọc 0,45 μm , rồi được lọc lại bằng màng lọc 0,22 μm , sau đó được sử dụng làm mẫu thử. Đối với mẫu thử nói trên, lipopolysacarit được đo bằng bộ kit xét nghiệm Limulus amoebocyte lysate (LAL) (Cape Cod Inc., East Falmouth, MA, U.S.A.).

Ví dụ thí nghiệm 5. Phương pháp đo các chỉ số viêm đại tràng

(1) Đo hoạt tính myeloperoxidaza

20 μl dung dịch đệm kali phosphat 10 mM, pH 7,0 chứa 0,5% hexadexyl trimetyl amoni bromua được đưa vào 100 mg mô đại tràng, sau đó được đồng nhất hóa. Hỗn hợp thu được được ly tâm trong 10 phút ở điều kiện 4°C và 10.000 g, để thu được dịch nổi. 50 μl dịch nổi được đưa vào 0,95 μl dung dịch phản ứng (chứa 1,6 mM tetrametyl benzidin và 0,1 mM H_2O_2), sau đó được phản ứng ở 37°C, và sau đó được đo bằng kính hiển vi ở bước sóng 650

nm. Hoạt động của myeloperoxidaza (MPO) đã được tính toán thông qua chất phản ứng thu được H_2O_2 , $1 \text{ mol/ml} = 1$ đơn vị.

(2) Đo các chỉ số viêm

Các chỉ thị sinh học phản ứng viêm như p-p65, p65, iNOS, COX-2 và β -actin được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch protein (western blot). Cụ thể là, 50 μg dịch nổi, thu được bằng phương pháp tương tự như trong thí nghiệm để đo hoạt động của myeloperoxidaza (MPO), đã được lấy và sau đó thực hiện thấm miễn dịch. Ngoài ra, mức độ biểu hiện của các cytokin được đo bằng bộ kit ELISA, và LPS được đo bằng bộ kit xét nghiệm LAL.

Ví dụ 1: Xác định trạng thái của mô hình động vật bị gây căng thẳng do bất động

Theo các ví dụ thí nghiệm 2-5, thí nghiệm đã được thực hiện trên chuột (IS), vốn đã bị căng thẳng do bất động một lần mỗi ngày trong tổng số năm lần theo cùng một phương pháp như trong Ví dụ thí nghiệm 1- (1) ở trên.

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 2, kết quả cho phép xác định rằng thời gian dành cho các cánh tay mở (OT) và đi vào cánh tay mở (OE) đã giảm trong bài kiểm tra mê cung được nâng cao; thời gian ở vùng sáng giảm trong bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; và hành vi vui bi tăng lên trong thử nghiệm vui bi (Fig.1 (a)-(c)).

Ngoài ra, thông qua western blot, kết quả cho phép xác định rằng hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm (Fig.1 (d)); và lượng corticosteron, IL-6, TNF- α và lipopolysacarit trong máu tăng lên (Fig.1 (e)-(h)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 3, kết quả cho phép xác định rằng vi khuẩn, bacteroidetes, actinobacteria và firmicutes trong phân giảm, còn δ , γ -proteobacteria và ϵ -proteobacteria tăng lên. Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 4, kết quả cho phép xác định rằng lipopolysacarit trong phân tăng lên (Fig.2).

Sau khi thực hiện Ví dụ thí nghiệm 5, kết quả cho phép xác định rằng chiều dài của đại tràng, vốn là chỉ số của viêm đại tràng, giảm; myeloperoxidaza tăng lên; TNF- α của đại tràng tăng lên; sự biểu hiện của COX-2 và iNOS của đại tràng tăng lên; hoạt tính NF- κ B tăng lên; và occludin cùng claudin-1, vốn là các protein liên hệ chặt chẽ, giảm (Fig.3 (a)-(e)).

Ví dụ 2: Xác định trạng thái của mô hình động vật được cho sử dụng phân của mô hình động vật bị căng thẳng do bất động

Theo các ví dụ thí nghiệm 2-4, thí nghiệm đã được thực hiện trên chuột (FIS), được sử dụng bằng phân chuột, đã bị căng thẳng do bất động một lần mỗi ngày trong tổng số năm lần theo cùng phương pháp như được trình bày trong ví dụ thí nghiệm 1- (1) ở trên.

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 2, kết quả cho phép xác định rằng OT và OE giảm trong bài kiểm tra mê cung được nâng cao; thời gian ở vùng sáng giảm trong bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; và hành vi vui bi tăng lên trong thử nghiệm vui bi (Fig.4 (a)-(c)).

Sau khi thực hiện western blot, kết quả cho phép xác định rằng hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm (Fig.4 (d)); và lượng corticosteron, IL-6 và TNF- α trong máu tăng lên (Fig.5 (a)-(c)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 5, kết quả cho phép xác định rằng chiều dài của đại tràng (vốn là chỉ số của viêm đại tràng) giảm; myeloperoxidaza tăng (Figs.4 (e) và (f); TNF- α và IL-6 của đại tràng tăng lên, IL-10 của đại tràng giảm, biểu hiện của COX-2 và iNOS của đại tràng tăng lên; và hoạt tính NF- κ B tăng lên (Fig.6 (a)-(d)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 3, kết quả cho phép xác định rằng bacteroidetes, actinobacteria và firmicutes trong phân giảm và γ -proteobacteria và ϵ -proteobacteria tăng (Fig.6 (e)).

Ví dụ 3: Xác định trạng thái của mô hình động vật bị căng thẳng do kháng sinh

Theo các ví dụ thí nghiệm 2-5, thí nghiệm đã được thực hiện trên chuột (AP), đã bị căng thẳng do kháng sinh khi sử dụng ampicillin (100 mg/kg) trong hai ngày liên tiếp theo phương pháp tương tự như trong ví dụ thí nghiệm 1- (2) ở trên.

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 2, kết quả cho phép xác định rằng OT và OE giảm trong bài kiểm tra mê cung được nâng cao; thời gian ở vùng sáng giảm trong bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; và hành vi vui bi tăng lên trong thử nghiệm vui bi (Fig.7 (a)-(c)).

Kết quả cho phép xác định rằng hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm (Fig.7

(d)); và lượng corticosteron, IL-6, TNF- α và lipopolysacarit trong máu tăng lên (Fig.7 (e)-(h)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 3, kết quả cho phép xác định rằng bacteroidetes, actinobacteria và firmicutes trong phân giảm còn δ , γ -proteobacteria và ϵ -proteobacteria tăng. Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 4, kết quả cho phép xác định rằng lipopolysacarit trong phân tăng (Figs. 8 (a) và (b)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 5, kết quả cho phép xác định rằng chiều dài đại tràng, vốn là chỉ số của viêm đại tràng, giảm; myeloperoxidaza tăng; TNF- α của đại tràng tăng lên; biểu hiện của COX-2 và iNOS của đại tràng tăng lên; hoạt tính NF- κ B tăng lên; và occludin cùng với claudin-1, vốn là các protein liên hệ chặt chẽ, giảm (Fig.9 (a)-(e)).

Ví dụ 4: Xác định trạng thái của mô hình động vật được cho sử dụng các vi sinh vật phân lập từ phân của mô hình động vật bị căng thẳng

(1) Phân lập vi sinh vật từ phân của mô hình động vật bị căng thẳng

Phân của chuột bị căng thẳng do bất động và phân của chuột bị căng thẳng do kháng sinh được nuôi cấy trong một môi trường chọn lọc tương ứng. Kết quả thu được cho phép xác định rằng enterobacteriaceae được nuôi cấy trong môi trường DHL tăng lên, và cụ thể là *K. oxytoca*, *E. coli* và *M. morganii* tăng (Fig.10 (A)).

Mặt khác, kết quả cho phép xác định rằng bifidobacteria và lactobacilli sinh trưởng trong môi trường BL giảm, và cụ thể là *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* và *B. Animalis* giảm (Fig.10(B))

(2) Xác định trạng thái mô hình động vật được cho sử dụng vi sinh vật

Sau khi cho mỗi con chuột sử dụng 1×10^9 cfu *K. oxytoca*, *E. coli* và *M. morganii* tương ứng, vốn tăng lên trong phân của chuột bị căng thẳng do bất động và chuột bị căng thẳng do kháng sinh, bài kiểm tra mê cung được nâng cao đã được thực hiện theo ví dụ thí nghiệm 2- (1) ở trên. Kết quả thu được cho phép xác định rằng OT và OE giảm đáng kể trong nhóm được cho sử dụng *K. oxytoca* so với nhóm được cho sử dụng với các vi sinh vật khác (Fig.11 (a)).

Sau đó, theo các ví dụ thí nghiệm 2-5, thí nghiệm đã được thực hiện trên chuột (KO) được cho sử dụng *K. oxytoca*.

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 2, kết quả cho phép xác định rằng OT và OE giảm trong bài kiểm tra mê cung được nâng cao; thời gian ở vùng sáng giảm trong bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; và hành vi vùi bi tăng lên trong thử nghiệm vùi bi (Fig.11 (b)-(d)).

Kết quả cho phép xác định rằng hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm (Fig.11 (e)); và lượng corticosteron, IL-6, TNF- α và lipopolysaccharit trong máu tăng lên (Fig.11 (f)-(i)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 3, kết quả cho phép xác định rằng bacteroidetes, actinobacteria và firmicutes trong phân giảm và δ , γ -proteobacteria và ϵ -proteobacteria trong phân tăng. Sau khi thực hiện Ví dụ thí nghiệm 4, kết quả cho phép xác định rằng lipopolysaccharit trong phân tăng (Figs. 12 (a) và (b)).

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 5, kết quả cho phép xác định rằng chiều dài đại tràng, vốn là chỉ số của viêm đại tràng, giảm; myeloperoxidase tăng; TNF- α của đại tràng tăng lên; biểu hiện của COX-2 và iNOS của đại tràng tăng lên; hoạt tính NF- κ B tăng lên; và occludin cùng với claudin-1, vốn là các protein liên hệ chặt chẽ, giảm (Fig.13 (a)-(e)).

Ví dụ 5: Phân lập và định danh vi khuẩn lactic

(1) Phân lập vi khuẩn lactic từ phân người và chuột

Phân người và phân chuột mới được đưa vào và tạo huyền phù trong môi trường lỏng GAM (môi trường lỏng GAM; Dược phẩm Nissui, Nhật Bản), tương ứng. Sau đó, dịch bên trên đã được lấy và cấy vào môi trường MRS, BHI (Brain-Heart-Infusion) hoặc môi trường thạch BL (Dược phẩm Nissui, Nhật Bản), sau đó nuôi cấy yếm khí ở 37°C trong khoảng 48 đến 72 giờ, và sau đó các chủng tạo thành khuẩn lạc được phân lập.

(2) Định danh vi khuẩn lactic được phân lập

Đặc điểm sinh lý và trình tự rADN 16S của các chủng được phân lập từ phân người hoặc chuột đã được phân tích, sau đó các loài của các chủng đã được xác định, và sau đó đặt tên cho các chủng. Tên chủng được đặt cho vi khuẩn lactic được trình bày trên bảng 2 sau

đây. Cụ thể là, vi khuẩn lactic được phân lập từ phân người hoặc chuột là 9 loại *Lactobacillus* spp. và 22 loại *Bifidobacterium* spp.

Bảng 2

Số quản lý	Tên chủng
1	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31
2	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32
3	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33
4	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34
5	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35
6	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36
7	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37
8	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38
9	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39
10	<i>Bifidobacterium longum</i> NK81
11	<i>Bifidobacterium longum</i> NK82
12	<i>Bifidobacterium longum</i> NK83
13	<i>Bifidobacterium longum</i> NK84
14	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NK85
15	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NK86
16	<i>Bifidobacterium infantis</i> NK87
17	<i>Bifidobacterium infantis</i> NK88
18	<i>Bifidobacterium infantis</i> NK89
19	<i>Bifidobacterium breve</i> NK90
20	<i>Bifidobacterium breve</i> NK91

21	<i>Bifidobacterium choerinum</i> NK92
22	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> NK93
23	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> NK94
24	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK95
25	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> NK96
26	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK97
27	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK98
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK99
29	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> NK100
30	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> NK101
31	<i>Bifidobacterium minimum</i> NK102

(3) Đặc điểm sinh lý của vi khuẩn lactic *L. reuteri* NK33

Trong số các chủng được mô tả trên bảng 2 ở trên, kết quả cho phép xác định rằng *L. reuteri* NK33 (số truy nhập KCCM12090P) là trực khuẩn gram dương. Ngoài ra, kết quả đã chứng minh rằng một rADN 16S của *L. reuteri* NK33 có trình tự SEQ ID NO: 1. Kết quả so sánh các chuỗi rADN 16S của *L. reuteri* NK33 bằng công cụ tìm kiếm BLAST, kết quả cho phép xác định rằng chủng *L. reuteri* có cùng trình tự rADN 16S hoàn toàn chưa được tìm kiếm, và tương đồng 99% với trình tự rADN 16S của chủng *L. reuteri* đã biết.

Trong số các đặc điểm sinh lý của *L. reuteri* NK33, tính khả dụng của nguồn cacbon đã được phân tích bằng thử nghiệm lên men đường bằng cách sử dụng bộ kit API 50 CHL (BioMerieux, Mỹ). Kết quả được trình bày trên bảng sau 3. Trên bảng 3 dưới đây, “+” chỉ ra rằng tính khả dụng của nguồn cacbon là dương tính và “-” chỉ ra rằng tính khả dụng của nguồn cacbon là âm.

Bảng 3

Nguồn cacbon	<i>L. reuteri</i> NK33	Nguồn cacbon	<i>L. reuteri</i> NK33
--------------	------------------------	--------------	------------------------

ĐỐI CHỨNG	-	Esculin	+
Glyxeryl	-	Salicin	+
Erythritol	-	Xenlobioza	+
D-arabinoza	-	Maltoza	+
L-arabinoza	+	Lactoza	+
D-riboza	+	Melibioza	+
D-xyloza	+	Sucroza	+
L-xyloza	-	Trehaloza	+
D-adonitol	-	Inulin	-
Metyl- β -D-xylopyranosit	-	Melezitoza	+
D-galactoza	+	Rafinoza	+
D-glucoza	+	Starch	-
D-fructoza	+	Glycogen	-
D-manoza	+	Xylitol	-
L-sorboza	-	Gentiobioza	+
Rhamnosus	-	D-turanoza	+
Dulxitol	-	D-lixoza	-
Inoxitol	-	D-tagatoza	-
Manitol	+	D-fucoza	-
Sorbitol	$\pm$	L-fucoza	-
α -metyl-D-manosit	-	D-arabitol	-
α -metyl-D-glucozit	-	L-arabitol	-
N-axetyl-glucosamin	+	Gluconat	$\pm$
Amygdalin	+	2-keto-gluconat	-

(4) Đặc điểm sinh lý của vi khuẩn lactic *B. adolescentis* NK98

Trong số các chủng được mô tả trên bảng 2 ở trên, kết quả đã chứng minh rằng rADN 16S của *B. adolescentis* NK98 (số truy nhập KCCM12297P) có trình tự SEQ ID NO: 38. Kết quả của việc so sánh các trình tự rADN 16S của *B. adolescentis* bằng công cụ tìm kiếm BLAST, kết quả cho phép xác định rằng một chủng *B. adolescentis* NK98 có cùng trình tự rADN 16S hoàn toàn chưa được tìm kiếm, và tương đồng 98% với trình tự rADN 16S của chủng *B. adolescentis* đã biết.

Trong số các đặc điểm sinh lý của *B. adolescentis* NK98, nguồn cacbon khả dụng đã được phân tích bằng thử nghiệm lên men đường bằng bộ kit API (API 20A, BioMerieux, Hoa Kỳ). Kết quả được trình bày trên bảng 4 sau đây. Trên bảng 4 dưới đây, “+” chỉ ra rằng tính khả dụng của nguồn cacbon là dương tính và “-” chỉ ra rằng tính khả dụng của nguồn cacbon là âm.

Bảng 4

Nguồn cacbon	Phản ứng/Enzym	<i>B. adolescentis</i> NK98
L-tryptophan	Sự hình thành indol	-
Ure	Ureaza	-
D-glucoza	Axit hóa (glucoza)	+
D-manitol	Axit hóa (manitol)	+
D-lactoza	Axit hóa (lactoza)	+
D-sacaroza	Axit hóa (sacaroza)	+
D-maltoza	Axit hóa (maltoza)	+
Salixin	Axit hóa (salixin)	+
D-xyloza	Axit hóa (xyloza)	±
L-arabinoza	Axit hóa (arabinoza)	+
Gelatin	Thủy phân (proteaza)	+
Esculin sắt xitrat	Thủy phân (β -glucosidaza)	+

Glyxeryl	Axit hóa (glyxeryl)	-
D-xenlobioza	Axit hóa (xenlobioza)	±
D-manoza	Axit hóa (manozơ)	-
D-melezitoza	Axit hóa (melezitoza)	-
D-rafinoza	Axit hóa (rafinoza)	+
D-sorbitol	Axit hóa (sorbitol)	-
L-rhamnoza	Axit hóa (rhamnoza)	-
D-trehaloza	Axit hóa (trehaloza)	+
	Catalaza	-
	Bào tử	-
	Phản ứng gram	+
	Hình thái	-

Ví dụ 7: So sánh hoạt tính của vi khuẩn lactic được phân lập

(1) Hoạt tính chống oxy hóa (*in vitro*)

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) đã được hòa tan trong etanol để đạt nồng độ 0,2 mM, như vậy dung dịch DPPH đã được chuẩn bị. Huyền phù vi khuẩn lactic (1×10^8 CFU/ml) hoặc dung dịch vitamin C (1 g/ml) được đưa vào 0,1 ml dung dịch DPPH trên, sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 20 phút. Dịch lỏng nuôi cấy được ly tâm ở 3000 vòng/phút trong năm phút, để thu được dịch nổi. Sau đó, độ hấp thụ của dịch nổi được đo ở 517 nm, và sau đó hoạt tính chống oxy hóa của vi khuẩn lactic bị cô lập đã được tính toán tương ứng. Hoạt tính chống oxy hóa của từng vi khuẩn lactic được trình bày trên bảng 5 (*Lactobacillus* spp.) và bảng 6 (*Bifidobacterium* spp.).

(2) Đo các chỉ số viêm trong đại thực bào

2 ml thioglycolat 4% đã khử trùng được tiêm trong màng bụng vào chuột C57BL/6 (con đực, 6 tuần tuổi, 20-23 g). Trong 96 giờ sau đó, chuột được gây mê và sau đó 8 ml môi trường RPMI 1640 được tiêm vào màng bụng cho chuột. Trong 5 đến 10 phút sau, môi trường

RPMI (đại thực bào) được chiết xuất từ chuột, sau đó ly tâm ở 1000 g trong 10 phút, sau đó rửa lại hai lần bằng môi trường RPMI 1640. Đại thực bào nói trên được đưa vào một đĩa 24 giếng với $0,5 \times 10^6$ tế bào mỗi giếng, sau đó được xử lý bằng vi khuẩn lactic *Lactobacillus* spp. và lipopolysacarit, vốn là chất gây phản ứng viêm, trong 2 hoặc 24 giờ, sau đó thu được dịch nổi và tế bào. Các tế bào thu được được đưa vào đệm RIPA (Gibco) và đồng nhất hóa. Mức độ biểu hiện của các xytokin như TNF- α được đo từ dịch nổi nuôi cấy đã xử lý trong 24 giờ, và sau đó mức độ biểu hiện của p65 (NF- κ B), p-p65 (phospho-NF- κ B) và β -actin được đo từ các tế bào thu được trong điều trị trong hai giờ bằng phương pháp miễn dịch. Mức độ biểu hiện của các chỉ số viêm cho mỗi vi khuẩn lactic *Lactobacillus* spp. được trình bày trên bảng 5 sau đây.

(3) Đo các chỉ số viêm trong tế bào thần kinh đệm

Tế bào thần kinh đệm BV-2 đã cấy truyền vào đĩa 24 giếng với mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào mỗi giếng, sau đó được xử lý bằng vi khuẩn lactic *Bifidobacterium* spp. đã phân lập và lipopolysacarit, vốn là chất gây phản ứng viêm, trong 2 hoặc 24 giờ, sau đó thu được dịch nổi và tế bào. Các tế bào thu được được đưa vào đệm RIPA (Gibco) và được đồng nhất hóa. Mức độ biểu hiện của p65 (NF- κ B), p-p65 (phospho-NF- κ B) và β -actin được đo từ các tế bào thu được khi xử lý trong hai giờ bằng phương pháp thấm miễn dịch. Mức độ biểu hiện của các chỉ số viêm cho mỗi vi khuẩn *Bifidobacterium* spp. được trình bày trên bảng 6 sau đây.

(4) Ảnh hưởng của biểu hiện yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) và hoạt động động NF- κ B trên các tế bào SH-SY5Y

Các tế bào SH-SY5Y, là các tế bào thần kinh, được mua từ Ngân hàng tế bào Hàn Quốc, sau đó được nuôi cấy trong môi trường DMEM chứa 10% FBS và 1% kháng sinh, rồi được chia vào đĩa 12 giếng với 2×10^6 tế bào mỗi giếng. Tiếp đó, corticosteron đã được thêm vào từng giếng với nồng độ 300 ng/ml cùng với vi khuẩn lactic (1×10^4 CFU/ml), rồi được nuôi cấy, và sau đó mức độ biểu hiện NF- κ B (p65, p-p65) và yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch. Các mức biểu hiện BDNF và mức độ hoạt tính NF- κ B cho mỗi vi khuẩn lactic được trình bày trên bảng 5 (*Lactobacillus* spp.) Và bảng 6 (*Bifidobacterium* spp.).

Bảng 5

Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hóa	Đại thực bào			Tế bào SH-SY5Y	
		Khả năng ức chế TNF- α	Tăng biểu hiện IL-10	Khả năng ức chế NF- κ	Tăng biểu hiện BDNF	Ức chế NF- κ B
<i>L. reuteri</i> NK31	+	+	+	+	+	+
<i>L. reuteri</i> NK32	++	++	++	++	+	++
<i>L. reuteri</i> NK33	+++	++	++	++	++	++
<i>L. reuteri</i> NK34	+	+	+	+	+	+
<i>L. reuteri</i> NK35	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> NK36	++	++	++	+	++	+
<i>L. johnsonii</i> NK37	++	++	++	++	+	++
<i>L. johnsonii</i> NK38	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> NK39	+	+	+	+	-	+

Bảng 6

Tên chủng	Hoạt tính chống oxy hóa	Khả năng ức chế NF- κ B tế bào thần kinh đệm	Khả năng biểu hiện BDNF tế bào SH-SY5Y
Không xử lý	-	-	-
<i>L. reuteri</i> NK33	+++	++	++
<i>B. longum</i> NK81	+	+	+
<i>B. longum</i> NK82	+	+	+
<i>B. longum</i> NK83	++	+	+
<i>B. longum</i> NK84	++	++	+
<i>B. bifidum</i> NK85	++	++	+
<i>B. bifidum</i> NK86	+	-	+

<i>B. infantis</i> NK87	++	+	+
<i>B. infantis</i> NK88	+	+	++
<i>B. infantis</i> NK89	+	+	+
<i>B. breve</i> NK90	+	+	++
<i>B. breve</i> NK91	++	+	+
<i>B. choerinum</i> NK92	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> NK93	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> NK94	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK95	++	+	+
<i>B. pseudolongum</i> NK96	++	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK97	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK98	++	+++	+++
<i>B. adolescentis</i> NK99	+	++	++
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK100	++	+	++
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK101	++	+	+
<i>B. minimum</i> NK102	+	+	+

* -, <10%; +, 10 ~ 30%; ++, 30 ~ 50%; +++, > 50%

(5) Kết quả thí nghiệm

Sau khi đánh giá hoạt động của vi khuẩn lactic được phân lập, kết quả cho phép xác định rằng trong số vi khuẩn lactic *Lactobacillus* spp hoặc *Bifidobacterium* spp. được cô lập, *L. reuteri* NK33 và *B. adolescentis* NK98 có tác dụng tốt trong thúc đẩy hoạt động chống oxy hóa và ức chế phản ứng viêm. Cụ thể, kết quả cho phép xác định rằng *L. reuteri* NK33 và *B. adolescentis* NK98 ức chế hoạt tính của NF- κ B, vốn được biết đến là chất gây ra các bệnh liên quan đến lão hóa như bệnh Alzheimer, ức chế phản ứng viêm của tế bào thần kinh đệm ở người già, người mất trí nhớ và tương tự, và tăng biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh

có nguồn gốc từ não (BDNF) được tạo ra bởi dây thần kinh não, nhưng giảm sự lão hóa, mất trí nhớ và tương tự (Bảng 5 và 6).

Ví dụ 8: Đánh giá hiệu quả điều hòa miễn dịch của vi khuẩn lactic *Bifidobacterium* spp.

Để đánh giá hiệu quả điều hòa miễn dịch của vi khuẩn lactic *Bifidobacterium* spp. được phân lập từ phân, tác dụng của vi khuẩn lactic *Bifidobacterium* spp. đối với phản ứng miễn dịch của đại thực bào và tế bào lách được đo.

(1) Phản ứng miễn dịch trong đại thực bào

2 ml thioglycolat đã khử trùng 4% được tiêm trong màng bụng vào chuột C57BL/6 (đực, 6 tuần tuổi, 20-23 g, công ty TNHH Raonbio). Trong 96 giờ sau khi tiêm, chuột đã được gây mê và sau đó 8 ml môi trường RPMI 1640 được tiêm vào màng bụng chuột. Trong 5 đến 10 phút sau, môi trường RPMI (bao gồm cả đại thực bào) được chất chiết từ chuột, sau đó ly tâm ở 1000 vòng/phút trong 10 phút, rồi được rửa hai lần nữa bằng môi trường RPMI 1640. Đại thực bào được cấy truyền lên đĩa 24 giếng với $0,5 \times 10^6$ tế bào mỗi giếng, rồi được nuôi cấy trong 24 giờ, và sau đó các tế bào không liên kết được loại bỏ và sử dụng.

Dịch lỏng nuôi cấy đại thực bào được xử lý bằng *B. adolescentis* NK98 và lipopolysaccharit, vốn là chất gây phản ứng viêm, trong 2 hoặc 24 giờ, rồi tiếp đó thu được dịch nổi và tế bào, trong đó nồng độ để xử lý vi khuẩn lactic là 1×10^4 CFU/ml. Các tế bào thu được được đưa vào đệm RIPA (Gibco) và đồng nhất hóa. Mức độ biểu hiện của TNF- α từ dịch nổi thu được được đo bằng bộ kit ELISA, và tiếp đó mức độ biểu hiện của p65 (NF- κ B), p-p65 (phospho-NF- κ B) và β -actin từ các tế bào thu được được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch. Cụ thể, 50 μ g dịch nổi đã được lấy và được đưa vào điện di trong gel polyacrylamit SDS 10% (w/v) trong một tiếng rưỡi. Mẫu điện di được chuyển lên giấy nitroxenluloza ở điều kiện 100 V và 400 mA trong một giờ và 10 phút. Giấy nitroxenluloza, trên đó mẫu được chuyển, được cố định bằng sữa tách kem 5% trong 30 phút, sau đó được rửa bằng PBS-Tween ba lần mỗi lần trong năm phút, và sau đó được để phản ứng qua đêm với các kháng thể sơ cấp (Công nghệ sinh học Santa Cruz, Mỹ) với tỷ lệ 1: 100. Sau đó, giấy được rửa ba lần mỗi lần trong 10 phút và được để phản ứng với các kháng thể thứ cấp (Công nghệ sinh học Santa Cruz, Mỹ) với tỷ lệ 1: 1000 trong một giờ và 20 phút. Tiếp đó, giấy được rửa ba lần mỗi lần

trong 15 phút, sau đó được phát huỳnh quang và phát quang, rồi được phát triển, và cuối cùng cường độ của dải nhiễm sắc được đo, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 7 sau đây.

Bảng 7

Tên chủng	Khả năng ức chế NF- κ B (p-p65/p65)	Khả năng ức chế TNF- α
Không xử lý	-	-
<i>B. adolescentis</i> NK98	+	++

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10 ~ 30%; ++, 30 ~ 60%; +++, > 60

(2) Phản ứng miễn dịch ở tế bào lách

Lá lách của chuột C57BL/6 (đực, 6 tuần tuổi, 20-22 g, Công ty TNHH OrientBio) đã bị tách và nghiền nát, sau đó được tạo huyền phù trong môi trường RPMI 1640 chứa 10% FCS. Các tế bào T CD4 được phân lập từ đó bằng bộ kit phân lập tế bào T CD4 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Đức), rồi sau đó các tế bào T CD4 bị cô lập được chia vào đĩa 12 giếng với 5×10^5 tế bào mỗi giếng.

Các tế bào được nuôi cấy với việc bổ sung các chất chống CD3, chống CD28, IL-2 và IL-14 để gây biệt hóa của các tế bào T thành các tế bào Th1; chống CD3, chống CD28, IL-2 và IL-4 để gây biệt hóa tế bào T thành tế bào Th2; chống CD3, chống CD28, IL-6 và TGF- β để gây biệt hóa của các tế bào T thành các tế bào Th17; và chống CD3 và chống CD28 để gây biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg, sau đó vi khuẩn lactic được đưa vào mật độ 1×10^5 CFU/mỗi giếng, rồi được nuôi cấy trong bốn ngày.

Tiếp đó, khả năng biệt hóa của các tế bào T được phân lập từ lá lách thành các tế bào Th1, tế bào Th2, tế bào Th17 và tế bào Treg đã được đo. Cụ thể là, các tế bào của dịch nuôi cấy được nhuộm bằng kháng thể chống FoxP3 hoặc chống IL-17A, sau đó sự phân phối các tế bào Th1, tế bào Th2, tế bào Th17 và tế bào Treg được phân tích bằng thiết bị FACS (phân loại tế bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang) (Hệ thống đo lưu lượng dòng chảy C6, San Jose, California, Mỹ), trong đó kết quả được trình bày trên bảng 8 sau đây.

Bảng 8

Tên chủng	Tỷ lệ ức chế biệt hóa			Tỷ lệ tăng biệt hóa
	Tế bào Th1	Tế bào Th2	Tế bào Th17	Tế bào Treg
Không xử lý	-	-	-	-
<i>B. longum</i> NK81	+	++	+	+
<i>B. longum</i> NK82	+	++	+	+
<i>B. longum</i> NK83	+	++	++	+
<i>B. longum</i> NK84	+++	+	+++	++
<i>B. bifidum</i> NK85	+++	+	+++	++
<i>B. bifidum</i> NK86	+	+	+++	+
<i>B. infantis</i> NK87	+	+	+++	++
<i>B. infantis</i> NK88	+	+	+++	+
<i>B. infantis</i> NK89	+	+	+++	+
<i>B. breve</i> NK90	+	+++	++	++
<i>B. breve</i> NK91	++	++	+	+
<i>B. choerinum</i> NK92	-	+	+	-
<i>B. catenulatum</i> NK93	+	++	++	+
<i>B. catenulatum</i> NK94	++	+	+	++
<i>B. adolescentis</i> NK95	++	+	+	+
<i>B. pseudolongum</i> NK96	++	++	++	+
<i>B. adolescentis</i> NK97	+	++	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK98	++	++	+++	+++
<i>B. adolescentis</i> NK99	+	+	++	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK100	++	++	+	+

<i>B. pseudocatenulatum</i> NK101	+	++	+	+
<i>B. minimum</i> NK102	+	+	+	+

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60

* Tỷ lệ tăng: -, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, > 100%

Ngoài ra, tỷ lệ biểu hiện của các yếu tố phiên mã và xytokin của các tế bào Th1, tế bào Th2, tế bào Th17 và tế bào Treg được phân lập từ các tế bào T lách được đo. Cụ thể, mức độ biểu hiện của T-bet, IFN- γ và IL-12 từ dịch lỏng nuôi cấy biệt hóa tế bào Th1; GATA3 và IL-5 từ dịch lỏng nuôi cấy biệt hóa tế bào Th2; ROR γ t và IL-17 từ dịch lỏng nuôi cấy biệt hóa tế bào Th17; và Foxp3 và IL-10 từ dịch lỏng nuôi cấy phân biệt tế bào Treg được phân tích bằng phương pháp qRT-PCR, trong đó kết quả của chúng được thể hiện trên bảng 9 sau đây.

Bảng 9

Tên chủng	Tỷ lệ ức chế biểu hiện						Tỷ lệ tăng biểu hiện	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	Tế bào IL-5	ROR γ t	IL-17	FOXp3	IL-10
Không xử lý	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> NK81	++	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. longum</i> NK82	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> NK83	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> NK84	++	++	+	+	+++	+++	++	++
<i>B. bifidum</i> NK85	+++	+++	+	+	+	+	++	++
<i>B. bifidum</i> NK86	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. infantis</i> NK87	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. infantis</i> NK88	+	+	++	++	+	+	+	+
<i>B. infantis</i> NK89	+	+	+	+	++	++	+	+
<i>B. breve</i> NK90	+	+	+++	+++	++	++	++	++

<i>B. breve</i> NK91	+	+	+	+	+	+++	++	+
<i>B. choerinum</i> NK92	+	+	+	+	+	++	+	++
<i>B. catenulatum</i> NK93	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> NK94	++	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK95	+	+	+	+	++	++	++	++
<i>B. pseudolongum</i> NK96	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK97	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis</i> NK98	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
<i>B. adolescentis</i> NK99	+	++	+	+	+	+	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK100	++	+	+	+	-	-	+	+
<i>B. pseudocatenulatum</i> NK101	++	+	+	+	-	-	+	+
<i>B. minimum</i> NK102	+	+	+	+	+	-	-	-

* Tỷ lệ ức chế: -, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, > 60

* Tỷ lệ tăng: -, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, > 100%

Như đã xác định trên bảng 8 và 9 ở trên, kết quả cho phép xác định rằng *B. adolescentis* NK98 có tỷ lệ ức chế cao đối với sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Th1, tế bào Th2 và tế bào Th17 và đặc biệt có tỷ lệ tăng cao đối với sự biệt hóa tế bào T thành tế bào Treg, do đó có hiệu quả ức chế phản ứng viêm và cải thiện hiệu quả bệnh viêm.

Ví dụ 9: Tác dụng của *L. reuteri* NK33 trong việc giảm căng thẳng

Từ ngày thứ 7 sau khi bắt đầu quy trình gây căng thẳng do bất động liên quan đến chuột đã bị căng thẳng do bất động như trong ví dụ thí nghiệm 1 ở trên, 1×10^9 cfu của vi khuẩn lactic *L. reuteri* NK33 hoặc dung dịch muối sinh lý được sử dụng cho chuột một lần mỗi ngày trong năm ngày. Theo ví dụ thí nghiệm 2-5, thí nghiệm đã được thực hiện trên chuột.

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 2, kết quả đã xác định được rằng, trong nhóm (IS) được sử dụng dung dịch muối sinh lý, OT và OE giảm trong bài kiểm tra mê cung được nâng

cao; thời gian ở vùng sáng giảm trong bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối; và hành vi vùi bi tăng lên trong thử nghiệm vùi bi. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy được rằng, trong nhóm (IS + LR) được cho sử dụng *L. reuteri* NK33, OT và OE tăng lên; thời gian ở vùng sáng tăng lên; và hành vi vùi bi giảm trong thử nghiệm vùi bi (Fig.14 (a)-(c)).

Kết quả cho thấy, trong nhóm (IS) dùng dung dịch muối sinh lý, hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm; và lượng corticosteron, IL-6, TNF- α và lipopolysacarit trong máu tăng lên. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy trong nhóm (IS + LR) được cho sử dụng *L. reuteri* NK33, hoạt tính NF- κ B (p-p65/p65) bị ức chế; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) tăng lên; và lượng corticosteron, IL-6, TNF- α và lipopolysacarit trong máu giảm (Fig.14 (d)-(g)):

Sau khi thực hiện ví dụ thí nghiệm 5, kết quả cho thấy trong nhóm (IS) được cho sử dụng dung dịch muối sinh lý, chiều dài của đại tràng, vốn là chỉ số của viêm đại tràng, giảm; myeloperoxidaza tăng lên; TNF- α của đại tràng tăng lên; biểu hiện của COX-2 và iNOS của đại tràng tăng lên; và hoạt tính NF- κ B tăng lên. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy rằng trong nhóm (IR) cũng được cho sử dụng *L. reuteri* NK33, chiều dài của đại tràng được phục hồi về mức bình thường; myeloperoxidaza giảm; TNF- α của đại tràng giảm; biểu hiện của COX-2 và iNOS của đại tràng giảm; và hoạt tính NF- κ B bị ức chế (Fig.15 (a)-(d)).

Kết quả trên cho phép xác định rằng vi khuẩn lactic *L. reuteri* NK33, có tác dụng tốt trong việc cải thiện chứng rối loạn tâm thần, như lo lắng, trầm cảm, căng thẳng và tương tự.

Ví dụ 10: Tác dụng của *B. adolescentis* NK98 trong việc giảm căng thẳng

Từ ngày thứ 7 sau khi bắt đầu quá trình gây căng thẳng do bất động cho chuột, chuột đã bị căng thẳng do bất động như trong ví dụ thí nghiệm 1 ở trên, 1×10^9 cfu của *B. adolescentis* NK98 (NK98), 1×10^9 cfu của *B. adolescentis* IM38 (IM38), dung dịch muối sinh lý (IS) hoặc 1 mg/kg Buspiron được cho chuột sử dụng một lần mỗi ngày trong ba ngày. Sau đó, theo các ví dụ thí nghiệm 2 và 5 ở trên, thí nghiệm đã được thực hiện.

(1) Bài kiểm tra mê cung được nâng cao

Cùng với bài kiểm tra mê cung được nâng cao của ví dụ thí nghiệm 2-(1) ở trên, lượng corticosteron (BC) trong máu đã được đo, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 10 sau đây.

Bảng 10

	Chuột lo lắng			Chuột trầm cảm		
	OT (%)	OE (%)	BC (ng/ml)	OT (%)	OE (%)	BC (ng/ml)
Đối chứng thường	17,1	35,2	0,8	18,2	38,5	0,7
IS	5,2	16,1	2,8	3,4	13,5	7,4
NK98	16,2	34,1	1,2	16,2	32,3	3,5
IM38	14,3	32,6	1,5	13,3	28,6	4,1
Buspiron	16,7	33,8	1,2	15,7	29,8	3,8

Như được trình bày trên bảng 10 ở trên, kết quả đã cho thấy rằng, trong nhóm (IS) của các mô hình căng thẳng do bất động được sử dụng dung dịch muối sinh lý, cả OT và OE đều giảm trong thử nghiệm mê cung được nâng cao so với nhóm đối chứng bình thường không bị căng thẳng do bất động. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy rằng, trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, thời gian dành cho cánh tay mở (OT) và tần suất đi vào cánh tay mở (OE) tăng lên; và lượng corticosteron trong máu giảm đáng kể, do đó cho thấy hiệu quả tốt hơn so với *B. adolescentis* IM38.

(2) Bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối

Theo ví dụ thí nghiệm 2-(2) ở trên, bài kiểm tra chuyển đổi sáng/tối đã được thực hiện, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 11 sau đây.

Bảng 11

	Thời gian ở vùng sáng (%)	Số lần chuyển
Đối chứng thường	46,5	23,5
IS	23,1	13,8
NK98	39,4	21,9

IM38	35,8	18,3
Buspiron	40,1	19,6

Như được trình trên bảng 11 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm (IS) mô hình căng thẳng do bất động được cho sử dụng dung dịch nước muối sinh lý, thời gian ở vùng sáng giảm so với nhóm đối chứng bình thường không bị căng thẳng do bất động, nhưng trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, thời gian ở vùng sáng tăng lên so với nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* IM38.

(3) Kiểm tra bơi cưỡng bức

Theo ví dụ thí nghiệm 2-(4) ở trên, bài kiểm tra bơi cưỡng bức đã được thực hiện, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 12 sau đây.

Bảng 12

	Thời gian bất động (%)
Đối chứng thường	28,5
IS	46,7
NK98	31,2
IM38	38,2
Buspiron	32,1

Như được trình bày trên bảng 12, kết quả đã cho thấy rằng trong nhóm (IS) mô hình chuột bị trầm cảm được cho sử dụng dung dịch nước muối sinh lý, thời gian bất động tăng so với nhóm đối chứng bình thường mà không bị căng thẳng do bất động, và trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, thời gian bất động giảm xuống so với nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* IM38.

(4) Bài kiểm tra treo đuôi (TST)

Theo ví dụ thí nghiệm 2- (5) ở trên, bài kiểm tra treo đuôi (TST) đã được thực hiện, trong đó kết quả của chúng được trình bày trên bảng 13 sau đây.

Bảng 13

	Thời gian bất động (%)
Đối chứng thường	21,5
IS	37,9
NK98	24,2
IM38	26,9
Buspiron	25,2

Như được thể hiện trên bảng 13 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm (IS) mô hình chuột bị trầm cảm được cho sử dụng dung dịch nước muối sinh lý, thời gian bất động tăng lên so với nhóm đối chứng bình thường mà không bị căng thẳng do bất động, nhưng trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, thời gian bất động giảm.

(5) Đo chỉ thị sinh học

Trong hai giờ sau khi thực hiện thí nghiệm hành vi cuối cùng trên chuột bị trầm cảm, chuột đã được gây mê và corticosteron trong máu được đo bằng phương pháp ELISA, và yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) và NF- κ B của não và NF- κ B của não của đại tràng được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch bằng phương pháp tương tự như trong ví dụ thí nghiệm 5 ở trên, trong đó các kết quả được trình bày trên bảng 14 sau đây.

Bảng 14

	Khả năng ức chế hoạt tính NF- κ B	Mức biểu hiện BDNF	Corticosteron trong máu (ng/ml)
Đối chứng thường			0,7
IS	-	-	7,4
NK98	+++	+++	3,5
IM38	++	++	4,1
Buspiron	-	-	3,8

* -, <10%; +, 10 ~ 30%; ++, 30 ~ 50%; +++, > 50%

Như được trình bày trên bảng 14 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm (IS) được cho sử dụng dung dịch muối sinh lý, hoạt tính của NF- κ B (p-p65/p65) tăng lên ở vùng hải mã; mức độ biểu hiện của yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) giảm; và lượng corticosteron trong máu tăng lên. Tuy nhiên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm được cho sử dụng NK98, hoạt tính của NF- κ B bị ức chế; mức độ biểu hiện của BDNF tăng lên; và lượng corticosteron trong máu giảm, hiệu quả như vậy tốt so với nhóm được cho sử dụng IM38.

(6) Hiệu quả cải thiện viêm đại tràng

Trong hai giờ sau khi thực hiện thí nghiệm hành vi cuối cùng trên chuột lo lắng trong ví dụ thí nghiệm 1, chuột đã được gây mê, và độ dài ruột và hoạt tính của MPO, COX-2, TNF- α và NF- κ B được đo bằng cùng một phương pháp như được trình bày trong ví dụ thí nghiệm 5, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 15 sau đây.

Bảng 15

	Chiều dài đại tràng (cm)	Khả năng ức chế MPO	Tỷ lệ ức chế chỉ số viêm		
			NF- κ B	COX-2	TNF- α
Đối chứng thường	6,2				
IS	5,1	-	-	-	-
NK98	5,7	+++	+++	+++	+++
IM38	5,5	+++	++	++	++
Buspiron	5,2	+	+	+	+

* -, <10%; +, 10 ~ 30%; ++, 30 ~ 50%; +++, > 50%.

Như được trình bày trên bảng 15 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm (IS) các mô hình căng thẳng do bất động được cho sử dụng dung dịch nước muối sinh lý, chiều dài đại tràng giảm và MPO cũng như các chỉ số viêm tăng so với nhóm đối chứng bình thường mà không bị căng thẳng do bất động, nhưng trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, chiều dài đại tràng được phục hồi, và khả năng ức chế MPO cũng như các chỉ số viêm được cải thiện.

(7) Tác dụng giảm căng thẳng do kháng sinh

Theo các ví dụ thí nghiệm 2 đến 5, thí nghiệm đã được thực hiện trên chuột đã bị căng thẳng do kháng sinh khi sử dụng ampicilin (100 mg/kg) trong hai ngày liên tiếp theo phương pháp tương tự như trong ví dụ thí nghiệm 1-(2) ở trên, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 16 và 17 sau đây.

Bảng 16

	Thời gian ở cánh tay mở (%)	Đi vào cánh tay mở (%)	Corticosteron trong máu (ng/ml)
Đối chứng thường	16,8	33,5	0,8
IS	4,9	13,4	3,2
NK98	14,3	30,5	1,6
IM38	12,9	29,2	1,9
Buspiron	14,1	31,3	1,6

Bảng 17

	Chiều dài đại tràng (cm)	Khả năng ức chế MPO	Tỷ lệ ức chế chỉ số viêm		
			NF- κ B	COX-2	TNF- α
Đối chứng thường	6,3				
IS	5,4	-	-	-	-
NK98	6,1	+++	+++	+++	+++
IM38	5,8	++	++	++	++
Buspiron	5,5	+	+	+	+

* -, <10%; +, 10 ~ 30%; ++, 30 ~ 50%; +++, > 50%

Như được trình bày trên bảng 16 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm (IS) các mô hình căng thẳng do kháng sinh được cho sử dụng dung dịch nước muối sinh lý, OT và OE giảm so với nhóm đối chứng bình thường trong bài kiểm tra mê cung được nâng cao, và trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, OT và tần số OE tăng lên đồng thời lượng

corticosteron trong máu giảm đáng kể, trong đó hiệu quả như vậy là tốt hơn so với *B. adolescentis* IM38.

Như được trình bày trên bảng 17 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm (IS) các mô hình căng thẳng do kháng sinh được cho sử dụng dung dịch nước muối sinh lý, chiều dài ruột giảm so với nhóm đối chứng bình thường, và MPO cũng như các chỉ số viêm tăng lên, nhưng trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, chiều dài đại tràng được phục hồi và khả năng ức chế MPO cũng như các chỉ số viêm được cải thiện.

Ví dụ 11: Tác dụng của *B. adolescentis* NK98 trong việc cải thiện chức năng nhận thức

Vào ngày tiếp theo sau khi tiêm trong màng bụng LPS phân lập từ *E. coli* (0,5 mg/kg/ngày) cho chuột trong năm ngày, vi khuẩn lactic đã được sử dụng và tác dụng của vi khuẩn lactic trong việc cải thiện chức năng nhận thức đã được xác định theo cách sử dụng bài kiểm tra nhận dạng đối tượng và bài kiểm tra mê cung chữ Y, và BDNF ở vùng hải mã được đo bằng phương pháp thấm miễn dịch, trong đó kết quả được trình bày trên bảng 18 sau đây.

Cụ thể là, dưới dạng phương pháp kiểm tra nhận dạng vật thể, hai vật thể (A, A') có cùng hình dạng và kích thước được cố định vào hộp (40 × 40 × 40 cm), trong đó bên ngoài không nhìn thấy được từ bên trong, sau đó chuột được phép bắt đầu di chuyển ở trung tâm của hộp, và sau đó số lần chạm vào hai vật thể được ghi lại trong 10 phút. Trong 24 giờ sau đó, một trong hai vật thể đã được thay thế bằng một vật thể mới (A, B), và sau đó số lần chạm vào vật thể cũ và vật thể mới đã được ghi lại và định lượng.

Ngoài ra, dưới dạng phương pháp bài kiểm tra mê cung chữ Y, thiết bị kiểm tra bao gồm ba cánh tay giống hệt nhau (chiều dài 8 cm, chiều rộng 30 cm, chiều cao 14 cm), mỗi vị trí ở góc nhất định 120°. Chuột được đặt ở cuối một cánh tay và được phép tự do di chuyển trong mê cung chữ Y trong tám phút, sau đó số lượng và thứ tự đi vào vào các cánh tay tương ứng được đo, để đánh giá sự thay đổi tự phát (%). Sự thay đổi được định nghĩa là thứ tự ký tự chữ cái, trong đó chuột được tuần tự nhập vào ba nhánh, tức là ABC, BCA, CAB, v.v...

$$\% \text{ thay đổi} = [\text{Tổng số lần thay đổi}] / [\text{Tổng số lần đi vào cánh tay} - 2] \times 100$$

Bảng 18

	Bài kiểm tra nhận dạng đối tượng (%)	Bài kiểm tra mê cung chữ Y (%)	Khả năng biểu hiện BDNF vùng hải mã
Đối chứng thường	52,1	76,5	
IS	38,5	56,7	-
NK98	48,6	68,4	+++
IM38	46,5	64,5	++
Buspiron	42,9	62,4	+

* -, <10%; +, 10 ~ 30%; ++, 30 ~ 50%; +++, > 50%

Như được trình bày trên bảng 18 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm được cho sử dụng *B. adolescentis* NK98, chức năng nhận thức được cải thiện và biểu hiện của BDNF tăng lên thông qua bài kiểm tra nhận dạng đối tượng và bài kiểm tra mê cung chữ Y.

Ví dụ 12: Hiệu quả giảm căng thẳng theo sự phối hợp của hai loại vi khuẩn lactic

Vi khuẩn lactic *L. reuteri* NK33, *B. adolescentis* IM38 (số truy nhập: KCCM11807P), vi khuẩn được đề xuất trong sáng chế Hàn Quốc có số công bố 10-2017-0090359, hoặc hỗn hợp của chúng được so sánh với nhau về tác dụng làm giảm căng thẳng.

Cụ thể là, dung dịch muối sinh lý (IS), 1×10^9 cfu *L. reuteri* NK33 (NK33), 1×10^9 cfu *B. adolescentis* IM38 (IM38) hoặc hỗn hợp của các vi khuẩn lactic nói trên (NK33 + IM38) mỗi loại $0,5 \times 10^9$ cfu được đưa vào mô hình động vật bị căng thẳng do bất động như trong ví dụ thí nghiệm 1-(1) ở trên, và sau đó bài kiểm tra mê cung được nâng cao đã được thực hiện. Tiếp đó, máu được thu thập từ mỗi nhóm, và sau đó đo lượng corticosteron trong máu, trong đó kết quả của chúng được trình bày trên bảng 19 sau đây.

Bảng 19

	Thời gian ở cánh tay mở (%)	Đi vào cánh tay mở (%)	Corticosteron trong máu (ng/ml)
Đối chứng thường	16,1	34,0	0,9
IS	5,4	16,1	2,4

NK33	14,1	33,5	1,4
IM38	14,8	31,5	1,5
NK33+IM38	17,3	36,5	1,2

Như được trình bày trên bảng 19 ở trên, kết quả cho thấy rằng trong nhóm được sử dụng đồng thời hai loại vi khuẩn lactic, thời gian dành cho các cánh tay mở cũng như đi vào các cánh tay mở tăng lên, và lượng corticosteron trong máu giảm đáng kể so với nhóm chỉ được cho sử dụng một loại vi khuẩn lactic.

Ngoài ra, tác dụng của hỗn hợp *L. reuteri* NK33 và *B. adolescentis* NK98 trong việc giảm căng thẳng được so sánh bằng phương pháp tương tự như trong thí nghiệm về sử dụng đồng thời NK33 và IM38 ở trên, trong đó các kết quả được trình bày trên bảng 20 sau đây.

Bảng 20

	Thời gian ở cánh tay mở (%)	Đi vào cánh tay mở (%)	Corticosteron trong máu (ng/ml)
Đối chứng thường	18,1	34,2	0,9
IS	5,5	17,1	2,9
NK33	14,1	33,5	1,4
NK98	16,8	33,3	1,3
NK33+NK98	18,5	38,2	1,1

Như được trình bày trên bảng 20 ở trên, kết quả đã cho thấy rằng thời gian dành cho cánh tay mở cũng như đi vào cánh tay mở tăng lên, và lượng corticosteron trong máu giảm đáng kể so với nhóm chỉ được cho sử dụng một loại vi khuẩn lactic riêng lẻ.

Thông tin truy nhập của vi khuẩn lactic

Các tác giả sáng chế đã ký gửi *L. reuteri* NK33 với mục đích đăng ký cấp bằng sáng chế cho Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc, một tổ chức lưu ký được chứng nhận (địa chỉ: Yulim Building, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc) vào ngày 04 tháng 8 năm 2017, và đã nhận được số truy nhập KCCM12090P.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã ký gửi *B. adolescentis* NK98 với mục đích đăng ký cấp bằng sáng chế cho Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc, một tổ chức lưu ký được chứng nhận (địa chỉ: Yulim Building, 45, Hongjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, Hàn Quốc) vào ngày 03 tháng 8 năm 2018, và đã nhận được số truy nhập KCCM12297P.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).
2. *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P) theo điểm 1, trong đó *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P) bao gồm trình tự rADN 16S của trình tự định danh số 1 (SEQ ID NO: 1).
3. Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, được phẩm chứa *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).
4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P) là tế bào vi khuẩn sống của chúng, tế bào vi khuẩn chết của chúng, sản phẩm nuôi cấy của chúng, sản phẩm nghiền của chúng, hoặc chất chiết của chúng.
5. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dược phẩm bao gồm thêm *B. adolescentis* IM38 (KCCM11807P).
6. Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh về tâm thần, cụ thể hơn, bệnh về tâm thần là bệnh thoái hóa thần kinh hoặc rối loạn tâm thần, trong đó dược phẩm chứa *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).
7. Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh rối loạn tâm thần, cụ thể hơn, bệnh rối loạn tâm thần là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm lo lắng, trầm cảm, rối loạn tâm trạng, mất ngủ, rối loạn ảo giác, rối loạn ám ảnh, đau nửa đầu, căng thẳng, rối loạn trí nhớ, rối loạn nhận thức và rối loạn chú ý, trong đó dược phẩm chứa *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).
8. Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, cụ thể hơn, bệnh thoái hóa thần kinh là một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh thoái hóa tiểu não, hội chứng Tourette, mất điều hòa vận động Friedrich, bệnh Machado-Joseph, mất trí nhớ, loạn trương lực cơ và liệt trên nhân tiến triển, trong đó dược phẩm chứa *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).
9. Dược phẩm theo một trong các điểm 3 đến 8, trong đó dược phẩm bao gồm thêm *Bifidobacterium adolescentis* NK98 (KCCM12297P).

10. Dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh viêm, trong đó dược phẩm bao gồm *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm bao gồm thêm *Bifidobacterium adolescentis* NK98 (KCCM12297P).

12. Thực phẩm chức năng để phòng hoặc cải thiện bệnh về tâm thần, thực phẩm chức năng bao gồm *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).

13. Thực phẩm chức năng theo điểm 12, trong đó thực phẩm chức năng còn bao gồm *Bifidobacterium adolescentis* NK98 (KCCM12297P).

14. Thực phẩm chức năng để phòng hoặc cải thiện bệnh viêm, trong đó thực phẩm bao gồm *Lactobacillus reuteri* NK33 (KCCM12090P).

15. Thực phẩm chức năng theo điểm 14, trong đó thực phẩm chức năng bao gồm thêm *Bifidobacterium adolescentis* NK98 (KCCM12297P).

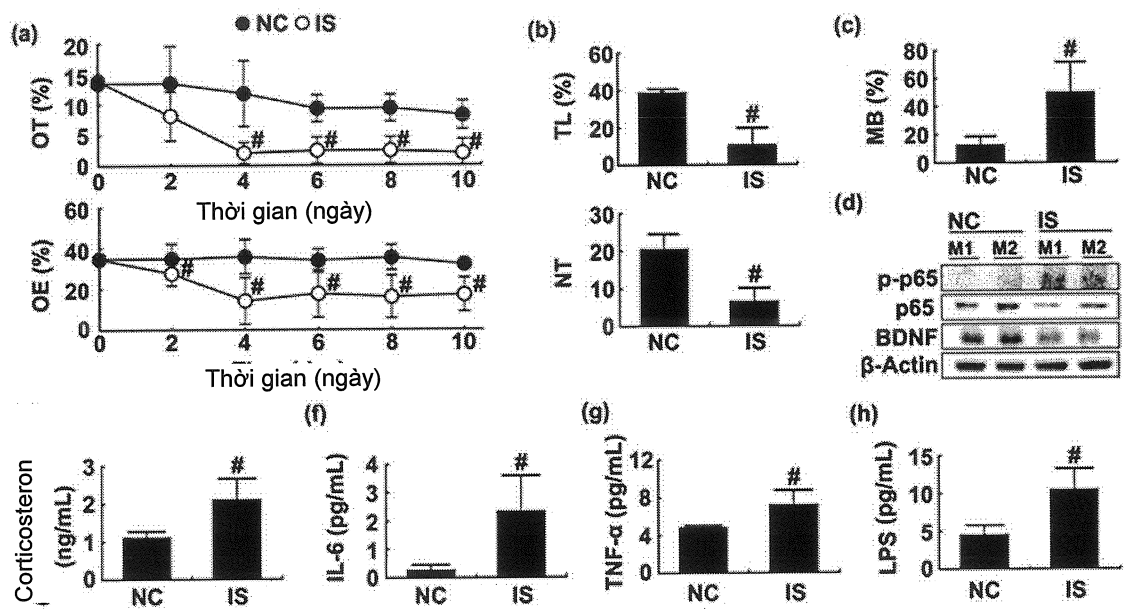


Fig.1

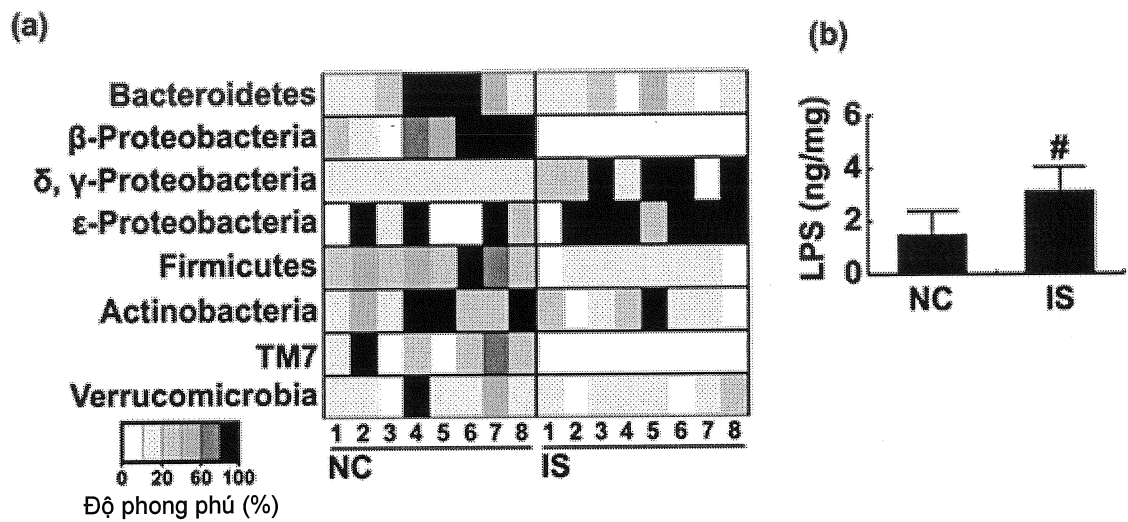


Fig.2

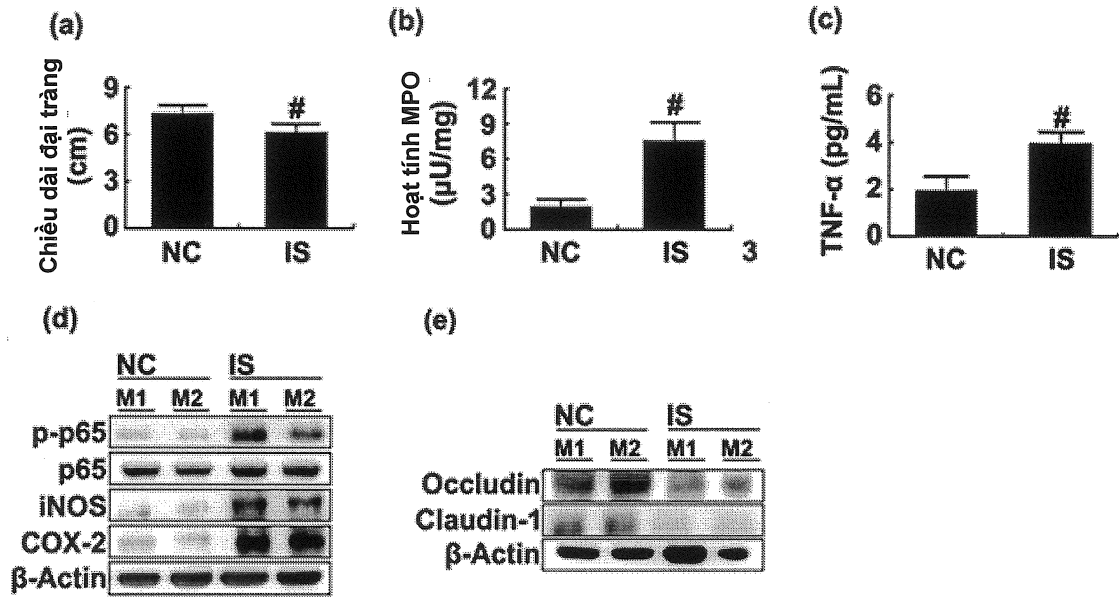


Fig.3

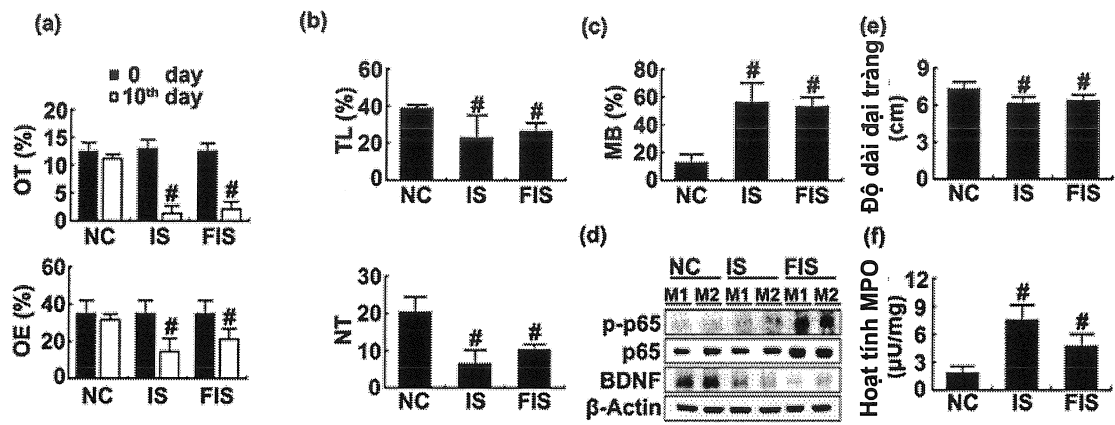


Fig.4

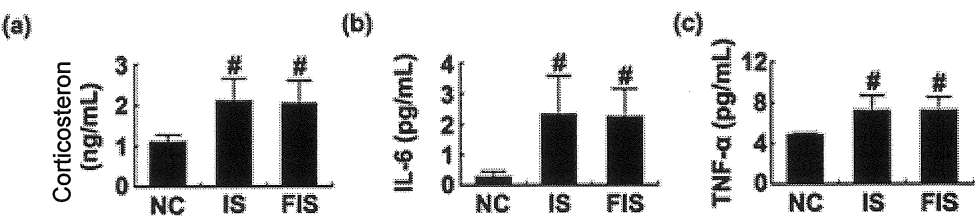


Fig.5

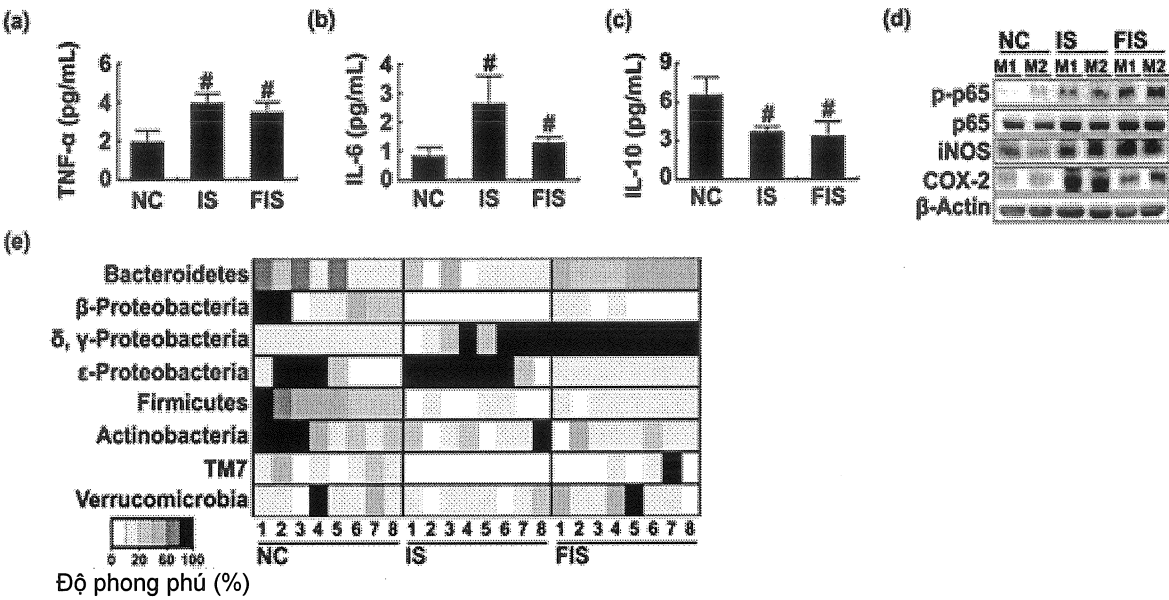


Fig.6

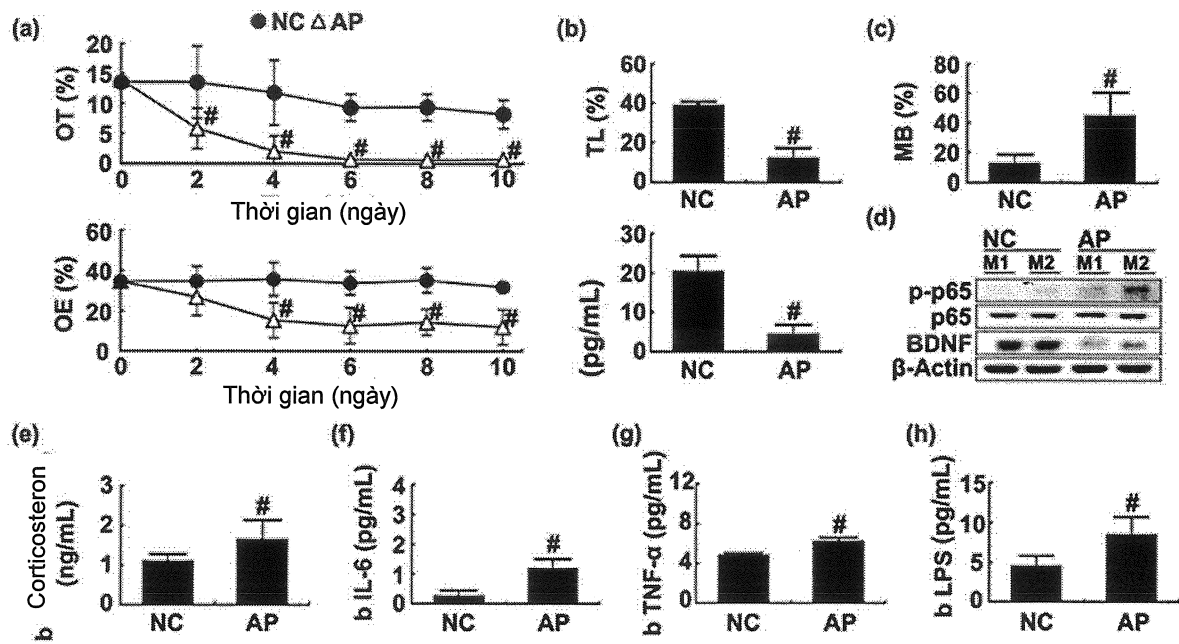


Fig.7

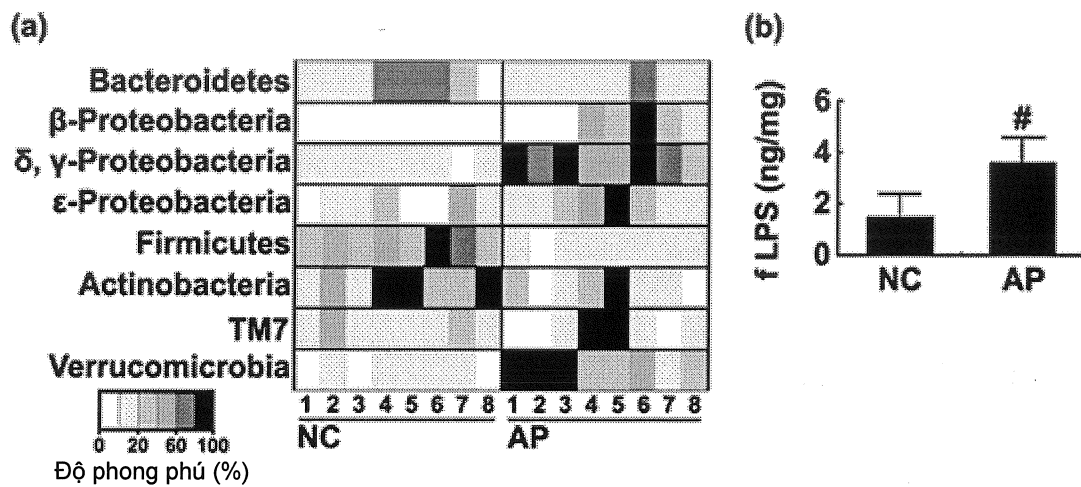


Fig.8

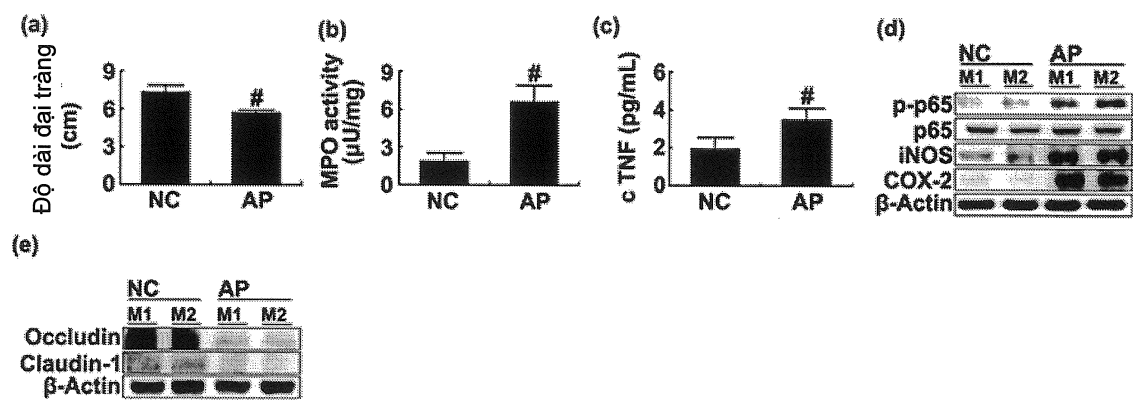


Fig.9

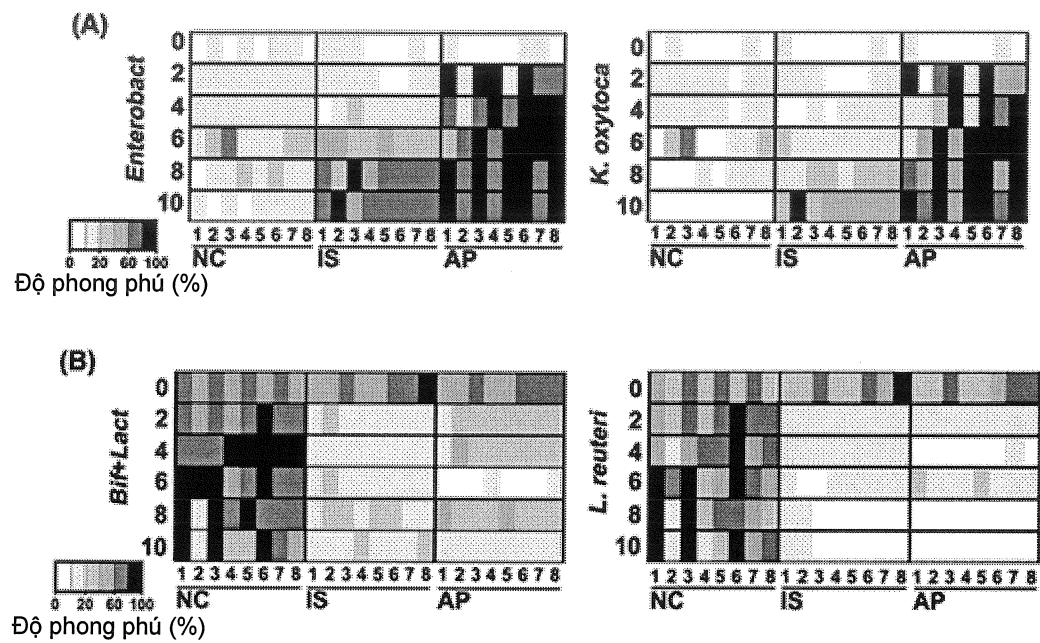


Fig.10

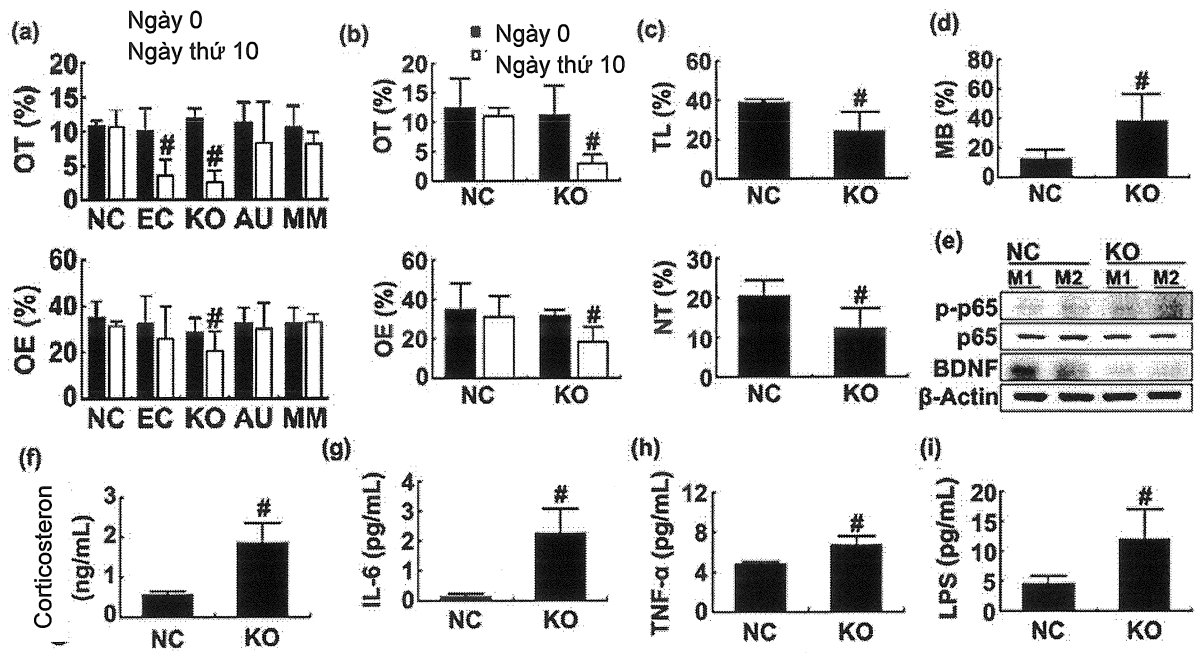


Fig.11

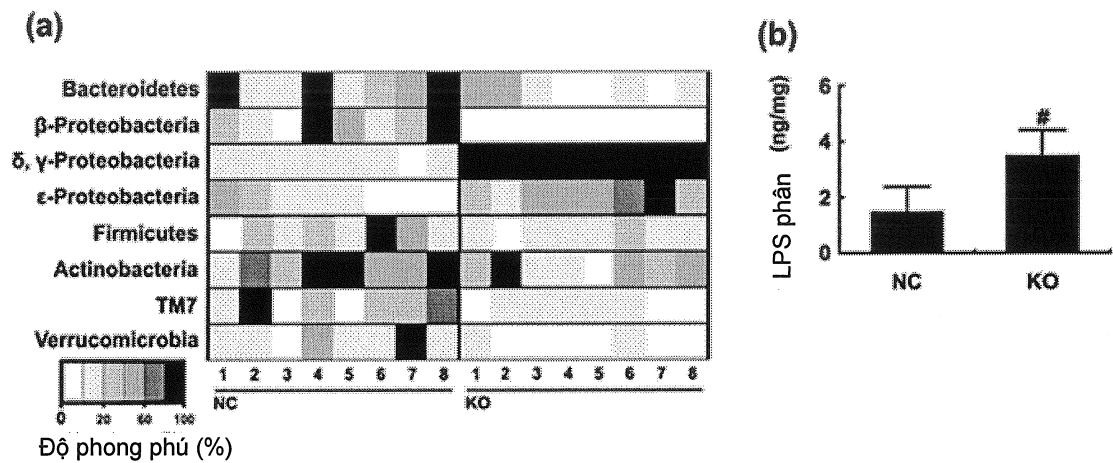


Fig.12

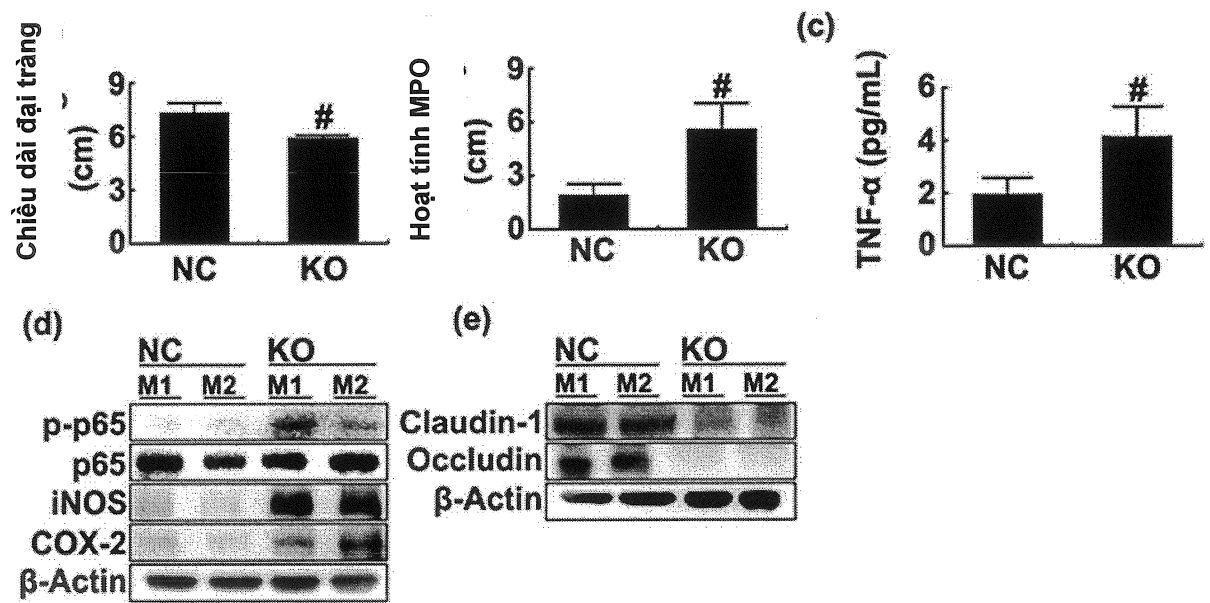


Fig.13

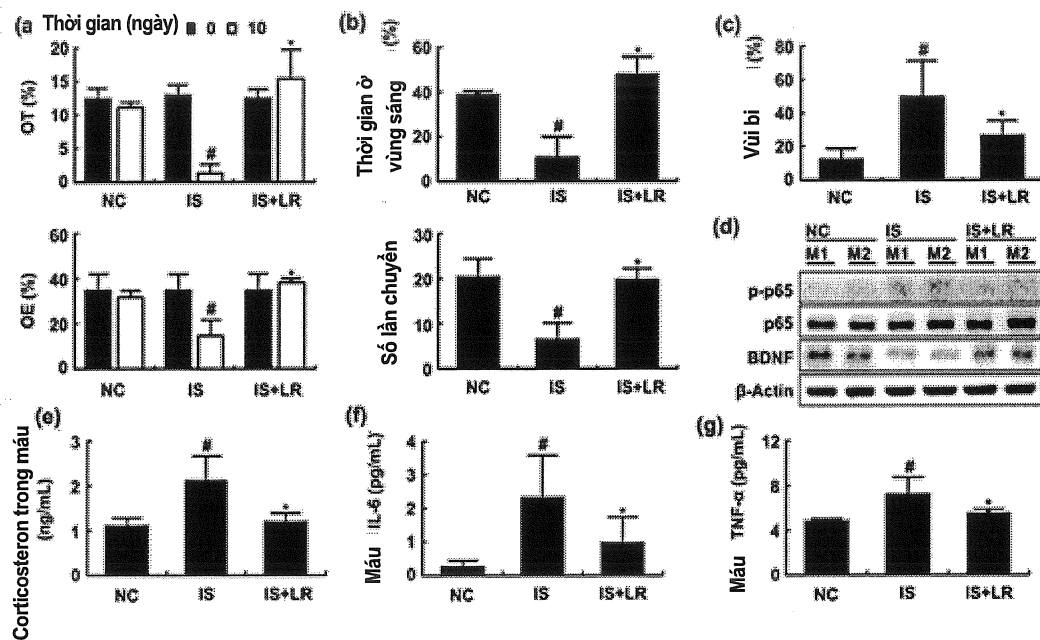


Fig.14

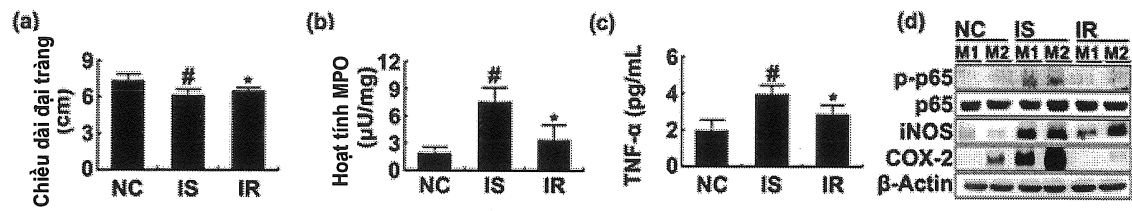


Fig.15