



(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)



1-0042511

(51)^{2021.01} A61P 25/00; A61K 35/747; C12R 1/25; (13) B
C12N 1/20; C12R 1/225; A23L 33/135

(21) 1-2022-03494

(22) 06/11/2020

(86) PCT/SE2020/051075 06/11/2020

(87) WO 2021/091474 14/05/2021

(30) 1951292-0 08/11/2019 SE

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/08/2022 413

(73) BIOGAIA AB (SE)

Kungsboplan 3, 112 27 Stockholm, Sweden

(72) GRASSET, Estelle (FR); KHAN, Muhammad (SE); MÖLLSTAM, Bo (SE); ROOS, Stefan (SE).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC CHỦNG VI KHUẨN ĐỂ SỬ DỤNG TRONG ĐIỀU
TRỊ BỆNH LIÊN QUAN ĐẾN THIẾU HỤT SEROTONIN VÀ CHỦNG VI
KHUẨN SẢN SINH SEROTONIN

(21) 1-2022-03494

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin bằng cách nuôi cấy vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus*, trong các điều kiện hiếu khí, trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan. Serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường nuôi cấy được phát hiện và chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được chọn là có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy. Sáng chế còn đề cập đến chủng vi khuẩn sản sinh serotonin.

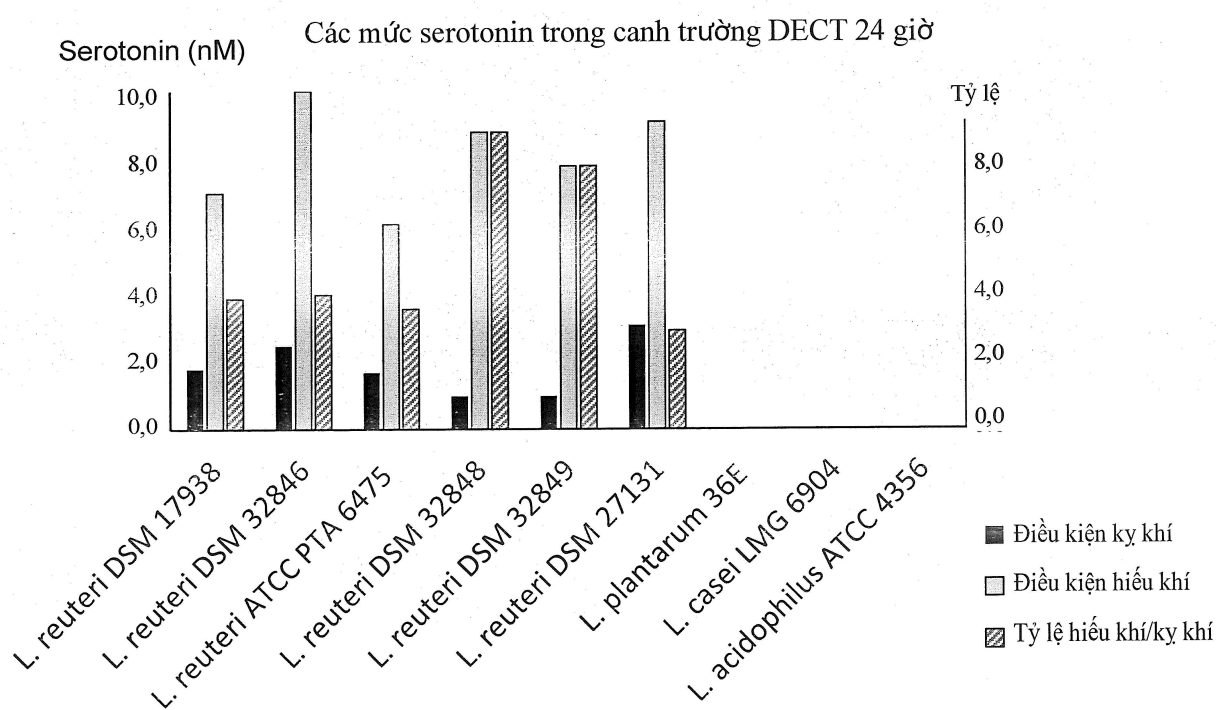


Fig.1A

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến vi khuẩn sinh axit lactic, và cụ thể hơn đề cập đến việc sàng lọc vi khuẩn sinh axit lactic để sản sinh serotonin và sử dụng vi khuẩn sinh axit lactic như vậy trong điều trị thiếu hụt serotonin và trong điều trị các rối loạn và bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đã xác định rõ ràng rằng sự tương tác giữa vật chủ và hệ vi khuẩn đường ruột là cơ sở cho sức khỏe và hạnh phúc của vật chủ. Hệ vi khuẩn đường ruột sinh ra các chất chuyển hóa không những cung cấp chất dinh dưỡng cho vật chủ mà còn có thể tham gia vào đáp ứng miễn dịch và điều hòa và phát triển hệ miễn dịch của vật chủ.

Lactobacilli và các vi khuẩn sinh axit lactic khác như bifidobacteria thường được dùng làm probiotic trong nhiều loại thực phẩm, ví dụ như sữa chua. Sự sinh trưởng và xâm chiếm của vi sinh vật có hại có thể được ngăn chặn bởi các vi khuẩn sinh axit lactic này nhờ sự xâm chiếm của chính chúng bên trong hệ sinh thái đường ruột, chẳng hạn thông qua sự hình thành các màng sinh học, thông qua sự cạnh tranh các chất dinh dưỡng có sẵn và/hoặc thông qua sự sản sinh các cơ chất đặc hiệu như hydro peroxit, kháng sinh vi khuẩn và/hoặc axit hữu cơ, bao gồm axit lactic và axit axetic, làm giảm độ pH của ruột.

Serotonin, hoặc 5-hydroxytryptamin (5-Ht), là một amin sinh học được tổng hợp từ axit amin thơm tryptophan, có một vài chức năng sinh lý bao gồm về hành vi, kích hoạt và ngưng tập tiểu cầu, vận chuyển đường ruột, trưởng thành, phát triển, cân bằng nội môi và hoạt động của hệ thần kinh ruột (enteric nervous system - ENS), hoạt động của hệ miễn dịch đường ruột, chuyển hóa năng lượng (thích ứng khi đói, hóa nâu và phân giải lipid của mô mỡ, sản xuất glucoza ở gan, tiết insulin), hoạt động của trực ruột - não và chuyển hóa xương và cân bằng nội môi. Ở người, serotonin được tìm thấy chủ yếu trong đường dạ dày-ruột (gastrointestinal - GI), trong tiểu cầu của máu, và trong hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS). Trong tế bào động vật có vú, sự sản sinh serotonin được kích hoạt bởi enzym giới hạn tỷ lệ tryptophan hydroxylaza (TPH), mà tạo ra 5-

hydroxytryptophan (5-HTP). 5-HTP là tiền chất trung gian của serotonin và được chuyển hóa thành serotonin bởi enzym axit amin L thơm decarboxylaza (aromatic L-amino-acid decarboxylase - AADC). Có hai đồng phân của TPH; TPH1 được biểu hiện chủ yếu ở các mô ngoại vi, trong khi đó TPH2 được biểu hiện chủ yếu ở não (CNS) và trong các neuron ENS. TPH1 là enzym chịu trách nhiệm cho hầu hết sự sản sinh serotonin nội sinh, và enzym này được biểu hiện bởi tế bào nội tiết chuyên hóa cao trong đường GI, gọi là tế bào enterochromaffin (EC). Đã được chứng minh rõ ràng rằng hệ vi khuẩn đường ruột tham gia vào việc điều hòa sự sản sinh serotonin nội sinh ở vật chủ bằng cách truyền tín hiệu chuyển hóa đến tế bào EC. Các chất chuyển hóa, chẳng hạn các axit béo mạch ngắn và axit mật thứ cấp, từ hệ vi khuẩn đường ruột đã được thấy là gây ra sự biểu hiện của TPH1 ở tế bào EC của chuột, và tương ứng là, mức serotonin được sản sinh nội sinh được điều hòa trực tiếp bởi các vi khuẩn này. Kết quả là, mức serotonin trong huyết thanh bị giảm đáng kể ở chuột được nuôi trong điều kiện không có sự khu trú của vi khuẩn, chẳng hạn ở chuột không có vi sinh vật (germ-free - GF) so với ở các động vật đối chứng có sự khu trú của hệ vi khuẩn thông thường.

Thiếu hụt serotonin xảy ra khi cơ thể không có đủ serotonin, điều này có thể xảy ra vì một số lý do. Thiếu hụt serotonin cục bộ ở ruột hoặc ở cơ quan còn lại gây ra các tình trạng bệnh lý bao gồm trầm cảm, lo âu, rối loạn ám ảnh - cưỡng chế, hội chứng ruột kích thích, bệnh tim mạch, chứng loãng xương, nhu động đường tiêu hóa bất thường, ngưng tập tiểu cầu bất thường, kích hoạt tiểu cầu bất thường, và đáp ứng miễn dịch bất thường. Do đó, thiếu hụt serotonin đưa đến nguy cơ về sức khỏe. Các thuốc khác nhau đã được phát triển để điều trị thiếu hụt serotonin, chẳng hạn các thuốc ức chế tái hấp thu serotonin có chọn lọc (selective serotonin reuptake inhibitor - SSRI) và thuốc ức chế monoamin oxidaza (MAO). Tuy nhiên, các thuốc này thường đi kèm với nhiều hoặc ít tác dụng phụ nghiêm trọng, chẳng hạn tiêu chảy, táo bón, mất ngủ, chóng mặt, và khô miệng. Ngoài ra, các thuốc này không phù hợp cho mọi người và SSRI, chẳng hạn, không nên dùng cho phụ nữ có thai, khi cho con bú, người dưới 18 tuổi, người mắc bệnh tiểu đường, động kinh, hoặc bệnh thận. Ngoài ra, cả SSRI và thuốc ức chế MAO có thể tương tác với các thuốc khác, chẳng hạn các thuốc giảm đau, thuốc chống trầm cảm khác, cũng như các thuốc điều trị cảm lạnh và dị ứng, và do đó có thể gây ra phản ứng có hại nghiêm trọng. Các thuốc ức chế MAO cũng có thể tương tác với một số thực phẩm và đồ uống gây ra huyết áp cao nguy hiểm. Các đặc tính này làm cho các thuốc điều trị thiếu hụt serotonin đã biết không phù hợp cho

nhóm lớn các bệnh nhân và do đó có nhu cầu cao về việc đưa ra các thuốc điều trị thay thế có hiệu quả đối với tình trạng thiếu hụt serotonin, hoặc các rối loạn đi kèm với thiếu hụt serotonin có ít hoặc không có tác dụng phụ.

Cùng với đó, có nhu cầu về các phương pháp an toàn có thể làm tăng mức serotonin ở các bệnh nhân mắc thiếu hụt serotonin và có thể được sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chung là sàng lọc các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Mục đích cụ thể là sàng lọc các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic có khả năng sản sinh serotonin cục bộ trong đường tiêu hóa ở nhiều ngách được oxy hóa của ruột, chẳng hạn gần niêm mạc.

Mục đích này và các mục đích khác được đáp ứng bởi các phương án được bộc lộ trong sáng chế.

Sáng chế được xác định ở các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập. Các phương án khác của sáng chế được xác định ở các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc.

Một khía cạnh của các phương án đề xuất phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin. Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy, trong các điều kiện hiếu khí, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan. Phương pháp này còn bao gồm bước phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó. Phương pháp này còn bao gồm bước chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó.

Một khía cạnh khác của các phương án đề xuất phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin. Phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật ăn vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic. Phương pháp này còn bao gồm bước phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic

trong mẫu cơ thể lấy từ đối tượng *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật. Phương pháp này còn bao gồm bước chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong mẫu cơ thể.

Một khía cạnh khác của các phương án đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong các điều kiện hiếu khí để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng.

Các khía cạnh khác của các phương án đề xuất *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, *Lactobacillus mucosae* DSM 33292, *Lactobacillus mucosae* DSM 33293, *Lactobacillus mucosae* DSM 33661, *Lactobacillus reuteri* DSM 33509, *Lactobacillus reuteri* DSM 33632, *Lactobacillus reuteri* DSM 33633, *Lactobacillus reuteri* DSM 33634, *Lactobacillus reuteri* DSM 33635, *Lactobacillus plantarum* DSM 33295, và *Lactobacillus plantarum* DSM 33662 và việc sử dụng chúng làm thuốc và để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic được chọn lọc theo các phương án có thể sản sinh serotonin trong hệ tiêu hóa của động vật có vú. Cụ thể, các chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn lọc theo sáng chế có khả năng sản sinh serotonin trong điều kiện có nhiều ngách được oxy hóa của ruột, ví dụ gần lớp đệm biểu mô của ruột nơi các thụ thể serotonin và/hoặc chất vận chuyển serotonin (serotonin transporter - SERT) được biểu hiện và cũng là nơi có các tế bào nội tiết ruột, chẳng hạn tế bào enterochromaffin. Serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn này có hoạt tính sinh học và có tác dụng cục bộ trong đường tiêu hóa nhưng cũng có thể có tác dụng ngoại vi đối với hệ tiêu hóa. Do đó, serotonin được sản sinh bởi các chủng vi khuẩn trong ruột có thể được sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án này, cùng với các mục đích và ưu điểm khác của chúng, có thể được hiểu rõ nhất bằng cách tham chiếu đến phần mô tả sau đây cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1. Đánh giá sự sản sinh serotonin bởi các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic. (A) Các mức serotonin đo được trong môi trường nuôi cấy (canh trường) của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, và *Lactobacillus acidophilus* sau khi nuôi cấy chúng trong các điều kiện kỵ khí và hiếu khí trong canh trường decarboxylaza (DECT) biến đổi bởi tryptophan. Tất cả các chủng vi khuẩn *L. reuteri* được thử nghiệm đều được thấy là sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí, và chúng được thấy là sản sinh serotonin thậm chí là nhiều hơn trong các điều kiện hiếu khí, trong khi đó không thấy có sự sản sinh serotonin bởi các chủng vi khuẩn *L. plantarum* 36E, *L. casei* LMG 6904, và *L. acidophilus* ATCC 4365 ở điều kiện bất kỳ trong các điều kiện tương ứng *in vitro*. Tỷ lệ giữa sản sinh serotonin hiếu khí và kỵ khí được tính đối với mỗi chủng vi khuẩn. Tất cả các chủng vi khuẩn *L. reuteri* được nghiên cứu đều là các chủng sản sinh serotonin tốt hơn trong các điều kiện hiếu khí *in vitro* so với trong các điều kiện kỵ khí. (B) Nồng độ serotonin trong huyết thanh được đo trong các mẫu máu thu được từ tĩnh mạch chủ của chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật (GF), và từ chuột *Tph1*^{-/-} GF được cho ăn (được cấy) *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 27131 hoặc *L. casei* LMG 6904 (n=3-6/nhóm). Dữ liệu trên đồ thị được trình bày dưới dạng các biểu đồ hộp, và mỗi chấm biểu thị một con chuột, thể hiện phạm vi lớn nhất, nhỏ nhất, trung bình và khoảng tứ phân vị. Đồ thị này thể hiện rằng các mức serotonin, rất thấp ở các con chuột *Tph1*^{-/-} GF, được phục hồi ở các con chuột này sau khi cấy bằng các chủng vi khuẩn *L. reuteri*. Tuy nhiên, không quan sát thấy sự tăng mức serotonin trong các mẫu huyết thanh thu được từ các con chuột được cấy bằng *L. casei* LMG 6904, chỉ ra rằng chủng vi khuẩn này không sản sinh serotonin *in vivo*. Mức độ chuẩn của mỗi nhóm được phân tích trước khi đánh giá ý nghĩa thống kê bằng kiểm định t Student (nếu dữ liệu được phân bố bình thường) hoặc kiểm định Mann-Whitney. Khi so sánh nhiều hơn hai nhóm, dữ liệu được phân tích nhờ sử dụng Anova một chiều sau đó là các kiểm định đa so sánh post hoc Tukey nếu dữ liệu được phân bố bình thường, nếu không thì kiểm định Kruskal-Wallis sau đó là đa so sánh post hoc Dunn được thực hiện. Mức có ý nghĩa thống kê được đặt ở *p<0,05.

Fig.2 Serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn có tác dụng cục bộ trong đường tiêu hóa và là quan trọng cho sự trưởng thành của hệ thần kinh ruột (enteric nervous system - ENS) và sự phân bố dây thần kinh trong hạch trong ruột kết gần. Các đồ thị minh họa vùng dương tính với serotonin trong đám rối thần kinh cơ dọc ruột kết (LMMP) (A, D); vùng dương

tính với PGP9.5 của hóc trong ruột kết (B, E); và vùng dương tính với TUJ1 trong hóc trong ruột kết (C, F). (A-C) GF trong các đồ thị biểu thị các con chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật; CONV-D 3d và CONV-D 14d lần lượt biểu thị các con chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật được cấy bằng manh tràng chuột *Tph1*^{+/+} trong 3 hoặc 14 ngày; CONV-R biểu thị các con chuột *Tph1*^{-/-} có hệ vi khuẩn bình thường; và DECT-colonized 14 d biểu thị các con chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật được cấy bằng các chất trong manh tràng chuột, đã được nuôi cấy trong 48 giờ trong DECT trước khi cấy (n=3-6/nhóm). Các kết quả trong D-F biểu thị dữ liệu thu được từ chuột GF *Tph1*^{-/-}, vào 14 ngày sau khi cấy bằng *L. reuteri* DSM 27131 hoặc *L. casei* LMG 6904 (n=3-6/nhóm). (A) Dữ liệu này thể hiện rằng việc cấy bằng hệ vi khuẩn trong manh tràng chuột làm tăng mức serotonin trong các noron ruột của ruột kết gần so với mức serotonin trong ENS của chuột GF *Tph1*^{-/-}. Các mức serotonin trong ENS sau 3 ngày được phục hồi gần đến mức tương tự như ở chuột CONV-R. (B, C) Dữ liệu cũn thể hiện rằng sự có mặt của hệ vi khuẩn trong manh tràng chuột trong đường tiêu hóa làm tăng các dấu chuẩn đã được xác định rõ của các noron ruột trưởng thành (PGP9.5 và Tuj1). Dữ liệu ở D thể hiện rằng các mức serotonin cũng được tăng lên trong các noron ruột của ruột kết gần sau khi cấy bằng chủng vi khuẩn probiotic đơn, *L. reuteri* DSM 27131, trong khi *L. casei* LMG 6904 không có tác dụng đối với các mức serotonin trong noron ruột. Ngoài ra, việc cấy bằng *L. reuteri* DSM 27131 làm tăng sự trưởng thành của các noron ruột, như được thấy bởi các dấu chuẩn PGP9.5 và Tuj1 (E, F), trong khi *L. casei* LMG 6904 không có tác dụng trên hai dấu chuẩn này đối với sự trưởng thành của noron ruột. Dữ liệu được trình bày trong các biểu đồ hộp thể hiện phạm vi lớn nhất, nhỏ nhất, trung bình và khoảng tứ phân vị. Mỗi chấm biểu thị một con chuột. Mức độ chuẩn của mỗi nhóm được phân tích trước khi đánh giá ý nghĩa thống kê bằng kiểm định t Student (nếu dữ liệu được phân bố bình thường) hoặc kiểm định Mann-Whitney. Nếu so sánh nhiều hơn hai nhóm, dữ liệu được phân tích nhờ sử dụng Anova một chiều sau đó là các kiểm định đa so sánh post hoc Tukey nếu dữ liệu được phân bố bình thường, nếu không thì kiểm định Kruskal-Wallis sau đó là đa so sánh post hoc Dunn được thực hiện. Mức có ý nghĩa thống kê được đặt ở *p<0,05; **p<0,01.

Fig.3 Sự sản sinh serotonin bởi các chủng vi khuẩn được phân lập từ người cho. Trong tổng số 199 chủng phân lập thu được từ hai người cho, 24 chủng phân lập, như thể hiện trong đồ thị, được thấy là sản sinh serotonin các điều kiện kỵ khí và/hoặc hiếu khí *in vitro*. Tổng số sáu chủng phân lập từ người cho #1 và một chủng phân lập từ người cho #2

được thấy là sản sinh nhiều hơn 1 nM serotonin trong canh trường DECT trong các điều kiện kỵ khí *in vitro*, trong khi cả sáu chủng phân lập từ người cho #1, và 15 chủng phân lập từ người cho #2 sản sinh nhiều hơn 1 nM serotonin trong các điều kiện hiếu khí. Thú vị là, phần lớn các chủng này được thấy là sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí nhiều hơn gần gấp hai lần so với trong các điều kiện kỵ khí. Phân tích giải trình tự nhận dạng chủng phân lập sản sinh serotonin là các chủng *L. mucosae* (n=13), *L. plantarum* (n=6), và *Enterococcus* (n=1). Bốn chủng phân lập không thể nhận dạng được, nhưng các chủng phân lập này có mối quan hệ gần gũi với các chủng vi khuẩn *Escherichia*, *Shigella*, hoặc *Brenneria*.

Fig.4 Các chủng vi khuẩn ở người được phân lập chọn lọc sản sinh serotonin chức năng *in vivo*. Hai trong số các chủng vi khuẩn được phân lập từ người cho, được thấy là sản sinh serotonin *in vitro* trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí, *L. plantarum* DSM 33662 và *L. mucosae* DSM 33661, được chọn lọc và sử dụng để cấy cho chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật. Đồ thị thể hiện rằng các chủng vi khuẩn này làm tăng các mức serotonin *in vivo*, cả cục bộ trong lòng ống ruột (A) và còn trong tuần hoàn toàn thân (các mẫu huyết thanh) (B) khi so với các mức phát hiện trong chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật. Ngoài ra, cả hai chủng đều làm tăng vùng dương tính với serotonin trong ENS của ruột kết gần (C). Các chủng vi khuẩn này do đó có khả năng làm tăng các mức serotonin cục bộ trong lòng ống ruột (manh tràng) *in vivo* và serotonin được sản sinh cục bộ này có hoạt tính sinh học và có thể được vận chuyển vào hệ tuần hoàn toàn thân (huyết thanh) và vào các noron của hệ thần kinh ruột của ruột kết gần. Dữ liệu được trình bày trong các biểu đồ hộp thể hiện phạm vi lớn nhất, nhỏ nhất, trung bình và khoảng tứ phân vị. Mỗi chấm biểu thị một con chuột.

Fig.5 là lưu đồ minh họa phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn theo một phương án.

Fig.6 là lưu đồ minh họa các bước tùy ý bổ sung cho phương pháp thể hiện trên Fig. 5 theo một phương án.

Fig.7 là lưu đồ minh họa một bước tùy ý, bổ sung cho phương pháp thể hiện trên Fig. 5 theo một phương án.

Fig.8 là lưu đồ minh họa phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn theo một phương án khác.

Fig.9 Hai chủng *Lactobacillus reuteri* mà không sinh trưởng tốt trong các điều kiện hiếu khí, chủng A và chủng B, được thử thách bằng oxy trong quá trình nuôi cấy để tiến hóa thành các chủng mới chịu được oxy hơn. Hai chủng mới, *L. reuteri* DSM 33632 và DSM 33634, có nguồn gốc lần lượt từ chủng A và chủng B, được nhận dạng bằng phương pháp này. Sự sinh trưởng bởi các chủng vi khuẩn được xác định bằng cách đo mật độ quang (optical density - OD) ở 24 giờ nuôi cấy, và cả hai chủng mới đã cải thiện đáng kể OD trong các điều kiện hiếu khí khi so với các chủng (A). Sự cải thiện sinh trưởng này ổn định cho tới 100 thế hệ (B, C). Các chủng vi khuẩn mới, chịu được oxy hơn này được thử thách tiếp bằng một số vòng ứng suất oxy nữa để tiếp tục tiến hóa thành các chủng chịu được oxy tốt hơn nữa, và còn với một bước đông khô bổ sung và stress bảo quản tăng. Các bước stress bổ sung này đưa đến việc nhận dạng và chọn lọc hai chủng vi khuẩn mới bổ sung, *L. reuteri* DSM 33633, có nguồn gốc từ DSM 33632, và *L. reuteri* DSM 33635, có nguồn gốc từ DSM 33634. Hai chủng mới này thể hiện các đặc tính sinh trưởng được cải thiện một chút trong các điều kiện hiếu khí khi so với DSM 33632 và DSM 33634, cũng như các đặc tính sinh trưởng được cải thiện đáng kể trong các điều kiện hiếu khí khi so với chủng A và chủng B (D).

Fig.10 thể hiện khả năng bám dính vào chất nhầy của các chủng vi khuẩn sinh axit lactic sản sinh serotonin *L. reuteri* DSM 27131, DSM 32465, DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, DSM 33635, và DSM 33509, *L. mucosae* DSM 33291, DSM 33292, DSM 33293, và DSM 33661, và *L. plantarum* DSM 33662. *L. reuteri* DSM 27131, có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí *in vitro* và có thể góp phần vào nhóm serotonin toàn thân *in vivo*, cũng có khả năng gắn vào chất nhầy (A, B). Sự bám dính vào chất nhầy cũng được thấy ở tất cả các chủng khác được thử nghiệm *L. reuteri*, *L. mucosae* và *L. plantarum* (A, B). Các kết quả này chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn sản sinh serotonin cũng có thể gắn vào niêm mạc ruột.

Mô tả chi tiết sáng chế

TPH1 là enzym chịu trách nhiệm cho việc sản sinh serotonin nội sinh trong đường tiêu hóa. Mặc dù vậy, vẫn còn một ít serotonin khi gen *Tph1* được loại bỏ ở mô hình chuột (tức là, tạo ra chuột *Tph1*^{-/-}), cho thấy rằng một phần serotonin không được sản sinh bởi

cơ chế qua trung gian TPH1 nội sinh. Các tác giả sáng chế ở đây đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng khi tái tạo ra chuột *Tph1*^{-/-} dưới dạng không có vi sinh vật (tức là, các con vật thiếu hệ vi khuẩn đường tiêu hóa), chúng gần như hoàn toàn không có serotonin. Phát hiện ngạc nhiên tiếp theo là việc cấy cho các con chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật bằng hệ vi khuẩn ruột của chuột kiểu dại hoặc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sản sinh serotonin là đủ để phục hồi mức serotonin ở ruột. Các phát hiện mới này đề xuất rằng vi khuẩn trong đường tiêu hóa bình thường không chỉ có khả năng ảnh hưởng đến sự sản sinh serotonin nội sinh (của vật chủ), như đã biết trước đó, mà ngạc nhiên là chúng còn có khả năng tự sản sinh serotonin cục bộ trong đường tiêu hóa. Sau đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng một số chủng vi khuẩn sinh axit lactic nhất định có khả năng sản sinh serotonin trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí *in vitro*. Ngoài ra, đối với một số chủng nhất định, sự sản sinh serotonin được cải thiện rất lớn trong các điều kiện hiếu khí so với sự sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí. Do đó, sáng chế dựa vào phát hiện rằng một số chủng vi khuẩn, cụ thể là một số chủng vi khuẩn sinh axit lactic nhất định, thường là kỵ khí, có thể sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí. Do đó, mục đích là sàng lọc và chọn lọc vi khuẩn như vậy có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong các điều kiện hiếu khí. Các vi khuẩn này có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong điều kiện kỵ khí, cụ thể là được làm thích nghi để sản sinh và giải phóng serotonin cục bộ trong đường tiêu hóa của đối tượng, chẳng hạn trong các ngách được oxy hóa nhiều hơn của ruột gần niêm mạc/lớp đệm biểu mô của ruột. Tại các ngách được oxy hóa nhiều hơn này của ruột, có các tế bào nội tiết ruột, chẳng hạn tế bào enterochromaffin, và các thụ thể serotonin và/hoặc chất vận chuyển serotonin (SERT) được biểu hiện. Chủng vi khuẩn được chọn lọc bất kỳ tốt hơn là có khả năng bám dính vào niêm mạc, hoặc ít nhất là có mặt ở, hoặc gần, niêm mạc nơi mà chúng được tiếp xúc với áp suất riêng phần oxy tương đối cao, là đặc trưng của các ngách được oxy hóa của đường tiêu hóa.

Việc sàng lọc các vi khuẩn này có thể được thực hiện *in vitro* bằng cách nuôi cấy các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic trong các điều kiện hiếu khí hoặc trong các điều kiện kỵ khí và hiếu khí và chọn lọc vi khuẩn được xác định là chỉ có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí, hoặc trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí. Sau đó các vi khuẩn được chọn lọc, khi được dùng cho đối tượng, được dùng để sản sinh serotonin cục bộ trong đường tiêu hóa của đối tượng để làm tăng mức serotonin ở đối tượng bị thiếu hụt serotonin hoặc mắc bệnh hoặc rối loạn liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Việc sàng lọc vi khuẩn này cũng có thể được thực hiện *in vivo* nhờ sử dụng đối tượng là động vật có vú *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật (GF) được cho ăn các chủng vi khuẩn sinh axit lactic. Sự sản sinh serotonin bởi chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong đường tiêu hóa của đối tượng *Tph1*^{-/-} GF sau đó có thể được đánh giá hoặc phân tích trong mẫu cơ thể lấy từ đối tượng *Tph1*^{-/-} GF để xác định xem chủng vi khuẩn sinh axit lactic này có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin hoặc bệnh hoặc rối loạn liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Hơn nữa, serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn có hoạt tính sinh học và có tác dụng không chỉ ở cục bộ trong đường tiêu hóa mà còn được vận chuyển qua lớp đệm biểu mô của đường tiêu hóa vào hệ tuần hoàn toàn thân nơi nó có khả năng tác động ngoại vi đối với hệ tiêu hóa, tức là, có tác dụng toàn thân. Để serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn đến được hệ tuần hoàn toàn thân, tốt hơn là sự sản sinh serotonin diễn ra gần niêm mạc ruột và biểu mô ruột, nơi có mức oxy cao hơn bình thường so với trong lòng ống ruột. Do đó, theo một phương án cụ thể, vi khuẩn sản sinh serotonin được chọn lọc theo các phương án tốt hơn là cũng có khả năng bám dính vào chất nhầy trong các ngách được oxy hóa nhiều hơn của đường tiêu hóa, hoặc ít nhất là có mặt tại hoặc gần niêm mạc, và/hoặc cũng có thể xâm thực vào niêm mạc của đường tiêu hóa, đảm bảo trạng thái gần giữa vi khuẩn và tế bào biểu mô của đường tiêu hóa.

Ngoài ra, nếu được sản sinh gần tế bào biểu mô của đường tiêu hóa, serotonin được sản sinh bởi các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic có khả năng tác động cục bộ ở chính đường tiêu hóa, chẳng hạn tác động đến sự trưởng thành của, và sự giao tiếp bên trong, hệ thần kinh ruột (ENS). ENS gồm có tế bào thần kinh đệm và tế bào thần kinh nằm trong lớp đệm của đường tiêu hóa, và hệ thần kinh này chịu trách nhiệm, chẳng hạn, cho sự điều khiển vận động của hệ tiêu hóa và cho sự tiết các enzym tiêu hóa. Ngoài ra, hệ thần kinh này giao tiếp thông qua nhiều chất dẫn truyền thần kinh, tương tự như giao tiếp trong hệ thần kinh trung ương, bao gồm thông qua axetylcholin, dopamin, và serotonin.

Các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic sản sinh serotonin trong đường tiêu hóa do đó có thể được sử dụng để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc rối loạn và bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin cục bộ trong đường tiêu hóa, mà còn ở các bộ phận khác trong cơ

thể khi serotonin được vận chuyển qua lớp đệm tiêu hóa vào hệ tuần hoàn toàn thân và tiếp tục vào các mô ngoại vi.

Các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic, còn được gọi là các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, là các vi khuẩn gram dương, GC thấp, chịu axit, nói chung không tạo bào tử, không hô hấp và có dạng hình que hoặc cầu mà có khả năng sản sinh axit lactic là sản phẩm chính cuối của quá trình chuyển hóa lên men hydrat cacbon. Vi khuẩn sinh axit lactic sinh trưởng kỵ khí, nhưng không giống như hầu hết các vi khuẩn kỵ khí, chúng cũng có khả năng sinh trưởng khi có mặt oxy là vi khuẩn kỵ khí chịu hiếu khí, hoặc chịu oxy tương đối. Vi khuẩn sinh axit lactic thường được thừa nhận là an toàn (GRAS) và bao gồm các chi trong bộ *Lactobacillales*, bao gồm *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* và *Streptococcus*, ngoài *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, và *Weissella*, và cả chi *Bifidobacterium* trong bộ *Bifidobacteriales*.

Trong những thập kỷ qua, các công cụ phân tích mới đã cho phép các nhà khoa học khám phá ra nhiều loài vi khuẩn mới cũng như nhận ra rằng các loài trong lịch sử được nhóm vào *Lactobacillus* quá khác biệt với nhau. Để giữ cho các nhóm probiotic đúng và có tổ chức, chi *Lactobacillus* do đó chia thành 25 chi khác nhau. Kết quả là, nhiều probiotic gần đây đã được đặt tên chi mới. Do đó, một tên gọi khác của chi cho *Lactobacillus reuteri* là *Limosilactobacillus reuteri*, một tên gọi khác của chi cho *Lactobacillus mucosae* là *Limosilactobacillus mucosae*, một tên gọi khác của chi cho *Lactobacillus plantarum* là *Lactiplantibacillus plantarum*, và một tên gọi khác của chi cho *Lactobacillus casei* là *Lacticaseibacillus casei*.

Fig.5 là lưu đồ minh họa phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin. Phương pháp này bắt đầu ở bước S1, bao gồm nuôi cấy vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic, trong các điều kiện hiếu khí, trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan. Bước tiếp theo S2 gồm phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó. Phương pháp này còn bao gồm chọn lọc, trong bước S3, chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó.

Do đó, vi khuẩn như vậy được chọn lọc dựa trên việc chúng có khả năng sản sinh serotonin trong điều kiện của các ngách được oxy hóa nhiều hơn của ruột, ví dụ, gần niêm mạc đường tiêu hóa và lớp đệm biểu mô của ruột nơi các thụ thể serotonin và/hoặc các chất vận chuyển serotonin (SERT) được biểu hiện và cũng là nơi có các tế bào nội tiết ruột đặc biệt, chẳng hạn tế bào enterochromaffin.

Phương pháp chọn lọc được thể hiện trên Fig.5 bao gồm nuôi cấy và kiểm tra các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan. Tryptophan là nguyên liệu ban đầu trong quá trình sản sinh serotonin. Cụ thể hơn, tryptophan hydroxylaza (TPH) (EC 1.14.16.4), có hai đồng phân của nó là TPH1 và TPH2, tổng hợp 5-hydroxytryptophan (5-HTP) từ tryptophan. 5-HTP lại được chuyển hóa thành serotonin (5-HT) nhờ L-axit amin thơm decarboxylaza (AADC) (EC 4.1.1.28). Do đó, môi trường nuôi cấy, trong đó vi khuẩn thuộc (các) chủng vi khuẩn sinh axit lactic cần được kiểm tra được nuôi cấy, chứa tryptophan làm nguyên liệu ban đầu cho việc sản sinh serotonin bất kỳ bởi (các) chủng vi khuẩn sinh axit lactic.

Theo sáng chế, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan trong các điều kiện hiếu khí. Do vậy, chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic được chọn lọc cần có khả năng sản sinh serotonin ít nhất là trong các điều kiện hiếu khí. Sự chênh lệch áp suất riêng phần của oxy có thể có ảnh hưởng đáng kể đến sự chuyển hóa của vi khuẩn về dịch chuyển quá trình chuyển hóa của vi khuẩn của các L-axit amin thơm, chẳng hạn tryptophan, thành các chất chuyển hóa khác nhau. Điều này có nghĩa là một chủng vi khuẩn sinh axit lactic cho trước tạo ra các chất chuyển hóa khác nhau từ tryptophan khi được nuôi cấy ở các áp suất riêng phần của oxy khác nhau, tức là, các điều kiện hiếu khí so với các điều kiện kỵ khí. Nói cách khác, vi khuẩn sinh axit lactic mà có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí không nhất thiết sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí và ngược lại, vi khuẩn sinh axit lactic mà có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí không nhất thiết sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí.

Áp suất riêng phần của oxy trong ruột và trong dạ dày thường cao hơn ở gần niêm mạc ruột khi so với các phần bên trong của ruột non (gồm tá tràng, hỗng tràng và hồi tràng) và ruột già (kết tràng gồm manh tràng, trực tràng và ống hậu môn). Điều này có nghĩa là oxy có mặt ở biểu mô ruột theo một gradient, với nồng độ oxy cao hơn ở gần niêm mạc và

nồng độ oxy thấp hơn về phía ống ruột. Do đó, bước S1 trên Fig.5 được thực hiện trong các điều kiện hiếu khí, tức là, với sự có mặt của oxygen, để mô phỏng các điều kiện hiếu khí, hoặc các ngách được oxy hóa, gần niêm mạc ruột. Các chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn theo phương pháp thể hiện trên Fig.5 tốt hơn là cũng có khả năng bám dính vào và/hoặc khu trú ở niêm mạc ruột hoặc lớp đệm biểu mô của đường tiêu hóa hoặc ít nhất là có mặt ở hoặc gần niêm mạc ruột nơi chúng được tiếp xúc với áp suất riêng phần của oxy tương đối cao như được bàn luận thêm liên quan đến Fig.7. Điều này có nghĩa là để sản sinh serotonin *in vivo* trong hệ tiêu hóa của đối tượng và để serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn được hấp thụ một cách hiệu quả từ đường tiêu hóa vào hệ tuần hoàn toàn thân bởi đối tượng, chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn theo phương pháp như thể hiện trên Fig.5 cần có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí mô phỏng các điều kiện ở hoặc gần niêm mạc ruột.

Thuật ngữ “vi khuẩn kỵ khí” và “kỵ khí” được sử dụng ở đây liên quan đến các điều kiện nuôi cấy kỵ khí bao gồm các điều kiện nuôi cấy như vậy đặc trưng bởi các điều kiện không chứa oxy (O_2) tức là, oxy hòa tan và khoảng không của ống nuôi cấy có 0% hoặc 0 ppm O_2 , ít nhất là gần 0% hoặc 0 ppm O_2 . Một ví dụ minh họa khác, nuôi cấy kỵ khí có thể bao gồm nuôi cấy vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy trong vật chứa nuôi cấy kín chẳng hạn lọ huyết thanh kín khí hoặc các ống hungate. Môi trường nuôi cấy có thể tùy ý được loại khí trước khi thêm chủng vi khuẩn sinh axit lactic. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, vật chứa nuôi cấy có thể được làm sạch, ví dụ bằng N_2 , trước hoặc sau khi đóng kín vật chứa hoặc theo cách khác được đun sôi trong 15-20 phút và làm nguội dưới dòng khí nitơ để loại bỏ hoàn toàn oxy hòa tan có trong môi trường hoặc thể tích khí được chứa bất kỳ trong vật chứa nuôi cấy đã đóng kín.

Tương ứng, các thuật ngữ “vi khuẩn hiếu khí” và “hiếu khí” như được sử dụng ở đây liên quan đến các điều kiện nuôi cấy hiếu khí bao gồm các điều kiện nuôi cấy đặc trưng bởi sự có mặt của oxy (O_2) tự do trong khoảng không của ống nuôi cấy tương ứng với độ bão hòa 100% hoặc 8,87 ppm oxy hòa tan. Lượng oxy hòa tan ban đầu trong môi trường sinh trưởng có thể nằm trong khoảng từ mức phát hiện được bất kỳ, chẳng hạn từ 2,41 ppm tương ứng với 29,3% độ bão hòa, tốt hơn là từ 4,8 ppm tương ứng với 64% độ bão hòa, và tốt hơn là đến 9 ppm tương ứng với ~103% độ bão hòa của oxy hòa tan. Mức oxy trong khí quyển là khoảng 21%. Một ví dụ minh họa là, nuôi cấy hiếu khí có thể bao

gồm nuôi cấy vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy trong vật chứa nuôi cấy hở. Theo cách khác, chủng vi khuẩn sinh axit lactic có thể được nuôi cấy trong vật chứa nuôi cấy kín nếu oxy được thêm và vật chứa nuôi cấy kín.

Bước S1 trên Fig.5 có thể được thực hiện trong một khoảng thời gian định trước. Chẳng hạn, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có thể được ủ và nuôi cấy hiếu khí trong môi trường nuôi cấy trong ít nhất 1 giờ, trong ít nhất là nhiều giờ, tức là, ít nhất là hai giờ, chẳng hạn 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12 giờ. Vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic cũng có thể được nuôi cấy trong khoảng thời gian lâu hơn, chẳng hạn 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ hoặc 60 giờ như các ví dụ minh họa nhưng không giới hạn sáng chế.

Theo một phương án, bước S2 trên Fig.5 bao gồm việc lấy mẫu từ môi trường nuôi cấy và phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong mẫu này. Theo một phương án, mẫu môi trường nuôi cấy là mẫu không có tế bào. Theo phương án này, tế bào bất kỳ, cụ thể là tế bào vi khuẩn, có trong mẫu này được loại bỏ trước tiên, chẳng hạn cho mẫu này qua một hoặc hai lần ly tâm, chẳng hạn $10.000 \times g$ trong 1-4 phút, chẳng hạn 2 phút, để tách mẫu thành viên vón chứa tế bào và phần dịch nổi có thể chứa serotonin. Bước S2 trên Fig.5 sau đó cũng có thể bao gồm việc phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong phần dịch nổi. Ngoài ra, hoặc theo cách khác, mẫu môi trường nuôi cấy có thể được lọc qua một hoặc nhiều bộ lọc được ly tâm để giữ lại vi khuẩn nhưng đồng thời cho phép serotonin trong mẫu môi trường nuôi cấy đi qua (các) bộ lọc. Theo phương án này, việc phát hiện serotonin có thể được thực hiện trong dịch lọc.

Serotonin có thể được đo trong môi trường nuôi cấy, mẫu hoặc phần dịch nổi nhờ sử dụng các thử nghiệm hoặc kỹ thuật đo serotonin đã biết bất kỳ. Chẳng hạn, serotonin có thể được đo nhờ sử dụng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) hoặc thử nghiệm đo khối phổ (mass spectrometry - MS).

Nếu phép đo serotonin dẫn đến việc nhận diện serotonin trong môi trường nuôi cấy, trong mẫu hoặc trong phần dịch nổi từ một chủng vi khuẩn sinh axit lactic cụ thể, điều này khẳng định rằng chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào và chủng vi khuẩn sinh axit lactic được thử nghiệm sẽ được chọn lọc

trong bước S3 trên Fig.5 do có hiệu quả trong việc sản sinh serotonin và nhờ đó cũng có hiệu quả trong điều trị bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng.

Do đó, bằng cách phát hiện sự có mặt của serotonin trong môi trường nuôi cấy, điều này cũng bao hàm việc phát hiện sự có mặt của serotonin trong mẫu môi trường nuôi cấy hoặc mẫu đã xử lý của môi trường nuôi cấy, chẳng hạn phần dịch nổi sau khi ly tâm mẫu môi trường nuôi cấy hoặc dịch lọc sau khi lọc mẫu môi trường nuôi cấy, trong bước S2, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic không chỉ có khả năng sản sinh serotonin mà còn có khả năng giải phóng serotonin ngoại bào vào môi trường nuôi cấy. Sự giải phóng serotonin ngoại bào này là quan trọng đối với việc sử dụng chủng vi khuẩn sinh axit lactic để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng, do serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn cần đến được đối tượng hoặc là cục bộ trong đường tiêu hóa và/hoặc được hấp thụ bởi biểu mô để đi tới hệ tuần hoàn toàn thân.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy bao gồm nguồn cacbon ngoài tryptophan. Nguồn cacbon bất kỳ mà (các) chủng vi khuẩn sinh axit lactic có thể sử dụng cần được thử nghiệm có thể được bao gồm trong môi trường nuôi cấy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở glucoza. Môi trường nuôi cấy tốt hơn còn bao gồm nguồn hợp chất nitơ, chẳng hạn các axit amin; mangan; sulfat; các vitamin và yếu tố sinh trưởng, chẳng hạn ở dạng phần chiết của nấm men và/hoặc phần chiết của thịt bò. Ví dụ về môi trường nuôi cấy có thể được sử dụng trong phương pháp trên Fig.5 là canh trường decarboxylaza (DECT) được biến đổi bởi tryptophan mới được thiết kế để thúc đẩy quá trình khử carboxyl của tryptophan và sản sinh serotonin bởi vi khuẩn. Canh trường DECT này hoặc môi trường nuôi cấy chứa tryptophan, glucoza, phần chiết của thịt bò và phần chiết của nấm men.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy gồm ít nhất 0,4 g/ 100 mL tryptophan, tốt hơn là ít nhất 0,5 g/100 mL, chẳng hạn ít nhất 0,6 g/100 mL, ít nhất 0,7 g/100 mL, và tốt hơn nữa là ít nhất 0,8 g/100 mL, chẳng hạn ít nhất 0,9 g/100 mL hoặc khoảng 1 g tryptophan trên mỗi 100 mL môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy được ưu tiên hiện nay là, canh trường DECT, nêu trên tốt hơn là chứa tryptophan 1 g/100 mL, glucoza 0,05 g/100 mL, phần chiết của thịt bò 0,5 g/100 mL và phần chiết của nấm men 0,1 g/100 mL.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước bổ sung như thể hiện trên Fig.6. Theo phương án này, phương pháp này bắt đầu ở bước S10 hoặc tiếp tục từ

bước S2 trên Fig.5. Bước S10 bao gồm việc nuôi cấy, trong các điều kiện kỵ khí, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan. Phương pháp này sau đó tiếp tục đến bước S11, bao gồm việc phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí. Bước S10 tốt hơn là được thực hiện theo cách tương tự những gì đã được mô tả ở phần trước liên quan đến bước S1 trên Fig.5, bao gồm thời gian nuôi cấy, môi trường nuôi cấy, v.v., nhưng khác biệt ở chỗ trong bước S1 trên Fig.5, vi khuẩn là chủng sinh axit lactic được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí, trong khi trong bước S10 trên Fig.6, vi khuẩn là chủng sinh axit lactic được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí. Tương ứng là, việc phát hiện serotonin trong bước S11 trên Fig.6 có thể được thực hiện theo cách tương tự như đã bàn luận liên quan đến bước S2 trên Fig.5.

Phương án này ưu tiên là còn bao gồm bước S12 như thể hiện trên Fig.6. Bước S12 này bao gồm việc tính tỷ lệ hoặc tỷ số giữa nồng độ của serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí (xem bước S2 trên Fig.5) và nồng độ của serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí (xem bước S11 trên Fig.6). Sau đó, phương pháp này tiếp tục đến bước S13 tùy ý, so sánh tỷ lệ hoặc tỷ số đã tính được với giá trị ngưỡng, chẳng hạn 1,0. Nếu tỷ lệ hoặc tỷ số này bằng hoặc lớn hơn, tốt hơn là lớn hơn giá trị ngưỡng, chẳng hạn bằng hoặc lớn hơn 1,0, tốt hơn là lớn hơn 1,0, thì phương pháp này tiếp tục đến bước S3 trên Fig.5. Vì vậy, theo phương án này, bước S3 bao gồm việc chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu tỷ lệ này bằng hoặc lớn hơn 1,0, tốt hơn là lớn hơn 1,0.

Theo một phương án cụ thể, giá trị ngưỡng để so sánh tỷ lệ hoặc tỷ số trong bước S13 tùy ý bằng 1,5, tốt hơn là 2,0, chẳng hạn 2,5, và tốt hơn nữa là 3,0, chẳng hạn 3,5, hoặc thậm chí là cao hơn, chẳng hạn 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 hoặc thậm chí là 10,0. Ngưỡng này có thể, theo một số phương án thậm chí là chẳng hạn 15, 20, 25, 30, 40 hoặc 50 hoặc thậm chí cao hơn.

Vi khuẩn là các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic nhất định là các loài sản sinh serotonin hiệu quả hơn đáng kể khi được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí khi so với

khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí. Ở một số chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic, lượng serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó là rất thấp và có thể thậm chí là dưới giới hạn phát hiện của thử nghiệm được sử dụng để phát hiện serotonin, là chất có thể phát hiện một cách chính xác nhờ sử dụng thử nghiệm cụ thể này. Các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic này do đó sẽ có tỷ lệ hoặc tỷ số rất cao. Theo một phương án tùy ý, phương pháp như thể hiện trên Fig.6 do đó bao gồm một bước tùy ý, bổ sung (không thể hiện trên Fig.6) để xác định xem nồng độ của serotonin được phát hiện trong bước S11 trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí có dưới giá trị ngưỡng hay không, chẳng hạn giới hạn phát hiện của thử nghiệm sử dụng trong bước S11 để phát hiện serotonin trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó và xác định nồng độ của serotonin phát hiện được. Theo một phương án tùy ý, tỷ lệ hoặc tỷ số chỉ được tính trong bước S12 nếu nồng độ được phát hiện trong bước S11 trong môi trường nuôi cấy khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí bằng hoặc trên giá trị ngưỡng này.

Nếu chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin khi được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí nhưng không sản sinh và giải phóng serotonin khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí, chủng vi khuẩn sinh axit lactic vẫn có thể được chọn trong bước S3 vì có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng theo phương án thể hiện trên Fig.6 nếu nồng độ của serotonin trong phần dịch nổi ít nhất là 0,4 nM, tốt hơn là ít nhất 0,5 nM, chẳng hạn ít nhất 0,75 nM hoặc ít nhất 1 nM, tốt hơn là ít nhất 2 nM, tốt hơn nữa là ít nhất 3 nM, chẳng hạn ít nhất 4 nM, hoặc ít nhất 5 nM hoặc ít nhất 6 nM hoặc ít nhất 7 nM như nêu chi tiết hơn dưới đây.

Nhờ đó, phương án này của sáng chế chọn lọc các chủng vi khuẩn sinh axit lactic, cụ thể là các loài sản sinh serotonin tốt trong các điều kiện hiếu khí, tức là, sản sinh serotonin ít nhất là nhiều bằng, tốt hơn là nhiều hơn trong các điều kiện hiếu khí khi so với trong các điều kiện kỵ khí. Hầu hết các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic là kỵ khí, một số trong chúng có thể sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí. Tuy nhiên, sáng chế chọn lọc các chủng vi khuẩn sinh axit lactic không chỉ có thể sống và sinh trưởng trong các điều kiện hiếu khí mà còn sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong điều kiện hiếu khí như vậy. Hơn nữa, các chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn theo phương án

thể hiện trên Fig.6 thực tế sản sinh ít nhất là nhiều bằng, nếu không nhiều hơn, serotonin trong điều kiện hiếu khí khi so với điều kiện kỵ khí. Các chủng vi khuẩn sinh axit lactic như vậy có thể sản sinh và tiết các lượng serotonin có hiệu quả sinh học khi có mặt trong các ngách của hệ tiêu hóa hoặc đường tiêu hóa của đối tượng nơi có mức oxy tương đối cao hơn ở các phần khác của đường tiêu hóa và do đó đặc biệt thích hợp để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Theo một phương án, bước S2 trên Fig.5 bao gồm việc đo nồng độ của serotonin được sản sinh và giải phóng bởi chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó. Bước S3 bao gồm, theo phương án này, việc chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu nồng độ của serotonin trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó ít nhất là bằng hoặc trên giá trị ngưỡng xác định.

Nồng độ của serotonin khi được đo trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó đối với một chủng vi khuẩn sinh axit lactic cho trước ít nhất phụ thuộc một phần vào thử nghiệm hoặc công nghệ được sử dụng để phân tích serotonin, chẳng hạn ELISA so với MS. Do đó, giá trị của giá trị ngưỡng như nêu trên phụ thuộc vào thử nghiệm cụ thể được sử dụng để đo nồng độ của serotonin trong môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án cụ thể, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic được nuôi cấy trong 24 giờ trong các điều kiện hiếu khí trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan, tốt hơn là môi trường nuôi cấy DECT, sau đó lấy mẫu môi trường nuôi cấy và đưa mẫu môi trường nuôi cấy vào ít nhất một lần ly tâm để thu được phần dịch nổi và viên vón. Trong trường hợp này, nồng độ của serotonin được sản sinh bởi chủng vi khuẩn sinh axit lactic được đo trong phần dịch nổi bằng cách sử dụng thử nghiệm đo khối phổ bình thường. Theo một phương án cụ thể, bước S3 bao gồm việc chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu nồng độ của serotonin trong phần dịch nổi ít nhất là 0,4 nM, tốt hơn là ít nhất 0,5 nM, chẳng hạn ít nhất 0,75 nM hoặc ít nhất 1 nM, tốt hơn là ít nhất 2 nM, tốt hơn nữa là ít nhất 3 nM, chẳng hạn ít nhất 4 nM, hoặc ít nhất 5 nM hoặc ít nhất 6 nM hoặc ít nhất 7 nM.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước S15 bổ sung như thể hiện trên Fig.7. Phương pháp này bắt đầu ở bước S15 này hoặc tiếp tục từ bước S2 trên Fig.5,

hoặc thực tế là từ bước S13 trên Fig.6. Bước S15 bao gồm việc xác định xem vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám vào niêm mạc đường tiêu hóa hay không. Theo phương án này, bước S3 trên Fig.5 bao gồm việc chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó và nếu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám vào niêm mạc đường tiêu hóa.

Phương án này cũng có thể được kết hợp với phương án như thể hiện trên Fig.6, tức là, thực hiện việc chọn lọc dựa vào bước so sánh tỷ lệ và giá trị ngưỡng và dựa vào việc liệu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám vào niêm mạc đường tiêu hóa hay không.

Chất nhầy với các thành phần cấu trúc chính của nó là muxin (một họ gồm các protein có trọng lượng phân tử cao, được glycosyl hóa mức nặng) được tạo ra bởi các màng nhầy niêm mạc ở động vật có vú và chim, và cũng có ở lưỡng cư, cá, cá mút đá myxin, ốc sên và sên. Do đó, nhờ có khả năng gắn vào chất nhầy ruột, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có thể bám dính vào niêm mạc của đường tiêu hóa.

Khả năng của vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic bám dính vào niêm mạc của đường tiêu hóa có thể được nghiên cứu, chẳng hạn, như được mô tả trong ví dụ 6. Vắn tắt là, niêm mạc đường tiêu hóa được tách ra và được phủ trên bề mặt. Vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic sau đó được thêm vào chất nhầy được phủ và được để dính vào chất nhầy. Sau đó, những vi khuẩn không dính bám được loại bỏ bằng một hoặc nhiều lần rửa. Sau đó lượng vi khuẩn bám dính được xác định số lượng trực tiếp trên chất nhầy, hoặc gián tiếp bằng cách trước tiên giải phóng các vi khuẩn bám dính, chẳng hạn thông qua quá trình xử lý bằng enzym, ví dụ xử lý bằng trypsin, và sau đó xác định số lượng vi khuẩn được giải phóng.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic có sự bám dính vào chất nhầy ít nhất là tốt bằng khả năng bám dính của *Lactobacillus reuteri* DSM 27131, chẳng hạn được thể hiện trong ví dụ 6. Theo phương án này, bước S15 trên Fig.7 bao gồm việc xác định xem vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng bám dính vào chất nhầy bằng hoặc cao hơn khả năng bám dính vào chất nhầy của vi khuẩn là *L. reuteri* DSM

27131. Theo phương án này, bước S3 trên Fig.5 bao gồm việc chọn lọc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó và nếu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng bám dính vào chất nhầy bằng hoặc cao hơn khả năng bám dính vào chất nhầy của vi khuẩn là *L. reuteri* DSM 27131.

Phương pháp được mô tả trên đây và các phương án của nó là phương pháp *in vitro* để nhận dạng và chọn lọc vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng.

Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở đó. Fig.8 là lưu đồ minh họa phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin được thực hiện dưới dạng phương pháp *in vivo*. Phương pháp này bao gồm việc cho ăn, tức là, cấy vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong bước S20 vào đối tượng *Tph1*^{-/-} không chứa vi sinh vật (GF). Bước tiếp theo S21 bao gồm việc phát hiện serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong mẫu cơ thể được lấy từ đối tượng *Tph1*^{-/-} GF. phương pháp này còn bao gồm việc chọn lọc, trong bước S22, chủng vi khuẩn sinh axit lactic có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong mẫu cơ thể.

Vì vậy, trong phương pháp này, đối tượng thử nghiệm theo khía cạnh là đối tượng thử nghiệm không chứa vi sinh vật mà không có sự sản sinh enzyme TPH1, tức là, đối tượng bị bất hoạt *Tph1*. Đối tượng *Tph1*^{-/-} GF là đối tượng động vật GF *Tph1*^{-/-} không phải người và tốt hơn là được chọn từ nhóm gồm có chuột, chuột nhắt, chuột lang, lợn, mèo, chó, cừu, ngựa, động vật linh trưởng không phải người, khỉ hoặc chim, và tốt hơn là chuột hoặc chuột nhắt. Chuột GF *Tph1*^{-/-} có thể thu được như được mô tả trong ví dụ 1.

Đối tượng *Tph1*^{-/-} GF được cho ăn, tức là, được cấy vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic cần được thử nghiệm trong phương pháp thể hiện trên Fig.8 chẳng hạn qua ống thông dạ dày, chẳng hạn ở dạng bột hòa tan, viên nang, hoặc viên nén chứa vi khuẩn hoặc dung dịch chứa vi khuẩn.

Mẫu cơ thể được lấy từ đối tượng *Tph1*^{-/-} GF và được phân tích trong bước S21 về sự có mặt của serotonin bất kỳ. Đối tượng là không chứa vi sinh vật, tức là, không có hoặc

thiếu hụt hệ vi khuẩn đường tiêu hóa, và ngoài việc thiếu hụt TPH1, là enzym chịu trách nhiệm cho hầu hết sự sản sinh serotonin nội sinh. Do vậy, serotonin bất kỳ được phát hiện trong mẫu cơ thể trong bước S21 được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic được cho đối tượng ăn trong bước S20, hoặc vi khuẩn thu được từ vi khuẩn được cấy.

Mẫu cơ thể có thể là mẫu bất kỳ được lấy từ đối tượng *Tph1*^{-/-} GF và có thể thường chứa serotonin nếu đối tượng không phải là *Tph1*^{-/-}, tức là đối tượng *Tph1*^{+/+} không phải GF thuộc cùng một loài. Chẳng hạn, mẫu có thể là mẫu thuộc đường tiêu hóa, mẫu mô được lấy từ đối tượng, chẳng hạn từ mô của đường tiêu hóa, hoặc mẫu dịch cơ thể, chẳng hạn mẫu máu, mẫu huyết tương hoặc mẫu huyết thanh. Theo một phương án cụ thể, mẫu cơ thể là mẫu dịch cơ thể, tốt hơn là mẫu máu, mẫu huyết tương hoặc mẫu huyết thanh. Serotonin được phát hiện trong mẫu dịch cơ thể như vậy không chỉ chứng tỏ rằng vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh và sản sinh serotonin ngoại vào trong hệ tiêu hóa của đối tượng *Tph1*^{-/-} GF mà còn chứng tỏ rằng serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn được hấp thu và vận chuyển vào hệ tuần hoàn toàn thân, tức là, hệ máu, của đối tượng *Tph1*^{-/-} GF.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic là chủng vi khuẩn *Lactobacillus*. Theo một phương án cụ thể, chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được chọn từ nhóm gồm có chủng vi khuẩn *L. reuteri*, chủng vi khuẩn *L. mucosae*, và chủng vi khuẩn *L. plantarum*.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn theo sáng chế, chẳng hạn được thể hiện trong hình vẽ bất kỳ trong số các hình vẽ Fig.5 đến Fig.8, không chỉ có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào mà còn có khả năng gây ra sự sản sinh serotonin nội sinh khi được dùng cho đối tượng.

Theo một phương án khác, chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn theo sáng chế, chẳng hạn được thể hiện trong hình vẽ bất kỳ trong số các hình vẽ Fig.5 đến Fig.8, có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào nhưng không có khả năng gây ra sự sản sinh serotonin nội sinh khi được dùng cho đối tượng.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong các điều kiện hiếu khí để sử dụng

trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic còn có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong các điều kiện kỵ khí nhưng tỷ lệ giữa lượng serotonin được sản sinh và được sản sinh ngoại bào bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong các điều kiện hiếu khí và lượng serotonin được sản sinh và được sản sinh ngoại bào bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic trong các điều kiện kỵ khí bằng hoặc lớn hơn một, tốt hơn là lớn hơn một.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic còn có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám dính vào niêm mạc đường tiêu hóa.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh serotonin ở, hoặc ít nhất là có liên quan đến niêm mạc ruột của đối tượng.

Như đã được mô tả ở phần trước trong bản mô tả, nhìn chung là sẽ ưu tiên nếu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng gắn vào chất nhầy hoặc ít nhất có mặt gần niêm mạc đường tiêu hóa, và cụ thể là niêm mạc ruột, nhờ đó thúc đẩy sự hấp thu serotonin được sản sinh và tiết ra bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic qua niêm mạc ruột, và cụ thể qua biểu mô ruột. Sau đó, serotonin được hấp thu qua biểu mô ruột có thể được vận chuyển ra ngoại vi hoặc toàn thân đến một vị trí cụ thể của đối tượng nơi serotonin phát huy tác dụng sinh học của nó.

Ở đây, thuật ngữ “điều trị” có thể bao hàm cả việc làm thuyên giảm các triệu chứng của một tình trạng bệnh lý, bệnh hoặc rối loạn cụ thể cũng như ngăn ngừa sự khởi phát của các triệu chứng. Do đó, thuật ngữ này bao gồm việc ngăn ngừa, làm giảm nguy cơ, làm giảm, ức chế hoặc phòng ngừa thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí được chọn theo phương pháp được mô tả trên đây và theo các phương pháp hoặc phương án của nó được thể hiện trên hình vẽ bất kỳ trong số các hình vẽ Fig.5 đến Fig.8.

Serotonin có một số chức năng sinh lý bao gồm hành vi, kích hoạt và ngưng tập tiểu cầu, điều hòa nhu động ruột, cân bằng nội môi và hoạt động của hệ thần kinh ruột (enteric

nervous system - ENS), hoạt động của hệ miễn dịch đường ruột, chuyển hóa năng lượng (thích ứng khi đói, hóa nâu và phân giải lipit của mô mỡ, sản xuất glucoza ở gan, tiết insulin), hoạt động của trực ruột - não và chuyển hóa xương và cân bằng nội môi. Do đó, sự mất cân bằng, và cụ thể là sự thiếu hụt, ở các mức serotonin có thể gây ra các bất thường trong nhiều quá trình sinh học và các chức năng ở đối tượng.

Theo một phương án, bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin, còn được gọi là bệnh phụ thuộc serotonin ở đây, là bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm có lo âu, tâm trạng chán nản, hung hăng, trí nhớ kém, rối loạn ăn uống, rối loạn ám ảnh - cưỡng chế, rối loạn hoảng sợ, rối loạn căng thẳng sau chấn thương, rối loạn lo âu xã hội, rối loạn nhu động đường tiêu hóa (chẳng hạn táo bón), hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm ruột (IBD), bệnh tim mạch, chứng loãng xương, bệnh đa tuyến nội tiết tự miễn-nhiễm nấm *Candida*-loạn dưỡng ngoại bì (APECED), bệnh loãng xương, tình trạng mất xương, và sự kết hợp của các bệnh và rối loạn này.

Theo một phương án, bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin được chọn từ nhóm gồm có IBS, IBD, bệnh tim mạch, chứng loãng xương, rối loạn nhu động đường tiêu hóa, APECED, bệnh loãng xương và tình trạng mất xương.

Theo một phương án, bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin là bệnh hoặc rối loạn của hệ thần kinh trung ương, chẳng hạn được chọn từ nhóm gồm có lo âu, tâm trạng chán nản, hung hăng, trí nhớ kém, rối loạn ăn uống, rối loạn ám ảnh - cưỡng chế, rối loạn hoảng sợ, rối loạn căng thẳng sau chấn thương, và rối loạn lo âu xã hội.

Theo một phương án ưu tiên, bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin là bệnh hoặc rối loạn của hệ tiêu hóa, chẳng hạn rối loạn nhu động đường tiêu hóa, IBS hoặc IBD.

Theo một phương án, bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin là bệnh liên quan đến chứng loãng xương, bệnh loãng xương và tình trạng mất xương, chẳng hạn mất xương liên quan đến glucocorticoid.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic là chủng vi khuẩn *Lactobacillus*. Theo một phương án cụ thể, chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được chọn từ nhóm gồm có chủng *L. reuteri*, chủng *L. mucosae* và chủng *L. plantarum*.

Theo một phương án, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 32846, *L. reuteri* DSM 32848, *L. reuteri* DSM 32849, *L. reuteri* DSM 27131, *L. reuteri*

DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, *L. reuteri* ATCC PTA 5289, *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* ATCC PTA 6475, và *L. reuteri* DSM 32465.

Theo một phương án cụ thể, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 32846, *L. reuteri* DSM 32848, *L. reuteri* DSM 32849, *L. reuteri* DSM 27131, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, *L. reuteri* ATCC PTA 5289 và *L. reuteri* DSM 32465.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 32846, *L. reuteri* DSM 32848, *L. reuteri* DSM 32849, *L. reuteri* DSM 27131, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, *L. reuteri* DSM 17938 và *L. reuteri* DSM 32465.

Theo một phương án khác, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 32846, *L. reuteri* DSM 32848, *L. reuteri* DSM 32849, *L. reuteri* DSM 27131, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 và *L. reuteri* DSM 32465.

Lactobacillus reuteri DSM 27131 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 18 Tháng Tư 2013).

Lactobacillus reuteri DSM 32846, DSM 32848 và DSM 32849 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 04 Tháng Bảy 2018).

Lactobacillus reuteri DSM 33509 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 23 Tháng Tư 2020).

Lactobacillus reuteri DSM 32465 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức thuộc Viện Leibniz DSMZ (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 21 Tháng Ba 2017).

Lactobacillus reuteri ATCC PTA 5289 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng giống chuẩn của Mỹ (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.) vào ngày 25 Tháng Sáu 2003.

Lactobacillus reuteri DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, và DSM 33635 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 09 Tháng Chín 2020).

Lactobacillus reuteri DSM 17938 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 30 tháng 1 năm 2006.

Lactobacillus reuteri ATCC PTA 6475 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng giống chuẩn của Mỹ (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.) vào ngày 21 tháng 12 năm 2004.

Theo một phương án cụ thể, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 32846, *L. reuteri* DSM 32848, *L. reuteri* DSM 32849, *L. reuteri* DSM 27131, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, và *L. reuteri* DSM 32465.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, và *L. reuteri* DSM 33509.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, và *L. reuteri* DSM 33635. Các chủng *L. reuteri* này đã tiến hóa trở nên chịu oxy tốt hơn và ổn định và có thể sống được trong khoảng thời gian bảo quản kéo dài như mô tả dưới đây.

Một số chủng *Lactobacillus* sinh trưởng tốt trong điều kiện kỵ khí, nhưng không sinh trưởng trong các điều kiện hiếu khí. Do đó, hai chủng *L. reuteri* có khả năng chịu oxy kém, chủng A và chủng B, được thử thách bởi oxy (stress oxy) và do đó được ép ở trong môi trường được kiểm soát của phòng thí nghiệm để tiến hóa, tức là, chúng được biến đổi hoặc thích nghi tích cực thành các chủng mới. Hai chủng mới được nhận dạng bằng phương pháp này, *L. reuteri* DSM 33632 được xác định có nguồn gốc từ chủng gốc A và *L. reuteri*

DSM 33634 được nhận dạng có nguồn gốc từ chủng gốc B. Cả hai chủng mới này đều thể hiện các đặc tính được phát triển và cải thiện mới, một trong các đặc tính này là khả năng chịu oxy tăng lên, làm cho chúng sinh trưởng tốt hơn đáng kể trong các điều kiện hiếu khí (Fig.9A) tới 100 thế hệ (Fig.9B và 9C).

Hơn nữa, có nhu cầu chung để cải thiện độ ổn định bảo quản của các chủng nuôi cấy vi khuẩn để sử dụng trong các sản phẩm probiotic, bao gồm cả việc làm cho vi khuẩn này chống chịu tốt hơn với quá trình sấy đông khô và ổn định hơn trong quá trình bảo quản trong thời gian dài để làm tăng thời hạn sử dụng của sản phẩm probiotic. Do đó, các chủng vi khuẩn mới chịu oxy tốt hơn được thử thách tiếp trong môi trường được kiểm soát của phòng thí nghiệm bao gồm nhiều vòng stress oxy để làm cho chúng thậm chí là chống chịu tốt hơn với các điều kiện hiếu khí, cũng như với việc sấy đông khô bổ sung và stress bảo quản tăng lên, dẫn đến việc nhận dạng và chọn lọc hai chủng vi khuẩn bổ sung, *L. reuteri* DSM 33633 có nguồn gốc từ DSM 33632 và *L. reuteri* DSM 33635 có nguồn gốc từ DSM 33634. Hai chủng mới bổ sung này không chỉ chịu được các bước sấy đông khô bổ sung và stress bảo quản tăng lên, mà còn thể hiện các đặc tính sinh trưởng được cải thiện một chút trong các điều kiện hiếu khí khi so với DSM 33632 và DSM 33634 (Fig.9D) và các đặc tính sinh trưởng được cải thiện đáng kể trong các điều kiện hiếu khí khi so với chủng gốc A và chủng gốc B. Cả bốn chủng được cải biến, *L. reuteri* DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, và DSM 33635, đều thể hiện các đặc tính thích nghi/tiến hóa này, các đặc tính này được thấy là vẫn ổn định trong ít nhất 100 thế hệ.

Theo một phương án cụ thể, chủng *L. reuteri* là *L. reuteri* DSM 33509. Chủng *L. reuteri* được thử thách để tiến hóa thành một chủng vi khuẩn ổn định hơn với mục đích làm tăng khả năng sống trong khoảng thời gian bảo quản kéo dài và cũng để cải thiện sự sống sót trong đường tiêu hóa. Cụ thể hơn, chủng *L. reuteri* DSM 33509 đã được cải biến từ chủng gốc của nó trong quá trình chọn lọc nhiều bước, bao gồm bước nuôi cấy và làm đông khô vi khuẩn và chọn lọc các khuẩn lạc sống sót sau bước đông khô, tạo ra chủng có khả năng chống chịu với mật tăng và khả năng bám dính vào chất nhầy tăng.

Theo một phương án, chủng *L. mucosae* được chọn từ nhóm gồm có *L. mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293 và *L. mucosae* DSM 33661.

L. mucosae DSM 33291, DSM 33292 và DSM 33293 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức thuộc Viện Leibniz DSMZ (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 20 Tháng Chín 2019).

L. mucosae DSM 33661 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức thuộc Viện Leibniz DSMZ (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 14 Tháng Mười 2020).

Theo một phương án, chủng *L. plantarum* được chọn từ nhóm gồm có *L. plantarum* DSM 33295 và *L. plantarum* DSM 33662,

L. plantarum DSM 33295 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức thuộc Viện Leibniz DSMZ (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 09 Tháng Mười 2019).

L. plantarum DSM 33662 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest tại Bảo tàng vi sinh vật và nuôi cấy tế bào của Đức thuộc Viện Leibniz DSMZ (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 14 Tháng Mười 2020).

Theo một phương án cụ thể, chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, *L. reuteri* DSM 33635, và *L. reuteri* DSM 33509, *L. mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293, *L. mucosae* DSM 33661, *L. plantarum* DSM 33295, và *L. plantarum* DSM 33662.

Cũng có thể sử dụng tổ hợp vi khuẩn từ hai hoặc nhiều chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic, chẳng hạn được chọn từ các chủng *L. mucosae*, *L. plantarum* và *L. reuteri* nêu trên.

Theo một phương án, các chủng vi khuẩn sinh axit lactic tốt hơn là các chủng vi khuẩn probiotic.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic là khác với *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 khi bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin được chọn từ nhóm gồm có IBS, lo âu, tâm trạng chán nản, rối loạn căng thẳng sau chấn thương, IBD và các rối loạn nhu động đường tiêu hóa. Theo một phương án khác, chủng vi khuẩn sinh axit lactic là khác với *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn sinh axit lactic là khác với *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 khi bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin được chọn từ nhóm gồm có chứng loãng xương, bệnh loãng xương, mất xương, tâm trạng chán nản, IBS và IBD. Theo một phương án khác, chủng vi khuẩn sinh axit lactic là khác với *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475.

Các phương án khác của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, chẳng hạn chủng *L. mucosae* DSM 33291 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô từ chủng *L. mucosae* DSM 33291 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. mucosae* DSM 33291 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. mucosae* DSM 33291 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án bổ sung của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33292, chẳng hạn chủng *L. mucosae* DSM 33292 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. mucosae* DSM 33292 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. mucosae* DSM 33292 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. mucosae* DSM 33292 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án của sáng chế còn đề xuất chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33293, chẳng hạn chủng *L. mucosae* DSM 33293 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. mucosae* DSM 33293 để sử dụng làm thuốc, và chủng *L. mucosae* DSM 33293 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. mucosae* DSM 33293 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án của sáng chế còn đề xuất chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33661, chẳng hạn chủng *L. mucosae* DSM 33661 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. mucosae* DSM 33661 để sử dụng làm thuốc, và chủng *L. mucosae* DSM 33661 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. mucosae* DSM 33661 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án khác của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus plantarum* DSM 33295, chẳng hạn chủng *L. plantarum* DSM 33295 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. plantarum* DSM 33295 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. plantarum* DSM 33295 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. plantarum* DSM 33295 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án khác của sáng chế còn đề xuất chủng *Lactobacillus plantarum* DSM 33662, chẳng hạn chủng *L. plantarum* DSM 33662 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. plantarum* DSM 33662 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. plantarum* DSM 33662 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. plantarum* DSM 33662 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án bổ sung của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33509, chẳng hạn chủng *L. reuteri* DSM 33509 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. reuteri* DSM 33509 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. reuteri* DSM 33509 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. reuteri* DSM 33509 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33632, chẳng hạn chủng *L. reuteri* DSM 33632 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng DSM 33632 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. reuteri* DSM 33632 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. reuteri* DSM 33632 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án của sáng chế còn đề xuất chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33633, chẳng hạn chủng *L. reuteri* DSM 33633 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. reuteri* DSM 33633 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. reuteri* DSM 33633 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. reuteri* DSM 33633 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án khác của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33634, chẳng hạn chủng *L. reuteri* DSM 33634 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. reuteri* DSM 33634 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. reuteri* DSM 33634 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. reuteri* DSM 33634 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Các phương án bổ sung của sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33635, chẳng hạn chủng *L. reuteri* DSM 33635 ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô, chủng *L. reuteri* DSM 33635 để sử dụng làm thuốc, chủng *L. reuteri* DSM 33635 để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin và sử dụng chủng *L. reuteri* DSM 33635 để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Do đó, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sinh axit lactic được chọn từ nhóm gồm có *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293, *L. mucosae* DSM 33661, *L. plantarum* DSM 33295, *L. plantarum* DSM 33662, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, và *L. reuteri* DSM 33635, chẳng hạn ở dạng được đông khô hoặc theo cách khác ở dạng được sấy khô. Sáng chế còn đề xuất vi khuẩn sinh axit lactic được chọn từ nhóm nêu trên để sử dụng làm thuốc, để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin, và sử dụng chúng để sản xuất thuốc để điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sản sinh và giải phóng ngoại bào serotonin trong các điều kiện hiếu khí. Theo một phương án, chủng vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm có *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293, *L. mucosae* DSM 33661, *L. plantarum* DSM 33295, *L. plantarum* DSM 33662, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, và *L. reuteri* DSM 33635.

Theo một phương án cụ thể, chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus mucosae* được chọn từ nhóm gồm có *L. mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293, và *L. mucosae* DSM 33661.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus plantarum* được chọn từ nhóm gồm có *L. plantarum* DSM 33295, và *L. plantarum* DSM 33662.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, và *L. reuteri* DSM 33635.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn sản sinh và giải phóng ngoại bào serotonin trong các điều kiện hiếu khí và có khả năng gắn vào chất nhầy. Theo một phương án, chủng vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm có *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293, *L. mucosae* DSM 33661, *L. plantarum* DSM 33662, *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634 và *L. reuteri* DSM 33635.

Theo một phương án cụ thể, chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus mucosae* được chọn từ nhóm gồm có *L. mucosae* DSM 33291, *L. mucosae* DSM 33292, *L. mucosae* DSM 33293, và *L. mucosae* DSM 33661.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng vi khuẩn là *Lactobacillus plantarum* DSM 33662.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng vi khuẩn là chủng *Lactobacillus reuteri* được chọn từ nhóm gồm có *L. reuteri* DSM 33509, *L. reuteri* DSM 33632, *L. reuteri* DSM 33633, *L. reuteri* DSM 33634, và *L. reuteri* DSM 33635.

Cách sử dụng được ưu tiên của các chủng vi khuẩn sinh axit lactic là qua miệng. Các cách sử dụng khác bao gồm qua mũi, trong mắt, khu trú hoặc một số hình thức dùng tại chỗ cho da, trực tràng, mũi, mắt, âm đạo hoặc nướu răng.

Liều lượng thích hợp của các chủng vi khuẩn sinh axit lactic như được xác định ở đây có thể được lựa chọn dễ dàng tùy thuộc vào bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin cần điều trị, cách thức sử dụng, đối tượng và dạng bào chế liên quan Ví dụ, liều dùng và chế độ dùng được lựa chọn sao cho vi khuẩn sinh axit lactic được dùng cho đối tượng theo sáng chế, có thể đưa đến các tác dụng điều trị, tác dụng phòng ngừa hoặc lợi ích sức khỏe mong muốn. Do đó, tốt hơn liều dùng là liều có hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa, mà phù hợp với loại động vật có vú và thiếu hụt serotonin được điều trị. Ví dụ, liều dùng hàng ngày là từ 10^4 đến 10^{11} , ví dụ, từ 10^5 đến 10^9 , hoặc từ 10^6 đến 10^8 , hoặc 10^8 đến 10^{10} tổng

đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming unit - CFU) của vi khuẩn có thể được sử dụng. Liều dùng hàng ngày được ưu tiên là khoảng 10^8 tổng CFU, ví dụ, 10^7 đến 10^9 hoặc 10^8 đến 10^9 CFU.

Chúng vi khuẩn sinh axit lactic tốt hơn là được dùng ở dạng tinh sạch, được phân lập, sấy khô, đông khô hoặc đông khô. Chúng vi khuẩn sinh axit lactic cũng có thể được dùng ở dạng bào chế tê liệt hoặc hoạt động (ví dụ, trong sản phẩm thực phẩm lên men). Do vậy, chúng vi khuẩn sinh axit lactic tốt hơn là được sản xuất hoặc điều chế ở dạng được đông khô hoặc đông khô.

Chúng vi khuẩn sinh axit lactic, tốt hơn là ở dạng được đông khô, có thể được chứa trong chế phẩm bao gồm, ngoài chúng vi khuẩn sinh axit lactic, ít nhất một tá dược và/hoặc hoạt chất khác. Các ví dụ không giới hạn nhưng có tính minh họa về các tá dược này bao gồm các chất độn, chất chống dính, chất gắn kết, chất phủ ngoài, chất màu, chất gây rã, chất tạo mùi, chất trượt, chất bôi trơn, chất bảo quản, chất hấp thụ, chất tạo ngọt và tá dược lỏng.

Các hoạt chất khác có thể được bao gồm trong chế phẩm chứa các hoạt chất này được sử dụng trong điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ trong số các ví dụ nêu trên về bệnh hoặc rối loạn do thiếu hụt serotonin.

Một khía cạnh liên quan của sáng chế xác định phương pháp ngăn ngừa, ức chế hoặc điều trị thiếu hụt serotonin và/hoặc bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh và giải phóng serotonin ngoại bào trong các điều kiện hiếu khí cho đối tượng.

Có thể sử dụng đường dùng bất kỳ trong số các đường dùng nêu trên. Chúng vi khuẩn sinh axit lactic có thể có lợi khi được dùng ở dạng chế phẩm như được mô tả trên đây.

Đối tượng cần điều trị bằng chủng vi khuẩn sinh axit lactic hoặc chế phẩm là động vật có vú hoặc chim, và tốt hơn là người. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn sinh axit lactic hoặc chế phẩm cũng có thể hoặc theo cách khác được dùng cho mục đích thú ý. Trong trường hợp như vậy, đối tượng có thể, ví dụ, được chọn trong số mèo, chó, cừu, dê, bò, ngựa làm các ví dụ minh họa nhưng không giới hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Hệ vi khuẩn đường ruột tạo ra rất nhiều chất chuyển hóa khác nhau có tác động đến sinh lý của vật chủ, chẳng hạn các axit mật thứ cấp và axit béo mạch ngắn. Tuy nhiên, hệ vi khuẩn này có một tiềm năng to lớn và tương đối chưa được khám phá để chuyển hóa các axit amin thơm. Các ví dụ của sáng chế chứng minh rằng serotonin được sản sinh trong lòng ống ruột bởi các vi khuẩn đường ruột, chẳng hạn *Lactobacillus*, được hấp thụ và có các tác dụng cả ở cục bộ và ngoại vi. Serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn có hoạt tính sinh học và có thể giải cứu các kiểu hình phát triển của hệ thần kinh ruột. Các ví dụ của sáng chế cũng thể hiện rằng các vi khuẩn sản sinh serotonin tốt đặc biệt có thể được phân lập và chọn lọc về khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí. Vi khuẩn sản sinh serotonin này cũng được thể hiện là có khả năng sản sinh serotonin *in vivo*.

Ví dụ 1 – Sản sinh serotonin *in vitro* và *in vivo* và đánh giá các chủng vi khuẩn thích hợp

Vật liệu và phương pháp

Động vật

Các con chuột *Tph1*^{+/+} (làm đối chứng cùng lứa) và *Tph1*^{-/-} (nền C57Bl/6) 8-12 tuần tuổi được nuôi trong phòng có kiểm soát khí hậu ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) được đưa vào chu kỳ 12 giờ chiếu sáng/tối (7:00 AM - 7:00 PM), cho ăn và uống nước tự do. Chuột *Tph1*^{-/-} đã được mô tả trước đó (*Cell* 135: 825-837 (2008)). Tất cả các quy trình động vật đã được phê duyệt bởi Ủy ban Đạo đức về Chăm sóc và Sử dụng Động vật ở Gothenburg, Thụy Điển. Động vật thu được từ nhân giống dị hợp tử và được xác định kiểu gen trước khi thí nghiệm. Đại tràng gần, huyết thanh từ *tĩnh mạch chủ*, vật liệu từ lòng ống ruột và manh tràng thu được từ mỗi con vật sau thí nghiệm. TPH1 là enzym giới hạn tỷ lệ tham gia vào quá trình tổng hợp serotonin nội sinh ở ngoại vi bao gồm trong đường tiêu hóa. Do đó, chuột bị bất hoạt gen *Tph1* (*Tph1*^{-/-}), bị thiếu hụt sản sinh serotonin nội sinh bên ngoài não bộ. Việc bất hoạt biểu hiện *Tph1* trong đường tiêu hóa của chuột *Tph1*^{-/-} được xác nhận bằng phản ứng chuỗi trùng hợp định lượng (quantitative polymerase chain reaction - qPCR). Một số mức serotonin rất thấp ở những con vật bị bất hoạt gen này vẫn còn ngay cả sau khi tái tạo ra các con vật dưới dạng không có vi sinh vật (GF). Có thể những mức thấp này có thể được tạo ra bởi các cơ chế bù trừ, thường gặp ở động vật bị bất hoạt gen,

chẳng hạn do sự hydroxyl hóa không đặc hiệu của tryptophan bởi phenylalanin hoặc tyrosin hydroxylaza trong ruột.

Nuôi cấy vi khuẩn, *Lactobacillus*

Đối với các thử nghiệm *in vitro*, *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938, DSM 32846, DSM 32848, DSM 32849, DSM 27131 và ATCC PTA 6475), *L. plantarum* 36E (thu được từ Bộ sưu tập giống chuẩn của Trường Đại học Gothenburg là “CCUG 61730”), *L. casei* LMG 6904 (thu được từ Bộ sưu tập vi sinh vật phối hợp của Bỉ) và *L. acidophilus* ATCC 4356 (thu được từ Bảo tàng giống chuẩn của Mỹ) được nuôi cấy trong canh trường decarboxylaza (DECT) được biến đổi bởi tryptophan trong điều kiện kỵ khí, tức là trong buồng Coy. Trong các thử nghiệm song song, chủng *Lactobacillus reuteris* (DSM 17938, DSM 32846, DSM 32848, DSM 32849, DSM 27131 và ATCC PTA 6475) được nuôi cấy trong canh trường DECT được biến đổi bởi tryptophan trong các điều kiện hiếu khí của môi trường xung quanh. Mỗi mẻ nuôi cấy được lấy mẫu ở 24 giờ và mẫu được ly tâm ($10.000 \times g$, 4°C, 2 phút). Thu viên vón và bảo quản trong glyxerol 20% (chất bảo quản lạnh) và đóng băng ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Canh trường DECT được biến đổi bởi tryptophan được thiết kế để thúc đẩy quá trình khử carboxyl của tryptophan và sản sinh serotonin bởi vi khuẩn. DECT chứa 0,5% phần chiết của thịt bò (BD Biosciences #212303), 0,1% phần chiết của nấm men (Oxoid Fisher-Scientific #LP0021), d-glucoza 0,05% (Millipore #346351), L-tryptophan 1% (Sigma-Aldrich #93659) và, cho các điều kiện kỵ khí, 0,05% xystein trong nước cất. Để thu được các DECT khác nhau thiếu oxy, xystein 0,05% được thêm vào làm chất khử. DECT được khử trùng trong 30 phút, 15 PSI ở 121°C.

Các thử nghiệm cấy cho chuột, *Lactobacillus*

Đối với các thử nghiệm này, các chủng vi khuẩn *L. reuteri* (DSM 17938, DSM 27131) và *L. casei* (LMG 6904) được nuôi cấy như trên trong các điều kiện kỵ khí, nhưng trong môi trường MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) thay cho canh trường DECT. Các mẫu nuôi cấy được thu gom ở 24 giờ, ly tâm ($4500 \times g$, 20 phút, 4°C), sau đó loại bỏ phần dịch nổi. Tạo huyền phù lại viên vón vi khuẩn trong ống hungate chứa 5 mL dung dịch đệm khử vô trùng (PBS được khử và vô trùng trộn với $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g/L và xystein 0,5 g/L với sự có mặt của NaHCO_3 4 g/L). Chuột *Tph1*^{-/-} trưởng thành được chuyển vào buồng

cách ly để thử nghiệm và cho nhịn đói trong 4 giờ. Sau đó chúng được cho ăn qua ống thông dạ dày (được cho ăn, được cấy) bằng 200 μ L dung dịch chứa một loại bất kỳ trong số các chủng vi khuẩn. Vào ngày 14 sau khi cấy, ruột kết gần, đám rối thần kinh cơ ruột - cơ dọc (longitudinal muscle-myenteric plexus - LMMP), và huyết thanh từ tĩnh mạch chủ, được thu gom từ những con vật này và xử lý để phân tích tiếp theo.

Đo serotonin trong huyết thanh bằng phương pháp ELISA

Huyết thanh từ các mẫu máu thu được từ *tĩnh mạch chủ* được chuẩn bị bằng cách sử dụng các ống Microvette® 500 Z-Gel (Sarstedt) sau khi ly tâm (5 phút; 10.000 $\times$ g; nhiệt độ phòng (RT), 20-25°C). Nồng độ serotonin trong các mẫu huyết thanh được đánh giá bằng cách sử dụng ELISA kit ADI-900-175 (Enzo Life Sciences), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đo các chất chuyển hóa của tryptophan trong canh trường bằng phương pháp đo khối phổ (mass spectrometry - MS) - MS rộng

Phần dịch nổi của canh trường (50 μ L) được chiết bằng 500 μ L metanol/axit axetic [99/1; thể tích/thể tích] chứa d6-kynurenin 500 nM, d5-5-HIAA 1,25 μ M và d4-Serotonin 250 nM làm các chuẩn nội (Sigma-Aldrich, Stockholm, Thụy Điển). Sau khi xoáy và ly tâm, các mẫu được tinh sạch bằng cách chuyển phần dịch nổi qua đĩa OSTRO SPE 96 (Waters, Milford, MA) nhờ sử dụng bộ phân phối áp suất dương (Biotage AB, Uppsala, Thụy Điển). Sau khi cho các chất bay hơi bay hơi trong dòng khí nitơ ở 40°C, tái hoàn nguyên các mẫu trong 150 μ L dung môi bơm (metanol:nước [10:90] + 0,1% axit clohydric (thể tích/thể tích)). Đường cong chuẩn chứa serotonin, tryptophan, 5-HIAA, kynurenin, indol, tryptamin và 5-hydroxytryptophan (Sigma-Aldrich, Stockholm, Thụy Điển) được tạo trong metanol/axit axetic [99/1; thể tích/thể tích] và xử lý cách tương tự như các mẫu. Các mẫu và mẫu đường cong hiệu chỉnh được bơm vào hệ thống Waters Acquity UPLC được trang bị cột Waters BEH C18 (cỡ hạt 2,1 $\times$ 100mm; 1,7 μ m). Duy trì nhiệt độ của cột ở 60°C và tốc độ dòng là 0,4 mL/phút. Nhiệt độ của dụng cụ lấy mẫu tự động được giữ ở 10°C. Các pha di động gồm nước với 0,1% axit formic (A) và axetonitril với 0,1% axit formic (B). Tiến hành rửa giải gradien bắt đầu bằng rửa giải đẳng dòng với 1% B trong 1 phút. Sau đó tăng gradien tuyến tính từ 1-15% B trong 2 phút sau đó là 15-99% B trong 1 phút. Sau 1 phút rửa giải đẳng dòng ở 99% B đưa gradien trở lại 1% B và giữ trong 2 phút trong tổng thời gian chạy là 7 phút. Các chất chuyển hóa của tryptophan được phát hiện

nhờ sử dụng Xevo TQ-XS (Waters, Milford, MA) sử dụng điện phun dương. Sau khi tối ưu hóa, các tham số nguồn ion là: Mao dẫn: 1,00 kV, nhiệt độ khử solvat 500°C, dòng khí khử solvat 1000 L/giờ, dòng khí hình nón 150 L/giờ, áp suất khí của bình phun 7,0 bar, điện áp hình nón (V) và năng lượng va chạm (eV): serotonin 30 V và 10 eV; tryptophan 25 V và 25 eV; 5-HIAA 20 V và 20 eV; kynurenin 20 V và 18 eV; indol 50 V và 23 eV; tryptamin 20 V và 18 eV; 5-hydroxytryptophan 25 V và 18 eV. Sự chuyển tiếp ion của tiền chất/sản phẩm mạnh nhất được chọn. Tiếp theo, sự chuyển tiếp MRM được sử dụng là: serotonin m/z 177,1 > 160,3; tryptophan 205,2 > 118,25; 5-HIAA 192,4 > 146,2; kynurenin 209,1 > 146,1; indol 118,2 > 91,2; tryptamin 161,3 > 144,3; 5-hydroxytryptophan 221,2 > 162,2; d6-kynurenin 215,1 > 152,1; d4-serotonin 181,2 > 164,2; d5-5-HIAA 197,3 > 151,2. Thời gian dừng là 24 mili giây.

Đo serotonin trong canh trường bằng phương pháp đo khối phổ (MS) - MS nhảy, đặc hiệu với serotonin

Phần dịch nổi của canh trường (50 μ L) được chiết bằng 250 μ L metanol/axit axetic [99/1; thể tích/thể tích] chứa serotonin (không được đánh dấu) làm chuẩn nội (Sigma-Aldrich, Stockholm, Thụy Điển). Sau khi xoáy và ly tâm, các mẫu được tinh sạch bằng cách chuyển phần dịch nổi qua đĩa OSTRO SPE 96 (Waters, Milford, MA) nhờ sử dụng bộ phân phối áp suất dương (Biotage AB, Uppsala, Thụy Điển). Sau khi cho các chất bay hơi bay hơi trong dòng khí nitơ ở 40°C tái hoàn nguyên các mẫu trong 150 μ L dung môi bơm (metanol:nước [10:90] + 0,1% axit clohydric (thể tích/thể tích)). Đường cong chuẩn chứa serotonin (Sigma-Aldrich, Stockholm, Thụy Điển) được tạo trong metanol/axit axetic [99/1; thể tích/thể tích] và xử lý cách tương tự như các mẫu. Các mẫu và mẫu đường cong hiệu chỉnh được bơm vào hệ thống Waters Acquity UPLC được trang bị cột Waters BEH C18 (cỡ hạt 2,1 $\times$ 100mm; 1,7 μ m). Duy trì nhiệt độ của cột ở 60°C và tốc độ dòng là 0,4 mL/phút. Nhiệt độ của dụng cụ lấy mẫu tự động được giữ ở 10°C. Các pha di động gồm nước với 0,1% axit formic (A) và axetonitril với 0,1% axit formic (B). Tiến hành rửa giải gradien bắt đầu bằng rửa giải đẳng dòng với 1% B trong 1 phút. Sau đó tăng gradien tuyến tính từ 1-15% B trong 2 phút sau đó là 15-99% B trong 1 phút. Sau 1 phút rửa giải đẳng dòng ở 99% B đưa gradien trở lại 1% B và giữ trong 2 phút trong tổng thời gian chạy là 7 phút. Serotonin được phát hiện nhờ sử dụng Xevo TQ-XS (Waters, Milford, MA) sử dụng điện phun dương. Sau khi tối ưu hóa, các tham số nguồn ion là: Mao dẫn: 1,00 kV, nhiệt

độ khử solvat 500°C, dòng khí khử solvat 1000 L/giờ, dòng khí hình nón 150 L/h, áp suất khí của bình phun 7,0 bar, điện áp hình nón (V) và năng lượng va chạm (eV): serotonin 30 V và 10 eV Sự chuyển tiếp ion của tiền chất/sản phẩm mạnh nhất được chọn. Tiếp theo, sự chuyển tiếp MRM được sử dụng là: serotonin m/z 177,1 > 160,3. Thời gian dừng là 27 mili giây.

Kết quả:

Các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic là loại sống phổ biến trong ruột người và nhiều chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic là các vi khuẩn probiotic đã được nghiên cứu rõ. Khả năng sản sinh serotonin của một số chủng *Lactobacillus*, bao gồm các chủng thuộc loài *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. casei*, và *L. acidophilus*, do đó đã được kiểm tra bằng thử nghiệm đo khối phổ (MS) rộng được tối ưu hóa cho các chất chuyển hóa cụ thể của tryptophan, bao gồm serotonin, để nhận diện các chủng vi khuẩn có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí và hiếu khí. Với phương pháp này, tất cả các chủng *L. reuteri* được thử nghiệm đều được thấy là sản sinh serotonin khi được nuôi cấy kỵ khí trong canh trường DECT trong 24 giờ (Fig.1A và bảng 1). Ngạc nhiên là, chủng vi khuẩn *L. reuteris* cũng được thấy là sản sinh serotonin khi chúng được nuôi cấy hiếu khí trong canh trường DECT trong 24 giờ (Fig.1A và bảng 1). Quan trọng là, và thậm chí ngạc nhiên hơn là, các mức serotonin được sản sinh bởi chủng *L. reuteris* trong các điều kiện hiếu khí cao hơn rõ rệt trong các điều kiện hiếu khí so với trong các điều kiện kỵ khí, dẫn đến tỷ lệ sản sinh serotonin hiếu khí/kỵ khí là lớn hơn 1,0 (>1,0). Ngược lại, không thấy có sự sản sinh serotonin đối với các các chủng vi khuẩn khác được thử nghiệm, tức là, *L. casei* LMG 6904, *L. plantarum* 36E hoặc *L. acidophilus* ATCC 4356, khi chúng được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí (bảng 1).

Bảng 1 – Sự sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí (nM) đối với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* như được đo bằng phương pháp MS rộng

Chủng vi khuẩn	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí (nM)	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện kỵ khí (nM)	Tỷ lệ sản sinh serotonin hiếu khí/sản sinh serotonin kỵ khí
----------------	--	--	---

<i>L. reuteri</i> DSM 17938	7,0	1,8	3,9
<i>L. reuteri</i> DSM 32846	10,0	2,5	4,0
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475	6,1	1,7	3,6
<i>L. reuteri</i> DSM 32848	8,8	1,0	8,8
<i>L. reuteri</i> DSM 32849	7,8	1,0	7,8
<i>L. reuteri</i> DSM 27131	9,1	3,1	2,9
<i>L. plantarum</i> 36E	Không được thử nghiệm	0,0	n/a
<i>L. casei</i> LMG 6904	Không được thử nghiệm	0,0	n/a
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Không được thử nghiệm	0,0	n/a

Ba chủng, *L. casei* LMG 6904, *L. plantarum* 36E và *L. acidophilus* ATCC 4356, cũng được thử nghiệm về sự sản sinh serotonin bằng cách sử dụng phương pháp đo khối phổ, nhạy hơn và đặc hiệu với serotonin. Bằng cách sử dụng phương pháp này, các mức serotonin thấp hoặc rất thấp đã được phát hiện trong môi trường thu được từ tất cả các chủng vi khuẩn này sau khi nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí (bảng 2). Tuy nhiên, không phát hiện được serotonin bằng phương pháp nhạy, đặc hiệu với serotonin này sau khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn này trong các điều kiện hiếu khí (bảng 2).

Bảng 2 – Sự sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí (nM) đối với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* như được đo bằng phương pháp MS nhạy, đặc hiệu với serotonin.

Chủng vi khuẩn	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí (nM)	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện kỵ khí (nM)
<i>L. plantarum</i> 36E	0,0	0,3
<i>L. casei</i> LMG 6904	0,0	0,1
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	0,0	0,9

Các kết quả này chỉ ra rằng một số, nhưng không phải tất cả, chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí và/hoặc hiếu khí. Ngoài ra, một số chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí, nhưng không có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí. Các kết quả này cũng chứng minh rằng các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic khác nhau là các loài sản sinh serotonin tốt hơn so với các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic trong điều kiện *in vitro* mô phỏng các điều kiện *in vivo* của đường tiêu hóa.

Trong các thử nghiệm tiếp theo, và để tìm hiểu xem liệu serotonin được sản sinh bởi các chủng vi khuẩn *L. reuteri* có hoạt tính sinh học và có thể được vận chuyển vào, và góp phần vào nhóm serotonin tuần hoàn *in vivo* ở chuột GF *Tph1*^{-/-} hay không. Các con chuột này, bị thiếu hụt sản sinh serotonin tự sinh, được cấy bằng *L. reuteri* DSM 17938 hoặc *L. reuteri* DSM 27131. Sự tăng mức serotonin trong huyết thanh của chuột GF *Tph1*^{-/-} được ghi nhận nhờ sử dụng ELISA sau khi cấy bằng một trong số chủng *L. reuteris* (Fig.1B), và sự tăng này là rõ rệt hơn với DSM 27131 khi so với DSM 17938. Trái lại, khi chuột GF *Tph1*^{-/-} được cấy bằng *L. casei* LMG 6904, không sản sinh serotonin *in vitro* (Fig.1A, bảng 1, bảng 2), các mức serotonin trong huyết thanh không tăng (Fig.1B). Các kết quả của các thí nghiệm này cho thấy rõ ràng rằng các loài *Lactobacillus* cụ thể, và các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic cụ thể, có khả năng sản sinh serotonin cục bộ trong đường tiêu hóa, chúng là khả dụng sinh học đối với vật chủ và có thể được vận chuyển từ đường tiêu hóa đến ngoại vi, do đó góp phần cả vào nhóm serotonin trong đường tiêu hóa và toàn thân.

Do đó, các kết quả chỉ ra rằng *L. reuteri* DSM 17938 và *L. reuteri* DSM 27131 là các ví dụ về các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic có thể được chọn lọc dựa vào khả năng sản sinh serotonin hiếu khí của chúng, tỷ lệ sản sinh serotonin trong điều kiện hiếu khí/sản sinh serotonin trong điều kiện kỵ khí cao và rằng chúng có thể được dùng để làm tăng mức serotonin *in vivo*. Hai chủng vi khuẩn này, và các chủng vi khuẩn sản sinh axit lactic khác, chẳng hạn chủng vi khuẩn *L. reuteri* trong bảng 1, có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí giống hoặc tương tự, vì vậy có thể được xem là có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin và bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin. Mặt khác, mặc dù có khả năng sản sinh ở mức thấp serotonin trong các điều kiện kỵ khí, chủng vi khuẩn chẳng hạn *L. plantarum* 36E, *L. casei* LMG 6904, hoặc *L. acidophilus* ATCC 4356, sẽ không được chọn hoặc được xem là có hiệu quả trong điều trị thiếu hụt serotonin dựa vào việc chúng không có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí *in vitro*.

Ví dụ 2 – Sản sinh serotonin *in vitro* và *in vivo* và đánh giá các chủng vi khuẩn thích hợp bổ sung

Do các chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* trong ví dụ 1 được thấy là các chủng sản sinh serotonin tốt trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí, một số chủng vi khuẩn *L. reuteri* bổ sung (bảng 3) được đánh giá về sự sản sinh serotonin của chúng.

Vật liệu và phương pháp

Tất cả các phương pháp nuôi cấy vi khuẩn và đánh giá serotonin được thực hiện như mô tả trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng phương pháp MS nhạy và đặc hiệu với serotonin. Các chủng vi khuẩn sinh axit lactic được thử nghiệm trong ví dụ này và các mức serotonin được phát hiện được nêu trong bảng 3 dưới đây.

Kết quả:

Các chủng vi khuẩn *L. reuteri* bổ sung được nuôi cấy trong cả điều kiện kỵ khí và hiếu khí trong DECT trong 24 giờ và sau đó đánh giá nồng độ serotonin trong môi trường nuôi cấy tương ứng (bảng 3). Thấy rằng tất cả các chủng vi khuẩn *L. reuteri* bổ sung này đều có khả năng sản sinh thấp, những có thể phát hiện được, lượng serotonin trong các điều kiện kỵ khí. Còn thấy rằng tất cả các chủng vi khuẩn *L. reuteri* này đều sản sinh nhiều serotonin hơn trong các điều kiện hiếu khí so với trong các điều kiện kỵ khí (bảng 3). Vì

vậy, tất cả các chủng *L. reuteri* này, có thể được chọn làm các chủng phù hợp theo sáng chế để sử dụng trong điều trị thiếu hụt serotonin và bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin.

Bảng 3 – Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí (nM) đối với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* bổ sung, như được đo bằng phương pháp MS nhạy đặc hiệu với serotonin

Chủng vi khuẩn	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí (nM)	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện kỵ khí (nM)	Tỷ lệ sản sinh serotonin hiếu khí/sản sinh serotonin kỵ khí
<i>L. reuteri</i> DSM 27131	1,1	0,4	2,8
<i>L. reuteri</i> DSM 32465	1,3	0,4	3,3
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475	0,8	0,7	1,1
<i>L. reuteri</i> DSM 33634	0,8	0,4	2,0
<i>L. reuteri</i> DSM 33635	1,3	0,4	3,3
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 5289	1,3	0,5	2,6
<i>L. reuteri</i> DSM 33632	1,5	0,4	3,8
<i>L. reuteri</i> DSM 33633	1,4	0,2	7,0
<i>L. reuteri</i> DSM 33509	0,9	0,2	4,5

Ví dụ 3 – Serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn có tác dụng *in vivo* đối với sự phát triển của ENS và quan trọng đối với sự phân bố dây thần kinh trong ngách của ruột kết

Vật liệu và các phương pháp

Nuôi cấy vi khuẩn, manh tràng chuột

Manh tràng được lấy từ chuột *Tph1*+/+ bình thường và được nuôi cấy trong DECT trong các điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Tại thời điểm này, các mẫu được ly tâm ($10.000 \times g$, 4°C, 2 phút) và thu lấy viên vón. Bảo quản viên vón trong glyxerol 20% (chất bảo quản lạnh) và đóng băng ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Nuôi cấy vi khuẩn, *Lactobacillus*

Đối với các thử nghiệm *in vivo*, *L. reuteri* DSM 27131 và *L. casei* LMG 6904 được nuôi cấy trong MRS trong các điều kiện kỵ khí. Mỗi mẻ nuôi cấy được lấy mẫu ở 24 giờ và mẫu được ly tâm ($10.000 \times g$, 4°C, 2 phút). Bảo quản viên vón trong glyxerol 20% (chất bảo quản lạnh) và đóng băng ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Các thử nghiệm cấy cho chuột, manh tràng chuột và *Lactobacillus*

Đối với các thử nghiệm này, manh tràng chuột, các chất trong manh tràng của chuột được nuôi cấy 48 giờ trong canh trường DECT hoặc *L. reuteri* DSM 27131 và *L. casei* LMG 6904 được nuôi cấy 24 giờ trong MRS được sử dụng. Các viên vón thu được từ manh tràng chuột và các chủng nuôi cấy *Lactobacillus* được tạo huyền phù lại trong ống hungate chứa 5 mL dung dịch đệm khử vô trùng (PBS được khử và vô trùng trộn với $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g/L và cystein 0,5 g/L với sự có mặt của NaHCO_3 4 g/L). Chuột *Tph1*-/- trưởng thành được chuyển vào buồng cách ly thí nghiệm và cho nhịn ăn trong 4 giờ. Chuột được cho ăn qua đường ống thông dạ dày 200 μL một trong số dung dịch chứa vi khuẩn từ manh tràng của chuột hoặc *Lactobacillus*. Vào ngày thứ 14 sau khi cấy, ruột kết gần, LMMP, huyết thanh từ tĩnh mạch chủ, các chất trong lòng ống của ruột kết và manh tràng được thu gom từ những con vật này.

Hóa mô miễn dịch

Các mẫu ruột kết gần được cố định trong PFA 4% ở 4°C qua đêm và giữ trong 70% EtOH ở 4°C trước khi phân chia. Mô được nhúng trong parafin và các phần cắt dày 10 μm được khử parafin theo các bước tuần tự (TissuClear 2×12 phút; 99% EtOH 2×2 phút; 95% EtOH 2×2 phút) bằng hệ Leica System. Để lấy kháng nguyên, các lam kính được ủ với 10 mM natri xitrat / dung dịch 0,05% TWEEN® 20 (pH 6,0), được làm ấm trong bể nước (95°C) trong 20 phút, ủ ở RT trong 20 phút và rửa hai lần bằng PBS-0,05% TWEEN® 20. Tiếp theo, ủ lam kính với dung dịch phong bế (PBS / 4% BSA / 4% huyết thanh lừa) trong 1 giờ, ở RT; kháng thể sơ cấp (bảng 4) được pha loãng trong dung dịch phong bế qua đêm,

ở 4°C; kháng thể thứ cấp (bảng 4) được pha loãng trong dung dịch phong bế trong 1 giờ ở RT; và dung dịch Hoechst trong 5 phút ở RT. Từ việc ủ với kháng thể sơ cấp, mỗi bước ủ theo sau là hai bước rửa trong PBS. Các lam kính được gắn bằng phương tiện gắn (Dako).

Bảng 4 – Các kháng thể dùng cho hóa mô miễn dịch

Các kháng thể sơ cấp	Nhà sản xuất	Tham chiếu	Pha loãng
Kháng serotonin của chuột	Abcam	ab6336	1/400
Kháng PGP9.5 của thỏ	Sigma-Aldrich	SAB4503057	1/400
Kháng TUJ1 của thỏ	Abcam	ab18207	1/400
Kháng thể thứ cấp	Nhà sản xuất	Tham chiếu	Pha loãng
Kháng 488 chuột của lừ	Life technologies	A21208	1/500
Kháng 568 thỏ của lừ	Life technologies	A10042	1/500

Sau khi cắt, các mẫu LMMP được cố định trong PFA 4% ở 4°C qua đêm và rửa bằng PBS lạnh 3 lần trong 10 phút. Tiếp theo, các LMMP được giữ trong dung dịch NaN_3 (NaN_3 0,1% được pha loãng trong PBS) ở 4°C cho đến khi nhuộm miễn dịch. Các mẫu LMMP được ủ trong 300 μL dung dịch phong bế (Triton X100 0,5%, BSA 4% và huyết thanh lừ 4% trong dung dịch NaN_3 0,1%) trong 1 giờ. Tiếp theo, các mô được ủ qua đêm với kháng thể sơ cấp (bảng 4) được pha loãng trong dung dịch phong bế sau đó là rửa bằng PBS 3 lần, 10 phút và được ủ với kháng thể thứ cấp (bảng 4) trong 1,5 giờ. Rửa các mô bằng PBS 3 lần, 10 phút và ủ với dung dịch Hoechst trong 5 phút và rửa lại bằng PBS 3 lần, 10 phút. các mẫu LMMP được gắn bằng phương tiện gắn dung dịch gắn phát huỳnh quang.

Mô được nhuộm miễn dịch được chụp ảnh bằng phép hiển vi đồng tụ sử dụng kính hiển vi soi ngược quét laze Zeiss Laser Scanning Inverted Microscope LSM-700 được trang bị vật kính 20×/0,8 NA và phần mềm Black Zen (Carl Zeiss).

PGP9.5 và TuJ1 là các dấu chuẩn đã được xác định rõ cho các noron ruột trưởng thành. Đối với ruột kết gần, tỷ lệ phần trăm của vùng dương tính miễn dịch đối với PGP9.5 hoặc TUJ1 bên trong mô ruột kết nhờ đó được định lượng và số lượng tế bào biểu mô dương tính với serotonin được đếm và chia cho diện tích niêm mạc. 2-3 hình ảnh được phân tích cho mỗi mô và 3 mẫu mô cho mỗi con vật được phân tích.

Đối với nhuộm miễn dịch ENS, diện tích phát huỳnh quang dương tính với serotonin được định lượng. 2-3 hình ảnh cho mỗi mẫu mô được phân tích.

Kết quả:

Vì serotonin cần thiết cho sự phát triển và trưởng thành bình thường của ENS, tác dụng của serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn đối với sự phát triển của ENS chuột được nghiên cứu (Fig.2A-Fig.2F). Phương pháp nhuộm miễn dịch cho thấy rằng sự khu trú của hệ vi khuẩn trong manh tràng chuột vào chuột GF *Tph1*^{-/-} đã làm tăng mức serotonin bên trong các noron ruột của ruột kết gần (Fig.2A). Sự có mặt của hệ vi khuẩn trong manh tràng cũng làm tăng các dấu chuẩn đã được xác định rõ của các noron ruột trưởng thành, PGP9.5 và TUJ1, trong mô ruột kết (Fig.2B và Fig.2C) chứng minh rằng serotonin được sản sinh bởi vi khuẩn đóng vai trò trong quá trình phát triển và trưởng thành của ENS. Chuột GF *Tph1*^{-/-} cũng được cấy bằng *L. reuteri* DSM 27131 hoặc *L. casei* LMG 6904 trong 14 ngày và được đánh giá về sự bổ sung thêm serotonin cho ENS. Thấy rằng việc cấy bằng *L. reuteri* DSM 27131, đã được thể hiện trước đó là sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí *in vitro* cũng như *in vivo*, làm tăng mức serotonin trong noron (Fig.2D) và DSM 27131 cũng làm tăng các dấu chuẩn của các noron trưởng thành, PGP9.5 và TuJ1, trong ruột kết gần, trong khi *L. casei* LMG 6904 không sản sinh serotonin không có tác dụng lên mức serotonin trong noron hoặc các dấu chuẩn của sự trưởng thành của noron trong ruột kết gần.

Ví dụ 4 – Phân lập và chọn lọc các chủng vi khuẩn ở người sản sinh serotonin

Vật liệu và các phương pháp

Thu gom phân người

Việc lấy mẫu phân người được thực hiện từ ba người cho khỏe mạnh độ tuổi từ 30 đến 50. Những người tình nguyện này chưa được điều trị và chưa dùng bất kỳ chất kháng sinh nào. Việc lấy mẫu phân người và sử dụng các mẫu này sau đây được thực hiện theo các chính sách và điều khoản về đạo đức của Thụy Điển.

Nuôi cấy vi khuẩn – phân người

Phân người vừa được bài tiết ra (1% (trọng lượng/thể tích) chất dùng để nuôi cấy) được nuôi cấy trong canh trường DECT, trong điều kiện kỵ khí, tức là, trong buồng Coy, hoặc trong các điều kiện hiếu khí môi trường xung quanh. Mỗi mẻ nuôi cấy được lấy mẫu ở các thời điểm khác nhau (0 h, tức là trước khi nuôi cấy, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ) và mẫu được ly tâm (10.000 x g, 4°C, 2 phút). Phần dịch nổi và viên vón được đóng băng ở -80°C. Phần dịch nổi được sử dụng để đo serotonin và viên vón được dùng để phân tích tập đoạn vi khuẩn trong các mẫu bằng cách sử dụng phân tích gen 16S rARN. Một lượng dự trữ trong glyxerol của mỗi mẫu cũng được giữ từ mỗi thời điểm như mô tả trên đây.

Phân lập các loại vi khuẩn sản sinh serotonin

Canh trường được tạo ra theo ví dụ 1. Môi trường LYBHI chứa Brain Heart Infusion (BHI) 3,7% (Oxoid Fisher-Scientific # CM1135), L-xystein 0,05% (Sigma-Aldrich #W326305), D-(+)-xenlobioza 0,1% (Sigma-Aldrich #22150), maltoza 0,1%, và hemin 0,0006% (Sigma-Aldrich #51280). Để thu được các DECT và LYBHI khác nhau thiếu oxy, xystein 0,05% được thêm vào làm chất khử. Môi trường sinh trưởng được khử trùng trong 30 phút, 15 PSI ở 121°C. Các phần trữ trong glyxerol 36 giờ thu được từ phân người được nuôi cấy trong canh trường DECT được cấy trải trên đĩa LYBHI (canh trường LYBHI với 2% aga; Nordic Biolabs #214010), DECT (canh trường với 2% aga) và MRS (50 g bột MRS của hãng Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich #69966) và 1 ml TWEEN® 80 (Sigma-Aldrich #P8074) trong 1 L nước cất với 2% aga) trong các điều kiện kỵ khí. Việc cấy trải được thực hiện 3 lần nghĩa là đĩa nuôi cấy lần thứ hai được thực hiện từ việc lấy mẫu của vùng có mật độ cao nhất trên đĩa thứ nhất lên đĩa thứ hai, và từ đĩa thứ hai sang đĩa thứ ba. Mỗi khuẩn lạc phân lập sau đó được nuôi cấy trong LYBHI, DECT và MRS, tương ứng để tạo ra các phần trữ trong glyxerol và để thu lấy ADN sau khi ly tâm (10.000 x g, 4°C, 2 phút). Việc thu ADN được thực hiện để tiến hành giải trình tự gen 16S rARN để nhận dạng mỗi chủng vi khuẩn. Độ tinh sạch của mỗi chủng phân lập được kiểm tra bằng

cách nhuộm Gram. Đối với động học sản sinh serotonin, mỗi chủng phân lập được nuôi cấy trong canh trường DECT, trong 24 giờ, trong các điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Sau đó, các mẫu từ các mẻ nuôi cấy được thu gom và ly tâm (10.000 x g, 4°C, 2 phút) để thu lấy phần dịch nổi và phân tích các mức serotonin.

Tách chiết ADN bộ gen tổng số của phân

ADN được tách từ viên vón thu được từ 1,5 ml mẫu nuôi cấy bằng cách sử dụng kit NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất nhưng có thay đổi ở bước ly giải tế bào. Các mẫu được tạo huyền phù trong dung dịch đệm SL2 có bổ sung SX và sau đó được trộn trong máy vortex có adaptor ngang ở tốc độ lớn nhất trong 2 phút. Tế bào được ly giải bằng cách gia nhiệt ở 90°C trong 10 phút sau đó là phá tế bào bằng vi hạt ba lần ở 5,5 m/giây trong 60 giây nhờ sử dụng FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals). Các bước gia nhiệt và phá tế bào bằng vi hạt được lặp lại thêm một lần và các phần dịch nổi từ hai lần chiết được gộp lại trước khi tinh sạch nhờ sử dụng các cột trong kit. ADN được rửa giải nhờ sử dụng dung dịch đệm rửa giải và nồng độ và chất lượng ADN được kiểm tra bằng cách sử dụng máy đo quang phổ NanoDrop.

Giải trình tự 16S rARN và nhận dạng các chủng phân lập

Chiều dài đầy đủ của gen 16S rARN được khuếch đại nhờ sử dụng cặp mồi 27F và 1492R được thiết kế để lập chỉ mục kép (*Appl Environ Microbiol* 79: 5112-5120 (2013)). Mỗi mẫu được khuếch đại trong 50 µL phản ứng chứa HotStarTaq Master Mix 2X (QIAGEN), 10 µmol/L mỗi mồi và 250 ng ADN bộ gen. Tiến hành PCR theo các điều kiện sau: biến tính ban đầu trong 5 phút ở 94°C, sau đó là 26 chu kỳ gồm biến tính trong 30 giây ở 94°C, gắn mồi trong 40 giây ở 52°C và kéo dài chuỗi trong 90 giây ở 72°C, và bước kéo dài sau cùng trong 7 phút ở 72°C. Các mẫu được tinh sạch bằng NucleoSpin Gel và kit PCR Clean-up (Macherey-Nagel) và định lượng nhờ sử dụng máy đo quang phổ NanoDrop. Chuẩn bị các độ pha loãng 10 ng/µl trong thể tích 40 µL và gửi đến Eurofins để giải trình tự. Các trình tự khuếch đại xuôi và ngược được thu nhận cho mỗi chủng phân lập và được canh thẳng để tìm trình tự liên ứng. Sau đó, trình tự liên ứng được tìm kiếm trình tự tương đồng nhờ sử dụng công cụ Basic Local Alignment Search Tool của NCBI để nhận dạng vi khuẩn.

Đo Serotonin trong canh trường bằng phương pháp MS nhạy đặc hiệu với serotonin

Serotonin được sản sinh bởi các chủng vi khuẩn này được định lượng nhờ sử dụng phương pháp đo khối phổ nhạy và đặc hiệu với serotonin như mô tả trong ví dụ 1.

Kết quả:

Sản sinh serotonin

Để nhận dạng các vi khuẩn sản sinh serotonin từ ruột người, các mẫu phân từ hai người cho có tổng lượng sản sinh serotonin cao nhất, tức là, người cho #1 và người cho #2, được nuôi cấy trong DECT trong các điều kiện kỵ khí. Tổng số, thu được 199 chủng phân lập; 122 chủng phân lập vi khuẩn từ người cho #1 và 77 từ người cho #2 nhờ sử dụng các đĩa thạch LYBHI, DECT và MRS. Các mức sản sinh serotonin bởi các chủng phân lập này sau đó được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng phân lập thu được dưới dạng các mẻ cấy đơn trong các điều kiện kỵ khí hoặc hiếu khí. Trong số 199 chủng phân lập, chỉ có sáu chủng phân lập từ người cho #1 và 11 chủng phân lập từ người cho #2 sản sinh mức serotonin phát hiện được trong canh trường DECT trong các điều kiện kỵ khí (bảng 5; Fig.3). Trong số 199 chủng phân lập, 24 chủng phân lập trong tổng số được thấy là sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí và các chủng phân lập này bao gồm các chủng phân lập cũng sản sinh serotonin trong các điều kiện kỵ khí. Đối với tất cả 24 chủng phân lập này, sự sản sinh serotonin được cải thiện trong các điều kiện hiếu khí so với trong các điều kiện kỵ khí. Phân tích giải trình tự 16S rARN nhận dạng 24 chủng phân lập là *Lactobacillus mucosae* (n=13), *Lactobacillus plantarum* (n=6), và *Enterococcus spp.* (n=1) (bảng 5). Cuối cùng, bốn chủng phân lập từ người cho #2 chưa được nhận dạng rõ ràng, nhưng các chủng phân lập này có mối quan hệ gần gũi với *Escherichia*, *Shigella*, hoặc *Brenneria* các chủng vi khuẩn (bảng 5). Tuy nhiên, các kết quả này gợi ý vai trò quan trọng của chi *Lactobacillus*, và đặc biệt là vai trò quan trọng đối với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus mucosae* và *Lactobacillus plantarum*, trong việc sản sinh serotonin, cả trong các điều kiện kỵ khí và hiếu khí.

Các chủng vi khuẩn sinh axit lactic sản sinh serotonin tốt trong các điều kiện hiếu khí thuộc *L. mucosae* hoặc *L. plantarum* được chọn lọc (bảng 5). Cụ thể hơn, chủng vi khuẩn *L. mucosae* h1D22g, h1M31d, h1M31g, và h1M32d, và *L. plantarum* h2M3E và h2M3i được chọn và nộp lưu ở DSMZ (các số nộp lưu tương ứng lần lượt là DSM 33291, DSM 33292, DSM 33293, DSM 33661, DSM 33662, và DSM 33295) dựa vào khả năng sản sinh serotonin của chúng trong các điều kiện hiếu khí.

Bảng 5 – Các chủng sản sinh serotonin phân lập của người và sự sản sinh serotonin *vitro* như được đo bằng phương pháp MS nhạy đặc hiệu với serotonin

ID	Nhận dạng 16S rARN	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện hiếu khí (nM)	Sản sinh serotonin ở DECT, các điều kiện kỵ khí (nM)	Tỷ lệ sản sinh serotonin ở các điều kiện hiếu khí/sản sinh serotonin ở các điều kiện kỵ khí
h1D22g; DSM 33291	<i>Lactobacillus mucosae</i>	7,7	1,5	5,1
h1M1a	<i>L. mucosae</i>	4,5	2,3	2,0
h1M31D; DSM 33292	<i>L. mucosae</i>	5,7	2,9	2,0
h1M31g; DSM 33293	<i>L. mucosae</i>	5,8	1,6	3,6
h1M32b; DSM 33661	<i>L. mucosae</i>	5,2	2,8	1,9
h1M32d	<i>L. mucosae</i>	5,3	1,7	3,1
h2D1a	<i>Chưa biết</i>	1,3	0,4	3,25
h2D1b	<i>Chưa biết</i>	0,4	0,03	13,3

h2D1c	<i>Escherichia fergusonii</i> coli; <i>Shigella sonnei</i> , <i>boydii</i> , <i>flexneri</i> ; <i>Brenneria alni</i> *	0,9	0,0	n/a
h2D1d	<i>E. fergusonii</i> coli; <i>S. sonnei</i> , <i>flexneri</i> ; <i>B. alni</i> *	0,7	0,2	3,5
h2M1a	<i>L. mucosae</i>	2,2	0,0	n/a
h2M1b	<i>L. mucosae</i>	3,2	0,1	32,0
h2M1c	<i>L. mucosae</i>	4,5	0,1	45,0
h2M1d	<i>L. mucosae</i>	2,8	0,3	9,3
h2M1e	<i>L. mucosae</i>	3,2	0,6	5,3
h2M1h	<i>L. mucosae</i>	3,5	0,4	8,8
h2M1i	<i>L. mucosae</i>	3,2	0,000	n/a
h2M2h	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>hirae</i> , <i>durans</i> , <i>mundtii</i> *	6,6	0,2	33,0
h2M3c	<i>L. plantarum</i>	2,1	1,0	2,1
h2M3e;	<i>L. plantarum</i>	2,5	1,5	1,7

DSM 33662				
h2M3f	<i>L. plantarum</i>	3,1	0,0	n/a
h2M3g	<i>L. plantarum</i>	2,7	0,0	n/a
h2M3h	<i>L. plantarum</i>	2,4	0,0	n/a
h1M3i; DSM 33295	<i>L. cplantarum</i>	3,4	0,0	n/a

* Không thể nhận dạng được loài của chủng phân lập này và việc nhận dạng dựa trên 16S rARN cho ra tất cả các loài được liệt kê là các loài tiềm năng của chủng phân lập.

Ví dụ 5 – Các thử nghiệm cấy cho chuột bằng các chủng vi khuẩn sản sinh serotonin của người

Vật liệu và phương pháp

Cấy cho chuột bằng các chủng vi khuẩn sản sinh serotonin của người

Việc cấy cho chuột được thực hiện nhờ sử dụng chuột *Tph1*^{-/-} không có vi sinh vật. Các con vật được cấy bằng một trong số *Lactobacillus mucosae* DSM 33661 hoặc *Lactobacillus plantarum* DSM 33662 nhờ sử dụng phương pháp giống như mô tả trong ví dụ 3. Huyết thanh và các mẫu lòng ống ruột, cũng như mô từ ruột kết gần, được thu gom vào 14 ngày sau khi cấy và phân tích serotonin.

Đo serotonin trong huyết thanh và lòng ống ruột bằng ELISA

Các mẫu máu từ huyết thanh được thu từ *tĩnh mạch chủ* được chuẩn bị nhờ sử dụng các ống Microvette® 500 Z-Gel (Sarstedt) sau khi ly tâm (5 phút; 10.000 × g; nhiệt độ phòng (RT), 20-25°C). Chất trong lòng ống ruột của đường tiêu hóa được lấy mẫu từ ruột kết gần hoặc từ manh tràng. Các chất trong lòng ống ruột này được cân và đóng băng nhanh. Serotonin từ các chất trong lòng ống ruột sau được tách chiết như sau. Một thể tích dung dịch Tris-HCl 25 mM / EDTA 1 mM / EGTA 1 mM được thêm vào mỗi mẫu (trọng lượng/thể tích là 1 mg / 2 µL), được đồng nhất hóa với 5 mm hạt thép và TissueLyser

(Qiagen, 25 Hz, 2 phút), được ủ qua đêm ở 4°C và ly tâm ở 4°C, 20 phút, $10.000 \times g$. Phần dịch nổi của mỗi mẫu được thu gom và giữ ở -80°C cho đến khi phân tích. Các phần dịch nổi canh trường thu được từ các mẻ nuôi cấy vi khuẩn để đo serotonin và canh trường không nuôi cấy được dùng làm mẫu trắng. Serotonin từ tất cả các mẫu được đánh giá bằng cách sử dụng kit ELISA ADI-900-175 (Enzo Life Sciences), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Vùng dương tính miễn dịch với serotonin trong ruột kết gần

Dương tính miễn dịch với serotonin ở các mẫu mô từ vùng ruột kết gần được phân tích và định lượng như mô tả trong ví dụ 3.

Kết quả

Hai chủng vi khuẩn phân lập từ người, *L. mucosae* DSM 33661 và *L. plantarum* DSM 33662, được chọn lọc dựa trên khả năng sản sinh serotonin của nó trong các điều kiện kỵ khí và hiếu khí *in vitro*. Các chủng này được thấy là cũng sản sinh serotonin chức năng *in vivo* (Fig.4). Đồ thị thể hiện rằng các chủng vi khuẩn này có khả năng làm tăng các mức serotonin cả cục bộ trong lòng ống ruột (Fig.4A) và trong hệ tuần hoàn toàn thân (các mẫu huyết thanh, Fig.4B) khi so với các mức phát hiện trong chuột không có vi sinh vật tương ứng. Ngoài ra, cả hai chủng vi khuẩn ở người này được thấy là làm tăng vùng dương tính với serotonin trong ENS của ruột kết gần (Fig.4C). Do đó, các chủng vi khuẩn của người này có khả năng làm tăng các mức serotonin cục bộ trong lòng ống ruột (manh tràng) *in vivo* và serotonin được sản sinh cục bộ này có hoạt tính sinh học và có thể được vận chuyển vào hệ tuần hoàn toàn thân (huyết thanh) và trong các neuron của hệ thần kinh ruột của ruột kết gần. Các kết quả chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn hội sinh ở người sản sinh serotonin có thể được phân lập, nhận dạng và chọn lọc để làm tăng các mức serotonin *in vivo*.

Ví dụ 6 – Sự bám dính vào chất nhầy bởi các chủng vi khuẩn sản sinh serotonin

Vật liệu và phương pháp

Chuẩn bị chất nhầy và lớp phủ

Chất nhầy được chuẩn bị từ ruột non của lợn. Bên trong của 5 cm ruột được cạo bằng dụng cụ vét (spatula) và chất được lấy ra và thu gom trong 5 ml PBS giữ lạnh trên nước đá. Huyền phù thu được được ly tâm lần đầu ở $11.000 \times g$ trong 10 phút và sau đó ở

26.000 × g trong 15 phút để loại bỏ tế bào và chất dạng hạt. Mẫu chất nhầy được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Vật liệu chất nhầy được pha loãng đến $A_{280} = 0,1$ (độ hấp thụ ở 280 nm = 0,1) trong PBS pH 6,0 và ủ qua đêm trong các giếng microtiter (Nunc MaxiSorb) (150 µl mỗi giếng) ở 4°C có kèm khuấy chậm. Các giếng sau đó được rửa bằng PBS (pH 6,0) với 0,05% TWEEN® 20 (PBST), sau đó phong bế bằng 0,2 ml PBS pH 6,0 với 1% TWEEN® 20 trong 1 giờ và cuối cùng được rửa hai lần bằng PBST.

Chuẩn bị vi khuẩn

Các thử nghiệm về độ bám dính vào chất nhầy được thực hiện với các chủng vi khuẩn: *Lactobacillus reuteri* DSM 27131, DSM 32465, DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, DSM 33635, và DSM 33509; *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, DSM 33292, DSM 33293, và DSM 33661; và *Lactobacillus plantarum* DSM 33662. Mỗi chủng *Lactobacillus* được ủ từ dung dịch gốc đông băng ở -70°C và sinh trưởng trong 10 ml canh trường MRS (Merck) trong 16 giờ ở 37°C. OD được đo ở 600 nm và mẫu được pha loãng đến OD 0,5 (tổng thể tích là 1 ml). Các dung dịch vi khuẩn đã pha loãng sau đó được rửa hai lần bằng PBST pH 7,4 và tạo huyền phù lại trong PBST pH 6,0. Sau khi rửa lần cuối và huyền phù lại trong PBST pH 6,0, vi khuẩn được pha loãng và cấy trải trên thạch MRS để phân tích giá trị bắt đầu (đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony forming unit - cfu)/ml). Các huyền phù vi khuẩn tương tự được sử dụng cho các thử nghiệm liên kết.

Liên kết vào chất nhầy, giải phóng trypsin và định lượng

Các huyền phù vi khuẩn (150 µl) được thêm vào mỗi giếng và ủ trong 4 giờ ở 37°C có kèm khuấy chậm. Các giếng này được rửa 4 lần bằng PBST, pH 6,0, để loại bỏ các vi khuẩn không liên kết. Sau khi rửa, 150 µL dung dịch EDTA trypsin (0,25% trypsin lợn và 1 mM EDTA • 4Na trong dung dịch muối cân bằng Hank) được thêm vào các giếng và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, vi khuẩn được giải phóng được trộn đều, pha loãng liên tiếp và cấy trải trên các đĩa thạch MRS. Các đĩa được ủ ở các điều kiện kỵ khí trong 24 giờ ở 37°C sau đó đếm các khuẩn lạc (đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu)) và tính số lượng vi khuẩn bám dính trên mỗi giếng.

Kết quả:

Nghiên cứu xem liệu vi khuẩn sinh axit lactic sản sinh serotonin cũng có khả năng gắn vào chất nhầy *in vitro* hay không, điều này sẽ chứng tỏ rằng chúng cũng có thể gắn

vào chất nhầy như vậy *in vivo*, cụ thể là vào niêm mạc ruột, và nhờ đó cho phép sự hấp thu serotonin được sản sinh và tiết ra bởi vi khuẩn qua niêm mạc ruột, và cụ thể là qua biểu mô ruột. Các chủng vi khuẩn được thử nghiệm về độ bám dính được chọn lọc dựa trên khả năng sản sinh serotonin của nó trong các điều kiện hiếu khí. Thấy rằng *L. reuteri* DSM 27131, có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí *in vitro* và cũng có thể góp phần vào nhóm serotonin toàn thân *in vivo*, có khả năng gắn vào chất nhầy (Fig.10A). Khả năng này cũng được ghi nhận và còn được tăng lên với tất cả các chủng *L. reuteri* khác được thử nghiệm (DSM, 32465, DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, DSM 33635, và DSM 33509), và cả với tất cả các chủng *L. mucosae* khác được thử nghiệm (DSM 33291, DSM 33292, DSM 33293, DSM 33661) và chủng *L. plantarum* DSM 33662) (Fig.10A và 10B). Khả năng bám dính của mỗi trong số các chủng vi khuẩn *L. reuteri* DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, DSM 33635, và DSM 33509 cũng được thấy là được cải thiện khi so với khả năng bám dính của chủng gốc tương ứng của nó (dữ liệu không được thể hiện). Các kết quả này chỉ ra rằng một số chủng vi khuẩn sinh axit lactic thuộc loài *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mucosae*, và *Lactobacillus plantarum* có thể gắn vào niêm mạc ruột, ở đó các chất chuyển hóa, chẳng hạn serotonin, sau đó có thể được sản sinh và tiết ra gần lớp đệm biểu mô ruột của đường tiêu hóa.

Ví dụ 7 - Sản xuất sản phẩm probiotic được bào chế trên nền dầu để sử dụng trong thiếu hụt serotonin

Trong ví dụ này, sản phẩm probiotic để sử dụng trong thiếu hụt serotonin được sản xuất. Chủng vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí được chọn lọc như được bộc lộ ở đây, chủng vi khuẩn bất kỳ trong số các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* này trong các ví dụ 1, 2, 4 hoặc 6. Các chủng này sau đó được nuôi cấy riêng biệt dưới dạng các mẻ nuôi cấy tinh sạch và đông khô, nhờ sử dụng các phương pháp chuẩn để nuôi cấy các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong công nghiệp. Sản phẩm là chế phẩm bào chế trên nền dầu với một chủng vi khuẩn đơn (tinh sạch) cho độ ổn định và thời hạn sử dụng tốt. Đặc điểm độc đáo của quy trình sản xuất là bước làm khô dầu bằng cách đặt nó trong chân không để loại bỏ hầu hết nước trong dầu và làm tăng độ ổn định của chế phẩm. Dầu được sử dụng ở đây là dầu thực vật ăn được nguyên chất, tốt hơn là dầu hướng dương và triglycerit chuỗi trung bình.

Trộn các thành phần.

1. Trộn triglyxerit chuỗi trung bình, ví dụ, Akomed R (Karlshamns AB, Karlshamn Thụy Điển), và dầu hướng dương, ví dụ, Akosun (Karlshamns AB, Karlshamn Thụy Điển), với silic dioxit (Cab-o-sil M5P, M5P, Cabot) trong máy/thùng trộn Bolz (Alfred BOLZ Apparatebau GmbH, Wangen im Allgäu, Đức).

2. Đồng nhất hóa. Bơm hình sin và máy phân tán (dispax) (Sine Pump, Arvada, Colorado) được nối với máy trộn Bolz và hỗn hợp được đồng nhất hóa.

3. Sấy chân không. Hỗn hợp được sấy trong chân không ở áp suất 10 mBar trong thùng Bolz trong 12 giờ.

4. Thêm vi khuẩn *Lactobacillus*. Khoảng 20kg hỗn hợp dầu khô được chuyển vào bình bằng thép không gỉ dung tích 50 lít. Bột vi khuẩn *Lactobacillus*, tốt hơn là được sấy đông khô; lượng vi khuẩn *Lactobacillus* được sử dụng sẽ thay đổi tùy thuộc vào lượng muốn có trong dầu, nhưng một ví dụ là có thể thêm 0,2kg mẻ nuôi cấy có 10^{11} CFU mỗi g, được thêm vào. Hỗn hợp được trộn từ từ cho đến khi đồng nhất.

5. Trộn đều. Hỗn hợp trộn trước với vi khuẩn *Lactobacillus* được đưa trở lại máy trộn Bolz.

6. Đổ ra. Huyền phù được đổ vào bình thủy tinh 200 lít và phủ bằng khí nitơ. Huyền phù được giữ trong bình cho đến khi nạp đầy các chai phun để được sử dụng qua đường miệng cho người để ngăn ngừa hoặc điều trị thiếu hụt serotonin.

Ví dụ 8 - Sản xuất sản phẩm probiotic ở dạng viên nén để sử dụng trong thiếu hụt serotonin

Trong ví dụ này, chủng *Lactobacillus* có khả năng sản sinh serotonin trong các điều kiện hiếu khí được sử dụng để sản xuất viên nén để sử dụng trong ngăn ngừa, ức chế và/hoặc điều trị thiếu hụt serotonin ở người. Chủng *Lactobacillus* được nuôi cấy và đông khô, nhờ sử dụng các phương pháp chuẩn để nuôi cấy lactobacillus trong công nghiệp.

Các bước sau đây minh họa một ví dụ về quy trình sản xuất cho các viên nén chứa chủng vi khuẩn được chọn, bao gồm cả việc bọc đường glucoza. Cần hiểu rằng các tá dược, chất độn, hương vị, chất bao bọc, chất bôi trơn, chất chống đóng vón, chất tạo ngọt và các thành phần khác của sản phẩm viên nén như được biết trong lĩnh vực này, có thể sử dụng mà không ảnh hưởng đến hiệu quả của sản phẩm:

1. Làm tan chảy. SOFTISAN™ 154 (SASOL GMBH, Bad Homburg, Đức) tan chảy trong bình và gia nhiệt nó đến 70°C để đảm bảo phá vỡ hoàn toàn cấu trúc tinh thể. Sau đó làm mát nó xuống đến 52 - 55°C (ngay trên điểm đông cứng của nó).

2. Tạo hạt. Chuyển bột đông khô của vi khuẩn *Lactobacillus* vào máy trộn/máy tạo hạt cắt cao Diosna, hoặc thiết bị tương đương. Thêm từ từ trong khoảng thời gian 1 phút SOFTISAN™ 154 tan chảy vào bột vi khuẩn *Lactobacillus*. Sử dụng máy nghiền (chopper) trong quá trình thêm.

3. Sàng ướt. Ngay sau khi tạo hạt, cho các hạt đi qua lưới sàng cỡ 1 mm bằng cách sử dụng cối xay Tornado. Hạt đã được sàng được đóng gói trong túi alu, làm bằng lá nhôm phủ PVC, được dán kín bằng máy hàn nhiệt để tạo thành túi, cùng với gói chất làm khô, và bảo quản lạnh cho đến khi trộn. Mẻ được tạo hạt được chia thành hai mẻ viên nén.

4. Thêm D-glucosa được bọc (G8270, >99,5% glucosa, Sigma), được bọc bằng cách sử dụng các phương pháp bọc chuẩn như đã biết trong lĩnh vực. Lượng đường phụ thuộc vào CFU tổng của bột vi khuẩn *Lactobacillus* khô được thêm vào, mức chuẩn có thể là 1 gam đường trên mỗi CFU tổng là 10^8 vi khuẩn nhưng lượng này cũng có thể thay đổi hạ xuống 0,1 gam hoặc 0,01 gam đến 10 gam thậm chí là đến 100 gam đường.

5. Trộn đều. Trộn tất cả các thành phần trong máy trộn, để thu được hỗn hợp trộn đồng nhất.

6. Ép. Chuyển hỗn hợp trộn sau cùng vào phễu của viên nén quay nén và ép các viên nén với tổng trọng lượng là 765 mg, trong máy ép viên Kilian.

7. Đóng gói hàng loạt. Các viên nén được đóng gói trong túi alu cùng với túi rây phân tử làm khô. Túi alu được đặt trong vật chứa bằng nhựa và bảo quản ở nơi mát ít nhất một tuần trước khi đóng gói cuối cùng. Việc sử dụng SOFTISAN™, dầu cọ được hydro hóa, cho phép tế bào *Lactobacillus* được bọc trong chất béo và được bảo vệ trong môi trường.

Như nói trên đây, sản phẩm của các phương án có thể ở các dạng không phải viên nén, và các phương pháp chuẩn để điều chế sản phẩm cơ bản là như đã biết trong lĩnh vực được sử dụng có lợi để điều chế sản phẩm theo sáng chế bao gồm chủng nuôi cấy *Lactobacillus* được chọn lọc.

Các phương án được mô tả trên đây được hiểu chỉ là một vài ví dụ minh họa của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có thể thực hiện các cải biến, tổ hợp và thay đổi khác nhau đối với các phương án này mà không nằm ngoài phạm vi bảo hộ của sáng chế. Cụ thể là, các giải pháp từng phần khác trong các phương án khác có thể được kết hợp trong các hình trạng khác, trong đó có thể là vấn đề kỹ thuật. Tuy nhiên, phạm vi của sáng chế được giới hạn bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chọn lọc chủng vi khuẩn để sử dụng trong điều trị bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy (S1), trong các điều kiện hiếu khí, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* được chọn từ nhóm gồm có chủng vi khuẩn *L. reuteri* và chủng vi khuẩn *L. mucosae* trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan, và tốt hơn là chứa nguồn cacbon;

phát hiện (S2) serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó;

xác định (S15) liệu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám vào niêm mạc đường tiêu hóa hay không; và

chọn lọc (S3) chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có hiệu quả trong điều trị bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó và nếu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám vào niêm mạc đường tiêu hóa, trong đó bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin được chọn từ nhóm gồm có lo âu, tâm trạng chán nản, hung hăng, trí nhớ kém, rối loạn ăn uống, rối loạn ám ảnh - cưỡng chế, rối loạn hoảng sợ, rối loạn căng thẳng sau chấn thương, rối loạn lo âu xã hội, hội chứng ruột kích thích (irritable bowel syndrome - IBS), bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), bệnh tim mạch, chứng loãng xương, rối loạn nhu động đường tiêu hóa, bệnh đa tuyến nội tiết tự miễn - nhiễm nấm Candida - loạn dưỡng ngoại bì (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy - APECED), bệnh loãng xương và tình trạng mất xương.

2. Phương pháp theo điểm 1, phương pháp này còn bao gồm các bước:

nuôi cấy (S10), trong các điều kiện kỵ khí, vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường nuôi cấy chứa tryptophan;

phát hiện (S11) serotonin bất kỳ được sản sinh bởi vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí; và

tính (S12) tỷ lệ giữa nồng độ của serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện hiếu khí và nồng độ của serotonin

được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó khi được nuôi cấy trong các điều kiện kỵ khí, trong đó

bước chọn lọc (S3) chủng vi khuẩn *Lactobacillus* bao gồm chọn lọc (S3) chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có hiệu quả trong điều trị bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu tỷ lệ bằng hoặc lớn hơn 1,0, tốt hơn là lớn hơn 1,0, và nếu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng gắn vào chất nhầy ruột và/hoặc có khả năng bám vào niêm mạc đường tiêu hóa.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó bước chọn lọc (S3) chủng vi khuẩn *Lactobacillus* bao gồm chọn lọc (S3) chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có hiệu quả trong điều trị bệnh liên quan đến thiếu hụt serotonin ở đối tượng nếu serotonin được phát hiện trong môi trường nuôi cấy hoặc mẫu của nó và nếu vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng bám vào chất nhầy cao hơn khả năng bám vào chất nhầy của *Lactobacillus reuteri* DSM 27131.

4. Chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33509, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

5. Chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33632, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

6. Chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33633, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

7. Chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33634, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

8. Chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 33635, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

9. Chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33291, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

10. Chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33292, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

11. Chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33293, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

12. Chủng *Lactobacillus mucosae* DSM 33661, tốt hơn là ở dạng được đông khô.

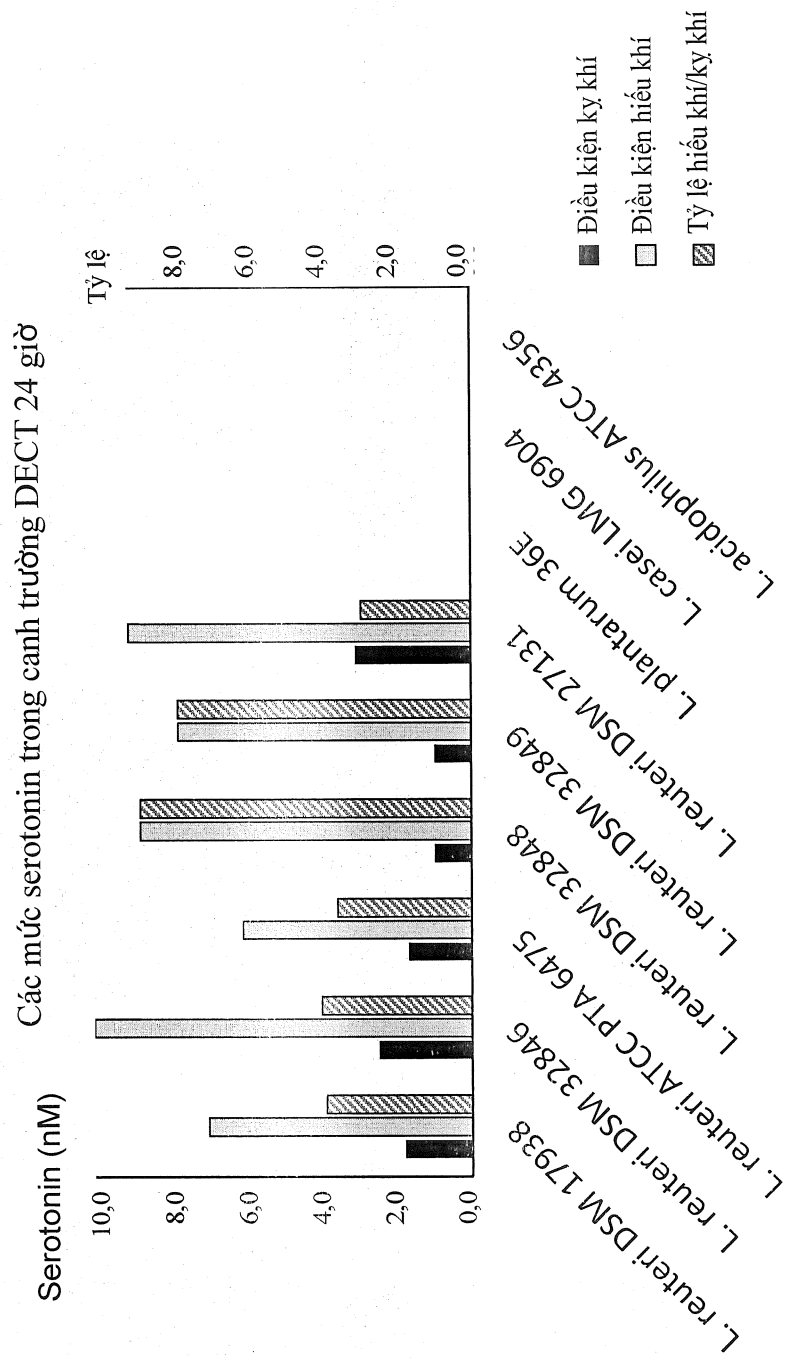


Fig.1A

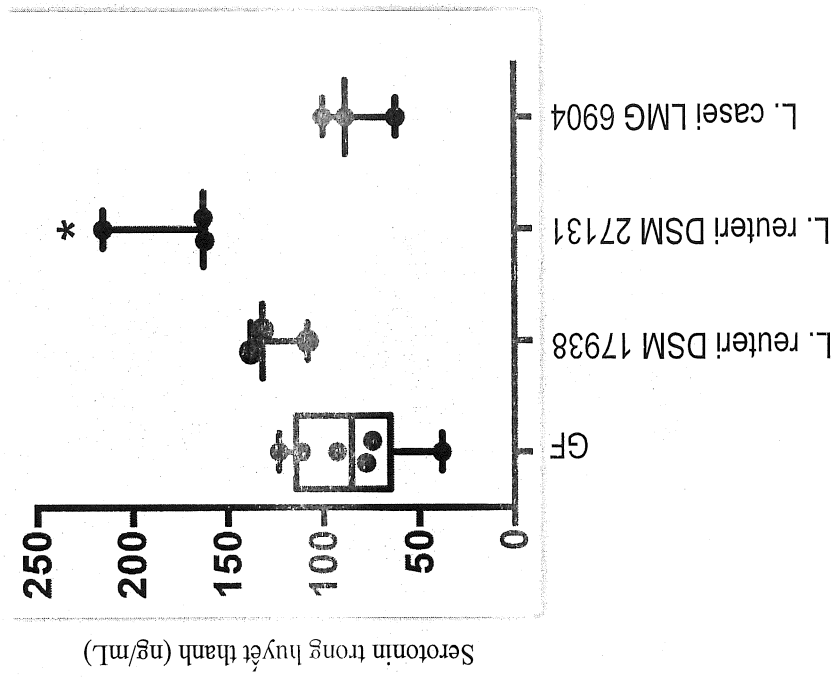
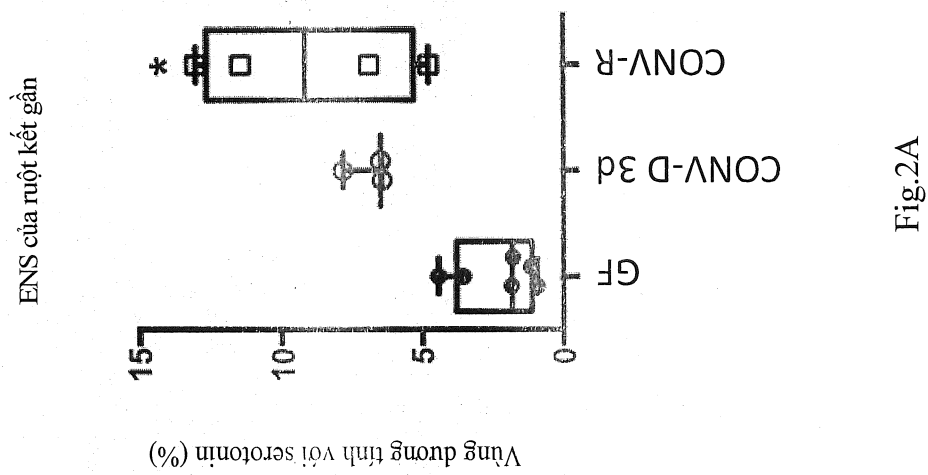
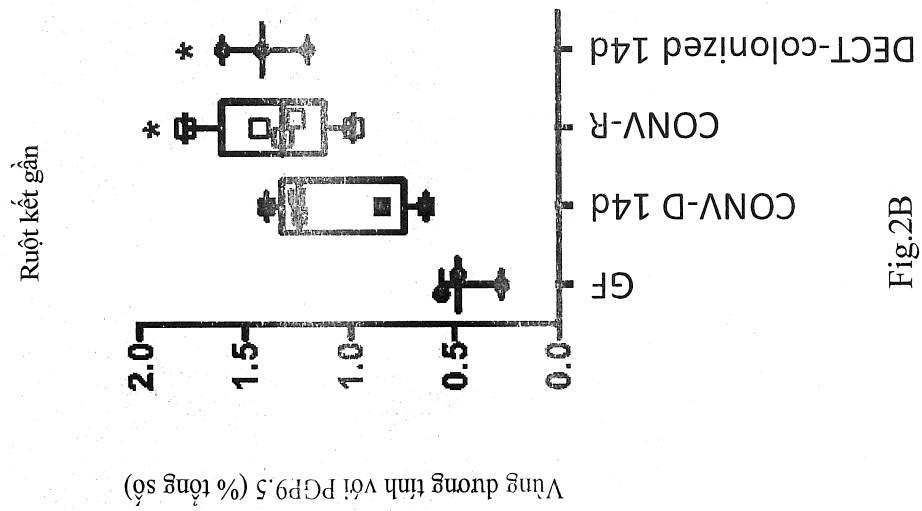
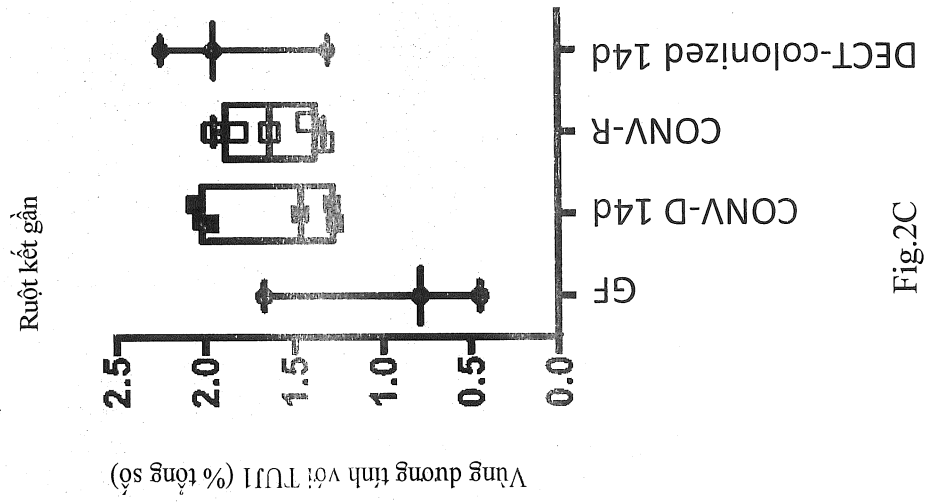


Fig.1B



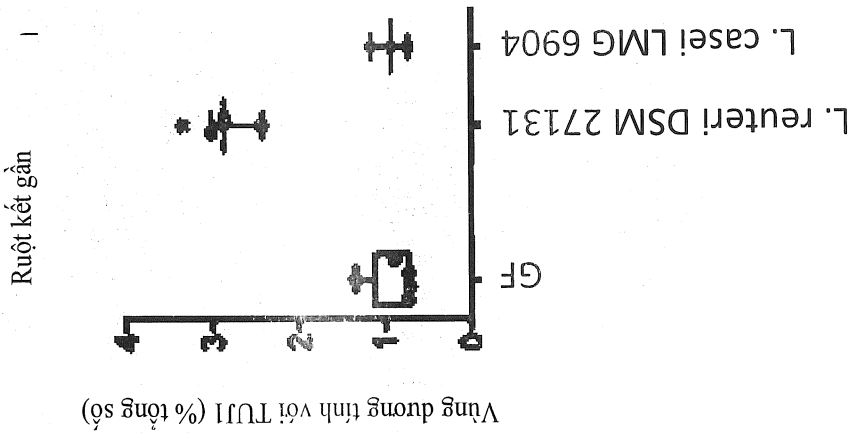


Fig.2F

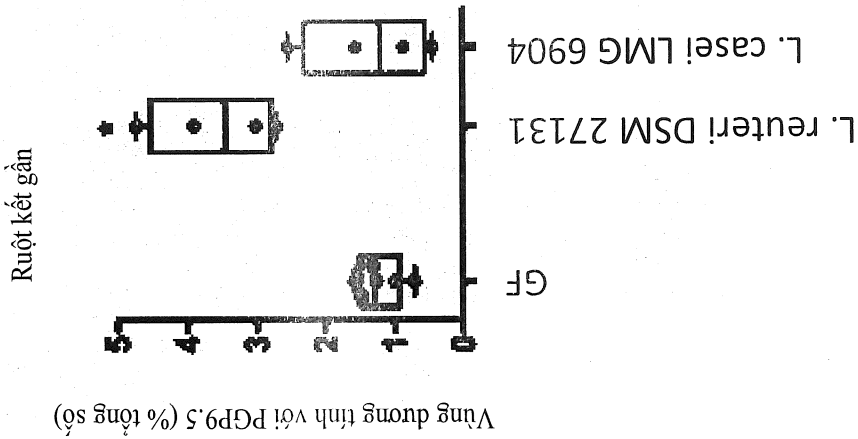


Fig.2E

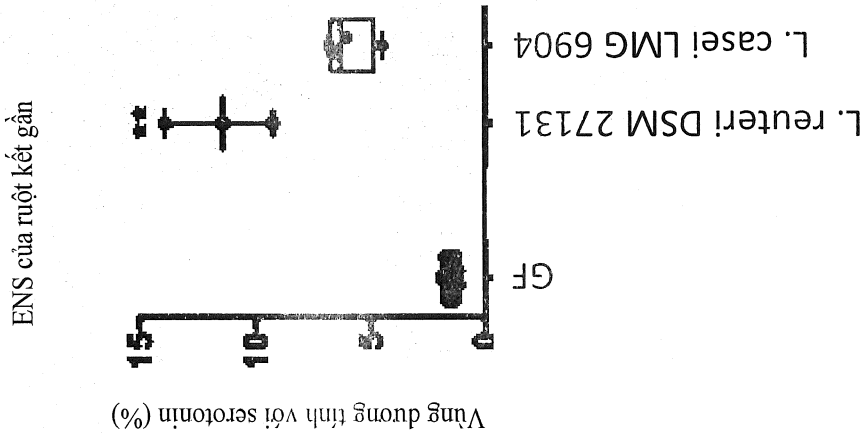


Fig.2D

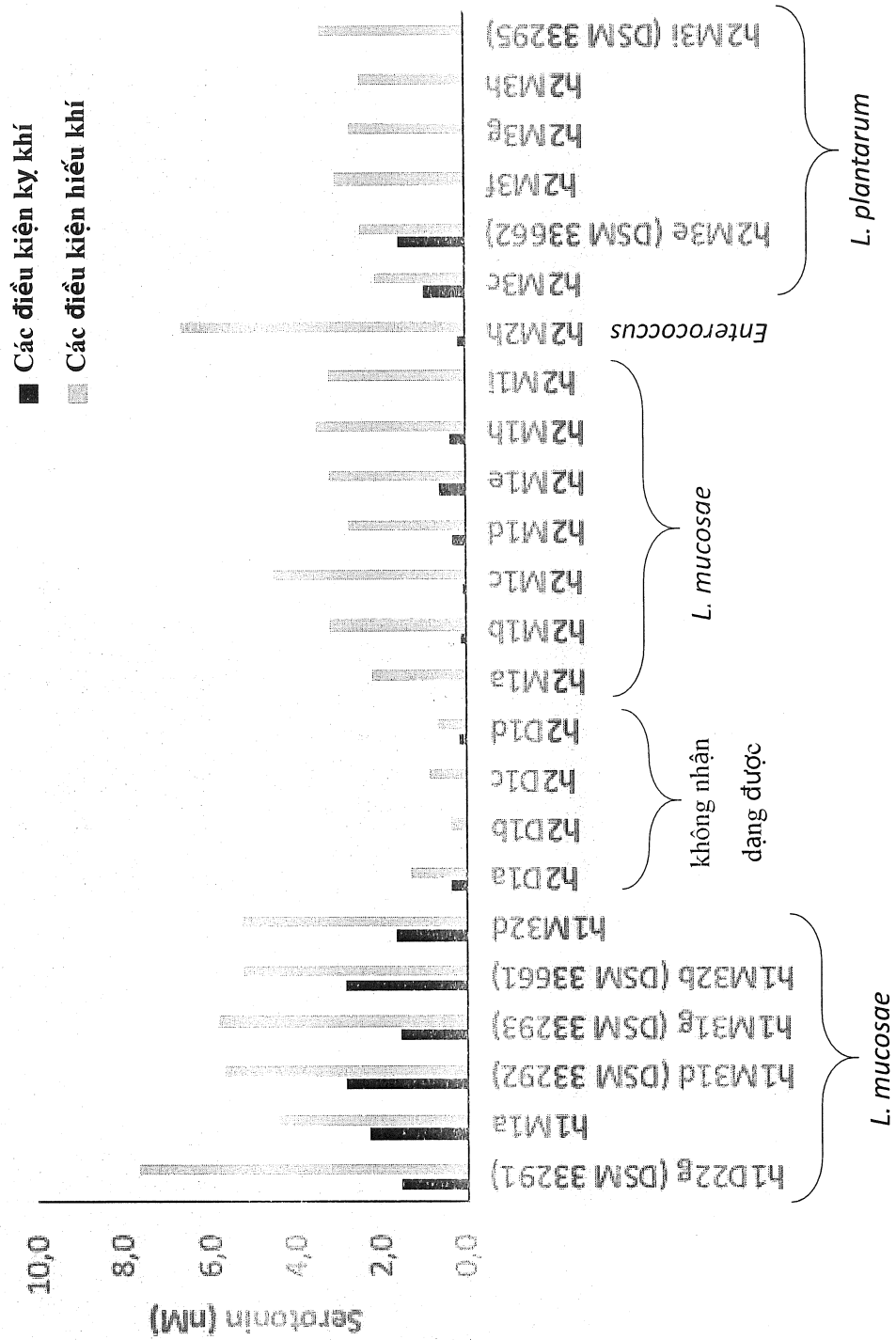


Fig.3

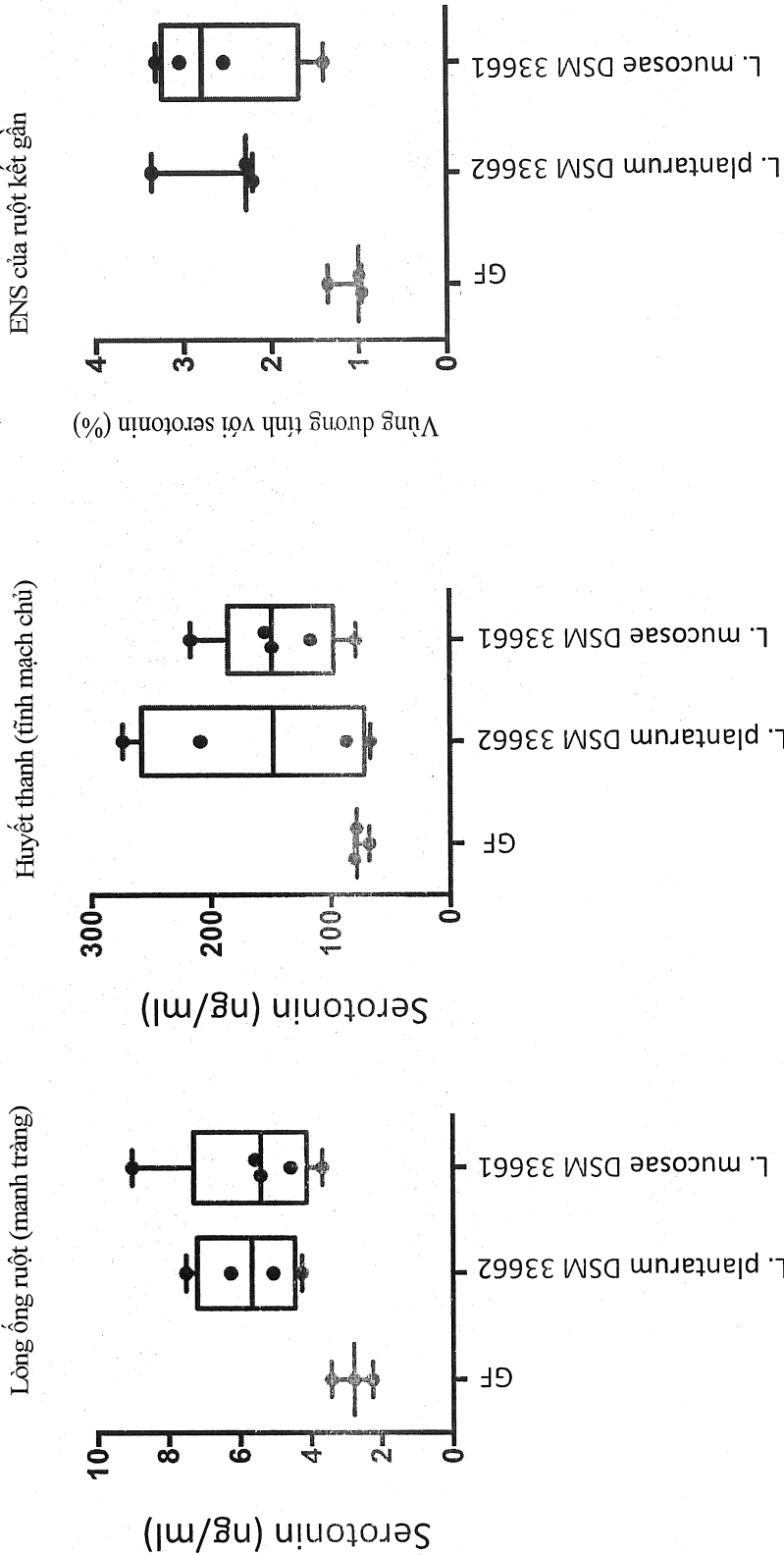


Fig.4A

Fig.4B

Fig.4C

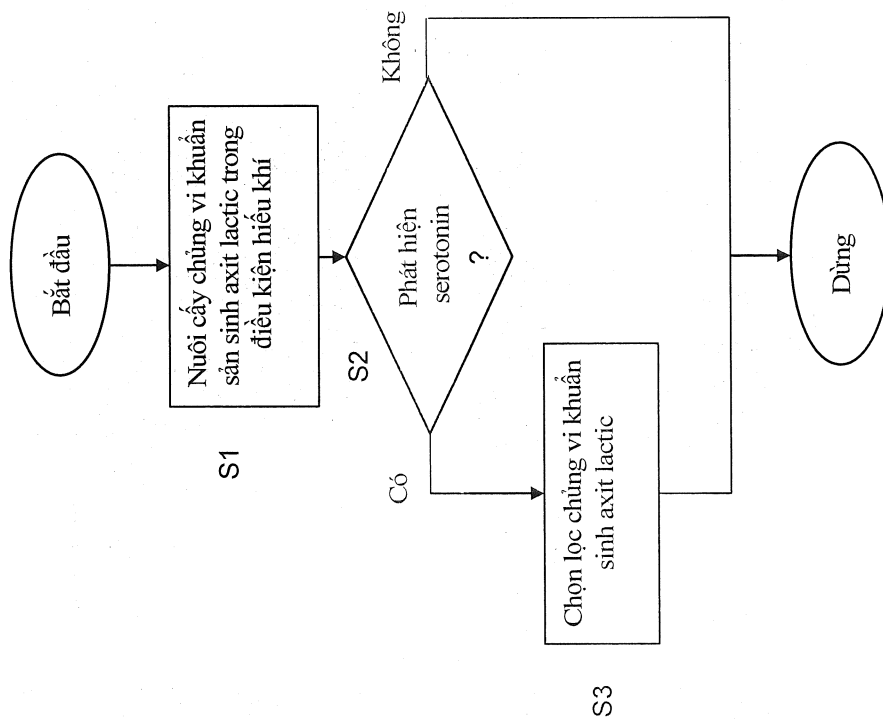


Fig.5

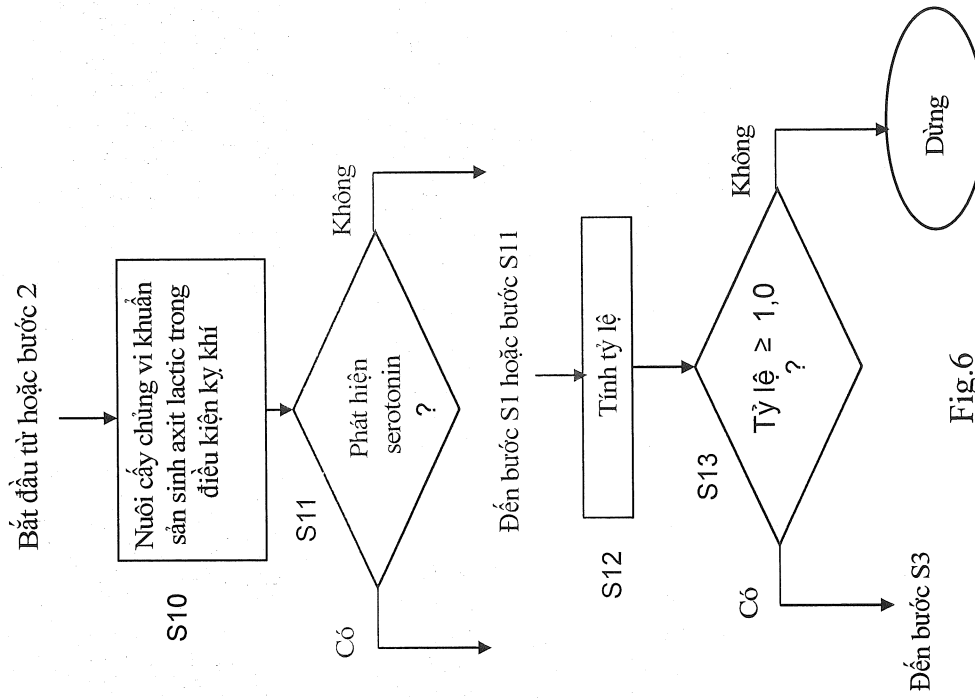


Fig.6

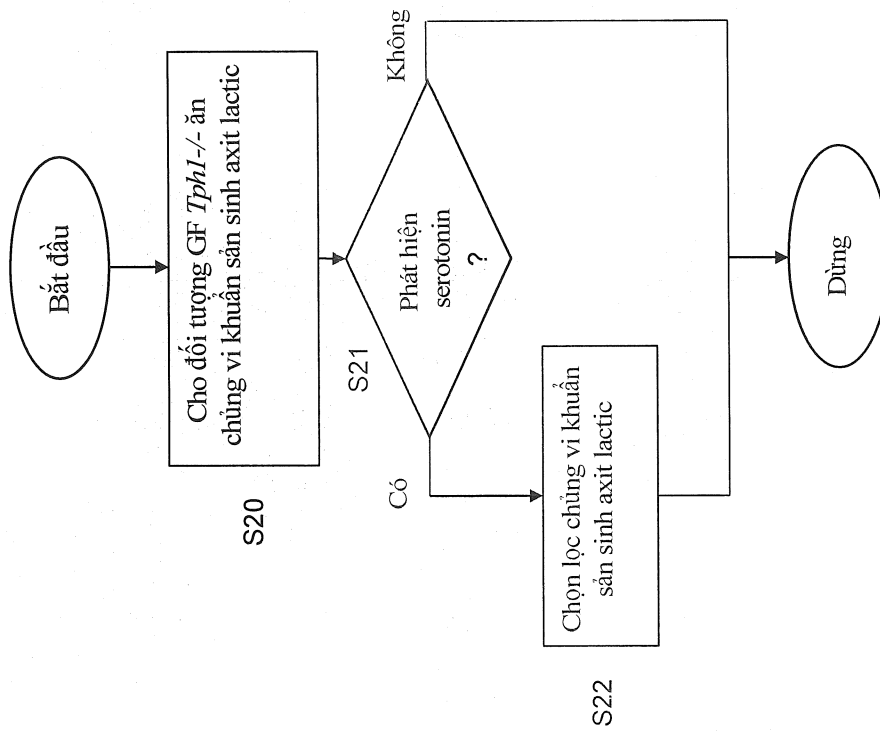


Fig.8

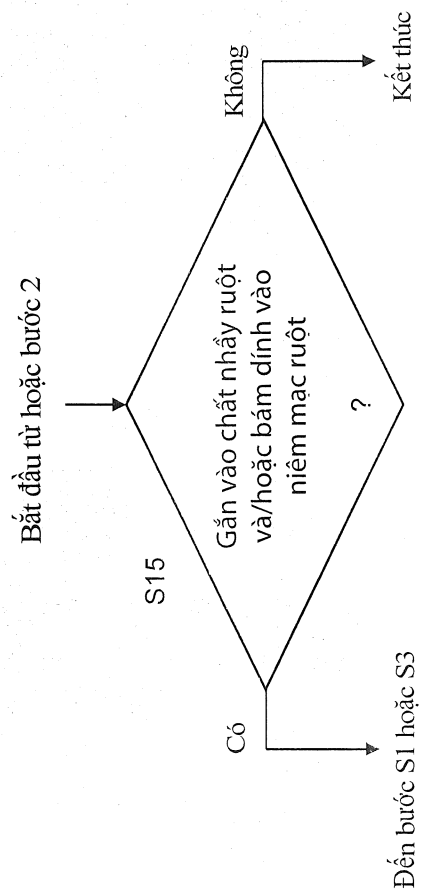


Fig.7

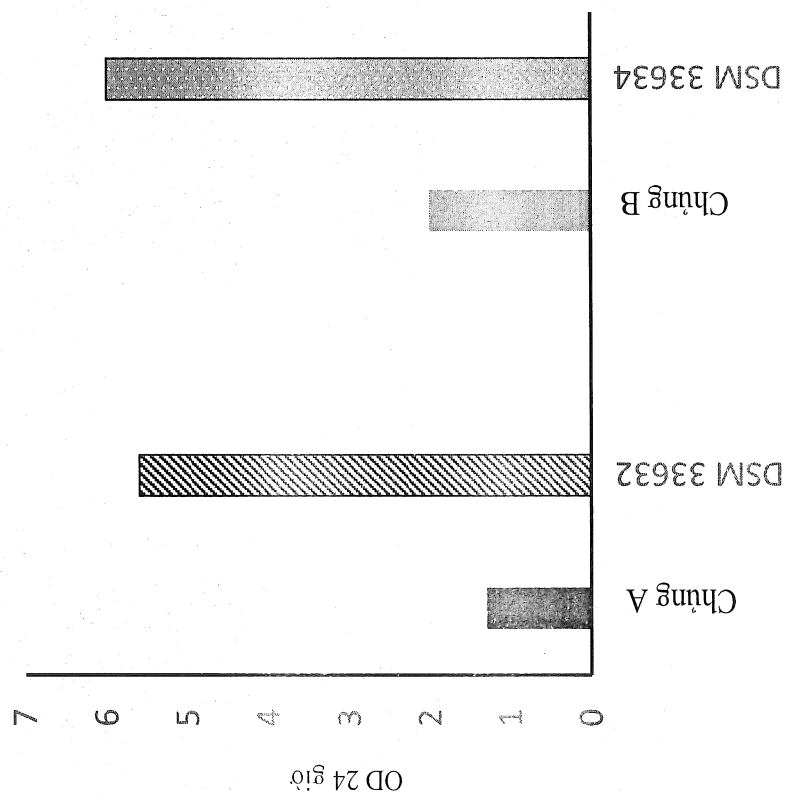
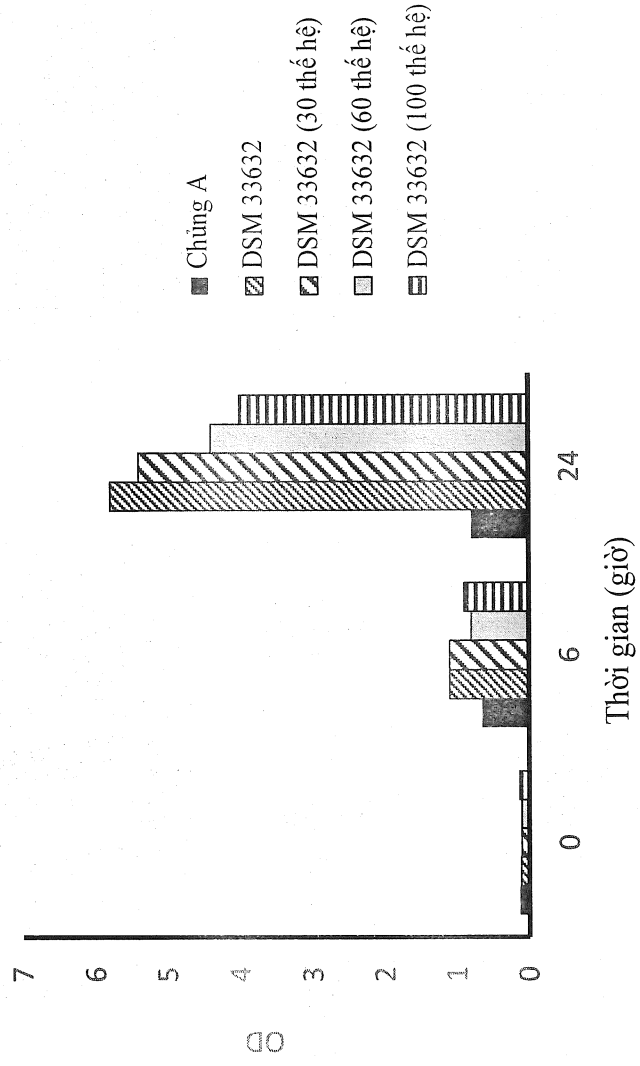


Fig.9B



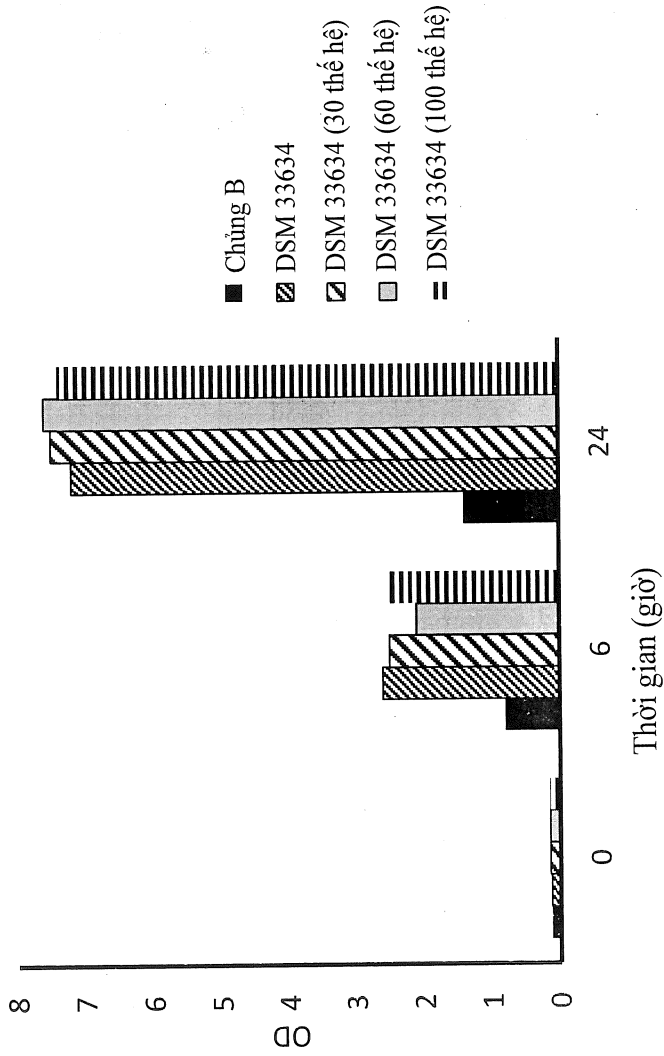


Fig.9C

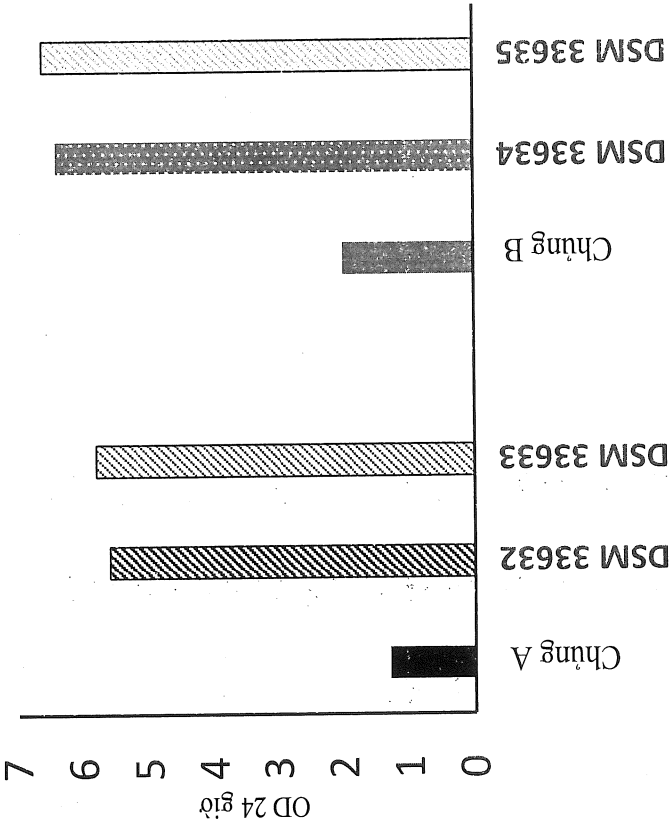


Fig.9D

