



(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)



1-0042515

(51)^{2020.01} A61K 35/745; A61P 1/00; C12N 1/00; (13) B
A61K 35/747

(21) 1-2021-06917

(22) 17/04/2020

(86) PCT/SE2020/050397 17/04/2020

(87) WO2020/214083 22/10/2020

(30) 1950483-6 17/04/2019 SE; 1951222-7 25/10/2019 SE

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/04/2022 409

(73) BIOGAIA AB (SE)

Kungsboplan 3A, 112 27 Stockholm, Sweden

(72) ROOS, Stefan (SE); KUNZE, Wolfgang (CA); BIENENSTOCK, John (CA).

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

(54) VI TÚI TRỊ LIỆU CỦA VI KHUẨN PROBIOTIC, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT
VI TÚI TRỊ LIỆU NÀY, CHỦNG VI KHUẨN PROBIOTIC VÀ CHẾ PHẨM
PROBIOTIC

(21) 1-2021-06917

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vi túi trị liệu từ vi khuẩn probiotic bao gồm việc cho vi khuẩn này trải qua xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn. Vi túi trị liệu này có thể được sử dụng trong điều trị, chẳng hạn, chứng đau bụng, bệnh hoặc rối loạn ở đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương và/hoặc bệnh nha chu.

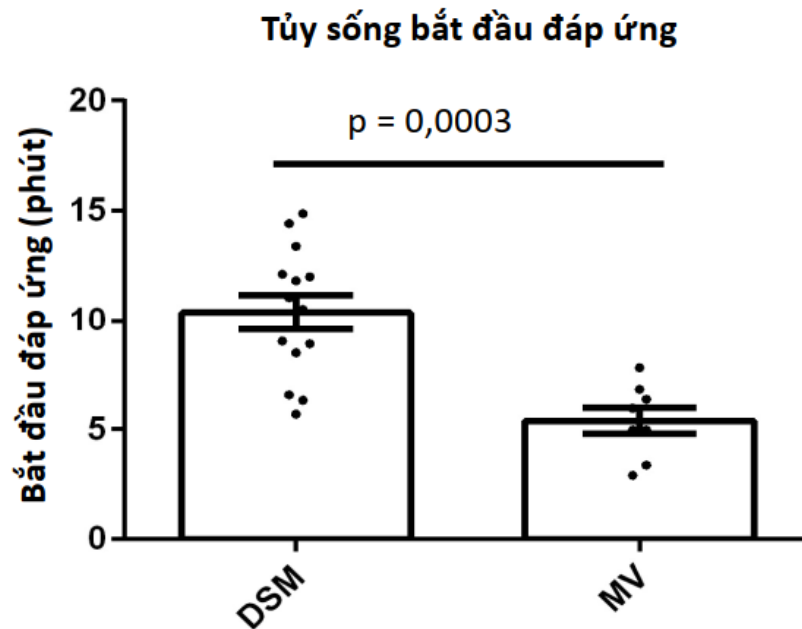


Fig. 10

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi túi trị liệu của vi khuẩn probiotic và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tổ chức Thực phẩm và Nông nghiệp của Mỹ định nghĩa probiotic là “các vi sinh vật sống khi sử dụng với lượng thích hợp đem lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ”. Các probiotic có ảnh hưởng đến chức năng miễn dịch của vật chủ, thông qua việc điều biến thành phần hệ vi khuẩn đường ruột, qua hoạt động trao đổi chất, hoặc thậm chí là qua tương tác trực tiếp với hệ thống miễn dịch nằm dưới niêm mạc ruột. Hơn 60% tế bào miễn dịch nằm ở niêm mạc ruột, và thông tin lấy mẫu về cấu trúc và thành phần hệ vi khuẩn đường ruột được chuyển thành các tác động tại chỗ và toàn thân thông qua các tế bào miễn dịch tuần hoàn. Sau các tương tác của probiotic, các cơ chế miễn dịch có thể được kích hoạt như được phản ánh bằng sự giải phóng các chất trung gian miễn dịch, chẳng hạn như xytokin, sản sinh kháng thể và hoạt hóa tế bào lympho cũng như các tế bào miễn dịch khác. Các tế bào, xytokin và/hoặc các hợp chất được hoạt hóa này được giải phóng bởi các probiotic sẽ thực hiện các chức năng điều hòa miễn dịch tại các vị trí khác nhau trong cơ thể thông qua hệ tuần hoàn máu. Các probiotic cũng có thể ngăn chặn hoặc ức chế sự tăng sinh của mầm bệnh và ngăn chặn sự sản sinh các yếu tố độc lực của mầm bệnh.

Một số chủng vi khuẩn khác nhau hiện đang được sử dụng làm probiotic, bao gồm vi khuẩn sản sinh axit lactic, chẳng hạn như các chủng *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* được chọn lọc. Hiệu quả của vi khuẩn probiotic là đặc hiệu chủng và mỗi chủng có thể đóng góp vào sức khỏe của vật chủ thông qua các cơ chế khác nhau.

Có nhiều loại chất bổ sung probiotic nhưng tác dụng có lợi cho sức khỏe khác nhau giữa các chủng vi khuẩn và vẫn còn ít hiểu biết về cách kiểm soát và điều chỉnh tác dụng sinh học hoặc lợi khuẩn cụ thể. Mỗi chủng vi khuẩn có những cơ chế riêng biệt, nhờ đó tạo ra các tác động cụ thể để cải thiện sức khỏe và giảm các triệu chứng chẳng hạn, rối loạn tiêu hóa, bao gồm tiêu chảy và táo bón, bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), hội chứng ruột kích thích (irritable bowel syndrome - IBS) và đau bụng ở trẻ sơ sinh.

Đau bụng ở trẻ sơ sinh là một tình trạng có thể cực kỳ căng thẳng cho các gia đình bị ảnh hưởng và làm giảm chất lượng cuộc sống một cách đáng kể. Ngoài ra, đau bụng ở trẻ sơ sinh có thể có hậu quả lâu dài cho trẻ sau này trong cuộc sống. Chứng vi khuẩn probiotic được nghiên cứu kỹ là *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 đã được chứng minh là làm giảm đáng kể thời gian quấy khóc ở trẻ sơ sinh bị đau bụng. Tuy nhiên, thời gian để bắt đầu tác dụng này không phải ngay lập tức, và có thể mất từ một đến ba tuần trước khi trẻ sơ sinh nhận được lợi ích từ việc điều trị. Do đó, rất cần những biện pháp can thiệp tác động nhanh hơn, cũng như những biện pháp thậm chí hiệu quả hơn để chẳng hạn, làm giảm thời kỳ khó chịu và quấy khóc cho trẻ em bị đau bụng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chung của sáng chế ở đây là đề xuất vi túi trị liệu từ vi khuẩn probiotic.

Mục đích này và các mục đích khác được đáp ứng bằng các phương án được bộc lộ ở đây.

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 này đề xuất phương pháp sản xuất vi túi trị liệu. Phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic trong môi trường nuôi cấy. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này. Phương pháp này còn bao gồm việc cho vi khuẩn này trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh các vi túi trị liệu bởi vi khuẩn. Xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này. Chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic.

Các khía cạnh khác của các phương án đề xuất chế phẩm probiotic gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và vi túi trị liệu được tạo ra bởi chủng vi khuẩn probiotic này hoặc bởi chủng vi khuẩn probiotic khác để sử dụng trong điều trị đau bụng và/hoặc để sử dụng trong điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hoặc rối loạn tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương, bệnh nha chu, và tổ

hợp các rối loạn hoặc bệnh này. Chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này.

Các khía cạnh khác của các phương án đề xuất chế phẩm probiotic để sử dụng trong điều trị đau bụng và/hoặc để sử dụng trong điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hoặc rối loạn tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương, bệnh nha chu, và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này. Chế phẩm probiotic này bao gồm thành phần tác động nhanh ở dạng vi túi trị liệu từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này. Chế phẩm probiotic này còn bao gồm thành phần tác động chậm ở dạng vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác. Chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này. Thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm cùng nhau tạo ra hiệu quả điều trị kéo dài khi được dùng cho đối tượng.

Các khía cạnh khác nữa của các phương án đề xuất vi túi trị liệu phân lập được từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic để sử dụng trong điều trị đau bụng và/hoặc để sử dụng trong điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hoặc rối loạn tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương, bệnh nha chu, và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này.

Khía cạnh khác của các phương án đề xuất chủng vi khuẩn, trong đó chủng vi khuẩn này là *Bifidobacterium longum* DSM 32947 hoặc *Bifidobacterium longum* DSM 32948.

Khía cạnh khác của các phương án đề xuất chế phẩm probiotic gồm vi khuẩn là chủng *Lactobacillus*, tốt hơn là chủng *L. reuteri*, và tốt hơn nữa là chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 32846 và hỗn hợp của các chủng này. Chế phẩm còn bao gồm vi khuẩn là chủng *Bifidobacterium longum* được chọn từ nhóm bao gồm *B. longum* DSM 32947, *B. longum* DSM 32948 và hỗn hợp của các chủng này, hoặc môi trường điều hòa từ chủng *B. longum*.

Vì túi trị liệu, được tạo ra bởi vi khuẩn probiotic, có thể tổng hợp lại các hiệu quả có lợi của vi khuẩn probiotic như được thể hiện ở đây. Hơn nữa, vì túi trị liệu thực tế là có hiệu quả hơn các vi khuẩn probiotic tạo ra chúng, như được chứng minh bởi sự khởi phát tác dụng có lợi đặc hiệu nhanh hơn, như được thể hiện trong các ví dụ.

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 thể hiện các số đo hoạt tính 5'-nucleotidaza trong môi trường điều hòa sau khi cho chủng *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 trải qua các xử lý gây cảm ứng khác nhau.

Fig.2 thể hiện hiệu quả của việc bổ sung *L. reuteri* DSM 17938 (DSM) trên Fig.2A, môi trường điều hòa (CM) trên Fig.2B, môi trường nuôi cấy (canh trường) trên Fig.2C, các vi túi thu được từ DSM (μV) trên Fig.2D hoặc môi trường điều hòa đã loại các vi túi (CM- μV) trên Fig.2E đối với tốc độ phức hợp co thắt lan truyền (propagated contractile complex - PCC) cho các đoạn hồng tràng của chuột, *in vitro*. Các bảng trên là các biểu đồ cột thể hiện giá trị trung bình và sai số chuẩn. Giá trị P thu được từ kiểm định *t* cặp đôi được cho ở trên các thanh ngang. Các bảng dưới là các biểu đồ giá trị riêng về sự khác nhau (Krebs điều trị - đối chứng) với khoảng tin cậy 95% cho mỗi đồ thị tương ứng ở hàng trên. Fig. 3 đến Fig.7 thể hiện các mối quan hệ tương tự giữa các bảng trên và bảng dưới.

Fig.3 thể hiện hiệu quả của việc bổ sung DSM (Fig.3A), CM (Fig.3B), canh trường (Fig.3C), μV (Fig.3D) hoặc CM- μV (Fig.3E) lên tần suất PCC đối với các đoạn hồng tràng của chuột, *in vitro*.

Fig.4 thể hiện hiệu quả của việc bổ sung DSM (Fig.4A), CM (Fig.4B), canh trường (Fig.4C), μV (Fig.4D) hoặc CM- μV (Fig.4E) lên biên độ đỉnh PCC đối với các đoạn hồng tràng của chuột, *in vitro*.

Fig.5 thể hiện hiệu quả của việc bổ sung DSM (Fig.5A), CM (Fig.5B), canh trường (Fig.5C), μV (Fig.5D) hoặc CM- μV (Fig.5E) lên vận tốc PCC đối với các đoạn kết tràng của chuột, *in vitro*.

Fig.6 thể hiện hiệu quả của việc bổ sung DSM (Fig.6A), CM (Fig.6B), canh trường (Fig.6C), μ V (Fig.6D) hoặc CM- μ V (Fig.5E) lên tần suất PCC đối với các đoạn kết tràng của chuột, *in vitro*.

Fig.7 thể hiện hiệu quả của việc bổ sung DSM (Fig.7A), CM (Fig.7B), canh trường (Fig.7C), μ V (Fig.7D) hoặc CM- μ V (Fig.7E) lên biên độ đỉnh PCC đối với các đoạn kết tràng của chuột, *in vitro*.

Fig.8 thể hiện tóm tắt các kết quả được trình bày trên các hình vẽ Fig. 2 đến Fig.7 lên tốc độ, tần suất và biên độ đỉnh ở hồng tràng và kết tràng.

Fig.9 thể hiện hiệu quả của các vi túi lên sự truyền tín hiệu TrpV1. Đồ thị này thể hiện đáp ứng gây ra bởi capsaixin thu được nhờ sử dụng các vi túi phân lập từ *L. reuteri* DSM 17938 (DSM-MV) và các vi túi phân lập từ chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 (MV-JB-1).

Fig.10 là đồ thị thể hiện thời điểm bắt đầu đáp ứng trong mô hình kích thích dây thần kinh mạc treo ruột nhờ sử dụng *L. reuteri* DSM 17938 (DSM) và các vi túi phân lập từ *L. reuteri* DSM 17938 (MV).

Fig.11 thể hiện rằng các vi túi thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 (MV) là chất điều biến miễn dịch và làm giảm đáp ứng IFN- γ và IL-17A. Đánh giá hiệu quả điều biến miễn dịch của các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 tinh sạch trong nuôi cấy PBMC. (Fig.11A) PBMC được nuôi cấy trong 48 giờ với sự có mặt của MV thu được từ *L. reuteri* (L.r) ở tỷ lệ (Mv:tế bào) là 500:1, 100:1, và 20:1 sau đó định lượng mức tiết ra của IL-6, IL-10, IL-17A và IFN- γ (n=8). (Fig.11B) PBMC được kích thích bởi *Staphylococcus aureus* (S.a)-CFS (2,5%) với sự có mặt của các L.r-MV ở tỷ lệ (Mv:tế bào) là 500:1, 100:1 và 20:1 sau đó định lượng các mức tiết ra của IFN- γ và IL-17A. Được thể hiện là các giá trị tương đối được chuẩn hóa chỉ *S. aureus*-CFS, (n=8). Các hộp bao gồm dữ liệu giữa bách phân vị thứ 25 và thứ 75 với trung vị là đường trung tâm và thanh sai số thể hiện tối thiểu đến tối đa. Các biểu đồ cột thể hiện trung vị với khoảng cách giữa các tứ phân vị.

Fig.12 thể hiện rằng *L. reuteri* DSM 17938 và các vi túi thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 đã bảo vệ tính toàn vẹn của biểu mô khỏi những tác động có hại của *Escherichia coli* sinh độc tố trong ruột (enterotoxigenic *Escherichia coli* - ETEC).

Fig.13 thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các mẫu MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 (nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 có bổ sung 4% dịch nổi từ *B. longum* ATCC BAA-999 hoặc *B. longum* DSM 32947 trong môi trường SIM (DSM 17938 + 4% dịch nổi DSM 32947 hoặc DSM 17938 + 4% dịch nổi ATCC BAA-999) so với *L. reuteri* DSM 17938 trong SIM (đối chứng) hoặc *L. reuteri* DSM 17938 có 4% dịch nổi từ *L. paracasei* LMG-P-17806 (DSM 17938 trong SIM hoặc DSM 17938 + 4% dịch nổi LMG-P-17806)

Fig.14 thể hiện các kết quả tương tự như được trình bày trên Fig.13 nhưng đã được chuẩn hóa liên quan đến hoạt tính 5'-nucleotidaza và mật độ quang của DSM 17938 trong SIM.

Fig.15 thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các mẫu đối chứng (DSM 17938 trong SIM) khi so sánh với các mẫu thu được sau khi xử lý sinh học gây cảm ứng bằng cách đồng nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 với 25% tế bào từ *B. longum* DSM 32947. Các kết quả đã được chuẩn hóa liên quan đến hoạt tính 5'-nucleotidaza và mật độ quang của DSM 17938 trong SIM.

Fig.16 thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các mẫu MV sau khi nuôi cấy *L. reuteri* DSM 32846 với 4% dịch nổi từ *B. longum* DSM 32947 trong môi trường SIM (DSM 32846 + 4% dịch nổi DSM 32947) khi so với đối chứng *L. reuteri* DSM 32846 trong SIM (DSM 32846 trong SIM). Các kết quả đã được chuẩn hóa liên quan đến hoạt tính 5'-nucleotidaza và mật độ quang của DSM 32846 trong SIM.

Fig.17 thể hiện rằng các vi túi thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 là có hiệu quả hơn trong việc gây cảm ứng sự sản sinh IL-6 so với các vi túi phân lập từ *L. reuteri* DSM 17938.

Fig. 18 và Fig.19 thể hiện việc gây cảm ứng IL-6 bởi các MV phân lập từ *L. reuteri* DSM 32846 và *L. reuteri* DSM 17938 sau khi nuôi cấy với 4% dịch nổi từ các chủng *B. longum* khi so sánh với các mẫu đối chứng (DSM 32846 hoặc DSM 17938 tương ứng).

Fig.20 thể hiện sự sản sinh IL-6 được gây cảm ứng bởi các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 sau khi đồng nuôi cấy với 25% tế bào từ *B. longum* DSM32947 khi so với các mẫu đối chứng (DSM 17938).

Fig.21 thể hiện rằng các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 đã phần nào có thể bảo vệ lớp đơn biểu mô trước thử thách với sự giảm TEER gây ra bởi ETEC. Hình vẽ này

cũng thể hiện hiệu quả bảo vệ của các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 chống lại sự phá hủy do ETEC gây ra cho lớp đơn trong thử nghiệm dòng FITC-dextran.

Fig.22 thể hiện so sánh giữa hiệu quả bảo vệ của các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 trong thử nghiệm dòng FITC-dextran và hiệu quả nhận được bởi các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938. Xử lý trước các lớp đơn tế bào biểu mô bằng các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 làm giảm sự rò rỉ FITC-dextran một cách hiệu quả hơn, cụ thể là ở các nồng độ MV thấp hơn, so với các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế nói chung đề cập đến các vi túi trị liệu từ vi khuẩn probiotic và sử dụng chúng.

Các định nghĩa

Các vi túi (MV, μV), còn được gọi là, chẳng hạn, túi màng, túi màng ngoài, túi ngoại bào trong lĩnh vực kỹ thuật này, là dạng truyền tải thông tin đã được chứng minh được vi khuẩn và tế bào nhân thật sử dụng. Việc giải phóng các MV có hoạt tính sinh học từ bề mặt tế bào được bảo tồn trong suốt quá trình sống của vi sinh vật, ở vi khuẩn, cổ khuẩn, nấm và ký sinh trùng, và việc sản sinh MV đã được chứng minh cả *in vitro* và *in vivo*, liên quan đến ảnh hưởng của các bào quan bề mặt này trong sinh lý vi sinh vật và cơ chế bệnh sinh thông qua việc phân phối các phân tử truyền tín hiệu quan trọng, các enzym và độc tố của chúng. Các MV của vi khuẩn được sản sinh và giải phóng thường xuyên bởi cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, và các thử nghiệm về protein đã chỉ ra rằng các chất trong các MV này có thể khác với các chất của vi khuẩn mẹ. MV có thể bao gồm các phân tử lipid, phân tử ARN, phân tử ADN và/hoặc protein. Hơn nữa, các MV cũng có thể chứa các thành phần bề mặt của vi khuẩn mẹ.

Các MV được tạo ra bởi vi khuẩn probiotic như được bộc lộ ở đây được biểu thị là các MV trị liệu ở đây thể hiện rằng các MV này có tác dụng điều trị. Tác dụng điều trị này của các MV có thể giống hoặc ít nhất là tương tự với tác dụng lợi khuẩn của vi khuẩn probiotic tạo ra các MV nay khi được sử dụng cho đối tượng. Do đó, các MV sẽ phát huy tác dụng điều trị đối với đối tượng, tác dụng này sẽ ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa, bao gồm việc trì hoãn sự khởi phát, tình trạng sức khỏe, bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng như được mô tả thêm ở đây.

Môi trường nuôi cấy hoặc môi trường sinh trưởng là môi trường khởi đầu để vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trong đó.

Môi trường điều hòa là môi trường nuôi cấy hoặc sinh trưởng để vi khuẩn được nuôi cấy trong đó. Do đó, môi trường điều hòa như vậy bao gồm hợp chất hoặc tác nhân bất kỳ, bao gồm MV, do vi khuẩn giải phóng vào môi trường nuôi cấy. Vi khuẩn đã được loại ra khỏi môi trường nuôi cấy và do đó không phải là một phần của môi trường điều hòa. Có thể thu được môi trường điều hòa, ví dụ, bằng cách ly tâm, lắng gạn và/hoặc kết tủa tế bào vi khuẩn để thu được môi trường điều hòa dưới dạng dịch nổi.

Huyền phù tế bào là hỗn hợp của vi khuẩn được nuôi cấy và môi trường nuôi cấy bao gồm hợp chất hoặc tác nhân bất kỳ, chẳng hạn như MV, do vi khuẩn giải phóng vào môi trường nuôi cấy, tức là môi trường điều hòa. Huyền phù tế bào là kết quả cuối cùng của quá trình lên men.

Chủng vi khuẩn probiotic tốt hơn là chủng vi khuẩn probiotic sinh axit lactic, đôi khi còn được gọi là vi khuẩn axit lactic. Vi khuẩn sinh axit lactic là nhóm gồm các vi khuẩn Gram dương, hàm lượng %GC của bộ gen thấp, chịu axit, nói chung không sinh bào tử, không hô hấp, có hình que hoặc hình cầu, có chung các đặc tính trao đổi chất và sinh lý. Các vi khuẩn này sản sinh axit lactic dưới dạng sản phẩm chuyển hóa chính cuối cùng của quá trình lên men carbohydrat. Các chi bao gồm vi khuẩn sinh axit lactic gồm *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, và *Streptococcus*. *Bifidobacterium* không được bao gồm trong vi khuẩn axit lactic truyền thống do chúng không có mối liên quan về mặt di truyền, nhưng vi khuẩn này có các đặc tính chồng lấp với vi khuẩn axit lactic, và nó có quá trình chuyển hóa tạo ra axit lactic dưới dạng sản phẩm cuối chính của quá trình lên men, mặc dù nó tạo ra ít axit lactic hơn nhiều *Lactobacillus*. Bifidobacteria kỵ khí nghiêm ngặt và thường được tìm thấy rất nhiều trong ruột già.

Các MV được tạo ra bởi vi khuẩn probiotic là quan trọng do tạo thành phương tiện truyền tải thông tin giữa vi khuẩn probiotic và các tế bào vật chủ xung quanh, chẳng hạn tế bào niêm mạc trong cơ thể người, ví dụ tế bào niêm mạc ruột của hệ tiêu hóa, niêm mạc miệng hoặc niêm mạc âm đạo. Do đó, các MV có thể chuyển tiếp thông tin, chẳng hạn thông tin probiotic, từ tế bào vi khuẩn đến vật chủ. Do đó, có nhu cầu tăng cường sự sản sinh các MV trị liệu từ vi khuẩn probiotic mà có thể được sử dụng trong các ứng dụng

probiotic và điều trị. Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây thể hiện rằng các MV được tạo ra bởi vi khuẩn probiotic có thể tổng hợp lại các tác dụng probiotic hoặc điều trị của vi khuẩn probiotic như được minh họa bởi tác dụng của các MV phân lập được đối với tín hiệu đau và nhu động đường tiêu hóa. Các MV không chỉ tổng hợp lại các tác dụng của vi khuẩn probiotic đối với tín hiệu đau mà còn thực sự hiệu quả hơn như được chứng minh bởi khả năng tác động nhanh hơn vi khuẩn probiotic dẫn đến khởi phát sớm hơn tác dụng được quan sát. Phát hiện này là cực kỳ bất ngờ. Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây cũng cho thấy rằng các MV trị liệu phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic có tác dụng kích thích miễn dịch và có khả năng làm giảm các xytokin đặc hiệu liên quan đến các bệnh tự miễn và chúng cũng bảo vệ tính toàn vẹn của hàng rào biểu mô. Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây cũng cho thấy rằng việc sản sinh các MV có thể được gây cảm ứng bằng cách xử lý sinh học trong quá trình nuôi cấy, chẳng hạn bằng cách thêm dịch nổi từ một chủng vi khuẩn khác vào chủng vi khuẩn probiotic hoặc bằng cách đồng nuôi cấy vi khuẩn probiotic với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác.

Do đó, sáng chế mô tả các quy trình có thể được sử dụng để tạo ra các MV trị liệu và/hoặc để tăng sự sản sinh vốn có hoặc nội sinh các MV trị liệu.

Một khía cạnh của phương án đề xuất phương pháp sản sinh các MV trị liệu. Phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic trong môi trường nuôi cấy và cho vi khuẩn này trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này. Xử lý sinh học gây cảm ứng, theo khía cạnh này, được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này. Chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic.

Do đó, theo khía cạnh này, việc tạo ra các MV trị liệu bao gồm nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và đồng thời kích thích vi khuẩn sản sinh các MV trị liệu bằng cách cho vi khuẩn này trải qua xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh các MV trị liệu.

Cảm ứng sản sinh các MV trị liệu như được sử dụng ở đây bao gồm kích thích vi khuẩn sản sinh các MV trị liệu, bao gồm thúc đẩy, tăng cường hoặc làm tăng sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cảm ứng sản sinh các MV trị liệu bao gồm sự giải phóng hiệu quả hơn các MV trị liệu từ vi khuẩn, nhờ đó tạo ra số lượng lớn hơn của các MV trị liệu được giải phóng bởi vi khuẩn so với khi vi khuẩn không được cho trải qua xử lý gây cảm ứng. Theo cách khác hoặc ngoài ra, cảm ứng sản sinh các MV trị liệu bao gồm sự sản sinh các MV trị liệu có hiệu lực hơn hoặc có hiệu quả hơn bởi vi khuẩn. Trong trường hợp này, các MV trị liệu được tạo ra bởi vi khuẩn được cho trải qua xử lý gây cảm ứng có hiệu quả điều trị được tăng cường so với các MV được tạo ra bởi vi khuẩn không được kích thích, tức là, vi khuẩn không được cho trải qua xử lý gây cảm ứng. Do đó, xử lý gây cảm ứng theo các phương án có thể được sử dụng để, chẳng hạn, làm tăng sản sinh các MV trị liệu ở vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic mà đã có sự sản sinh vốn có hoặc nội sinh các MV trị liệu này. Trong trường hợp này, xử lý gây cảm ứng đẩy mạnh sự sản sinh MV vốn có hoặc nội sinh này của vi khuẩn, tạo ra nhiều MV trị liệu hơn khi được cho trải qua xử lý gây cảm ứng so với khi không được cho trải qua xử lý gây cảm ứng. Cảm ứng sản sinh các MV trị liệu cũng bao gồm việc gây cảm ứng sản sinh các MV trị liệu như vậy ở vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic mà nếu không thì không có sự sản sinh MV đáng kể bất kỳ khi không được cho trải qua xử lý gây cảm ứng. Do đó, cảm ứng sản sinh các MV trị liệu bằng cách xử lý gây cảm ứng bao gồm cả việc làm tăng sản sinh các MV trị liệu vốn có hoặc nội sinh ở vi khuẩn và sự sản sinh *de novo* các MV trị liệu ở vi khuẩn.

Xử lý gây cảm ứng là, như được mô tả thêm ở đây, quá trình xử lý vi khuẩn gây cảm ứng, bao gồm việc làm tăng, sự sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn. Do đó, bằng cách cho vi khuẩn trải qua ít nhất một quá trình xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy theo các phương án khác nhau, vi khuẩn này được cải biến hoặc được gây cảm ứng để sản sinh các MV trị liệu.

Việc nuôi cấy vi khuẩn có thể được thực hiện theo quy trình nuôi cấy đã biết trong thiết bị nuôi cấy phù hợp, hệ lên men hoặc bình phản ứng sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bình phản ứng sinh học thùng khuấy, bình phản ứng sinh học lực đẩy không khí, bình phản ứng sinh học sợi rỗng và bình phản ứng sinh học hệ thống nuôi cấy tế bào

quay (Rotary Cell Culture System - RCCS). Tốt hơn, các điều kiện nuôi cấy cụ thể được lựa chọn dựa vào chủng vi khuẩn probiotic cụ thể.

Theo một phương án, môi trường nuôi cấy bao gồm các MV trị liệu và vi khuẩn probiotic, tức là, huyền phù tế bào, được bảo quản, chẳng hạn bằng cách làm khô và/hoặc đóng băng. Các ví dụ điển hình về làm khô bao gồm sấy phun, sấy đông lạnh, sấy đông lạnh phun và sấy chân không.

Huyền phù tế bào tùy ý có thể được cô trước hoặc trong quá trình bảo quản để làm giảm thể tích tổng của huyền phù tế bào và cũng để cô tế bào vi khuẩn, các MV trị liệu và các hợp chất hoặc tác nhân khác bất kỳ trong đó.

Chẳng hạn, huyền phù tế bào có thể được cô đến thể tích tương ứng với khoảng từ 5 đến 95% thể tích ban đầu, chẳng hạn 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 hoặc 95% thể tích ban đầu.

Nhiều phương pháp và quy trình khác nhau có thể được sử dụng để cô huyền phù tế bào. Chẳng hạn, huyền phù tế bào có thể được cô bằng cách loại nước và tùy ý các chất khác, chẳng hạn các axit hữu cơ, đường và muối ra khỏi huyền phù tế bào. Thiết bị lọc mà chủ yếu cho nước đi qua màng lọc có thể được sử dụng. Quá trình này được gọi là sự thẩm thấu và có thể được chạy trong các mô hình hoạt động khác nhau chẳng hạn mô hình thẩm thấu ngược, mô hình thẩm thấu xuôi. Theo một phương án, việc cô có thể được thực hiện bằng cách kết tủa mẫu nhờ sử dụng hóa chất. Việc kết tủa bằng hóa chất có thể được sử dụng để cô huyền phù tế bào bằng cách bổ sung các dung môi gây biến tính hoặc muối gây biến tính. Các kiểu thiết lập sắc ký khác nhau cũng có thể được sử dụng để cô và tách các mẫu đầu vào theo, chẳng hạn, các đặc tính hóa học và kích cỡ của chúng. Chẳng hạn, sắc ký rây phân tử hoạt động trên nguyên tắc tách các mẫu theo kích cỡ, giữ các phân tử nhỏ hơn trong các lỗ nhỏ và loại trừ các phân tử và các hạt lớn hơn. Sắc ký ion hỗ trợ trong việc tách các phân tử tích điện nhất định. Ví dụ, sắc ký trao đổi anion có thể được sử dụng để khai thác điện tích âm thuần được tìm thấy trên màng vi khuẩn và MV và liên kết chúng với nền sắc ký tích điện dương. Sau đó, chúng có thể được rửa giải bằng cách tăng cường độ ion của pha động xung quanh. Một kỹ thuật cô khác là siêu lọc. Siêu lọc dựa trên các tương tác cơ học chứ không phải hóa học. Các thiết bị lọc có thể có giới hạn trọng lượng phân tử, có nghĩa là mọi thứ trên một trọng lượng phân tử nhất định được giữ lại, trong khi cho đi qua các phân tử và muối nhỏ hơn, v.v.. Thông thường các màng có kích thước lỗ

xác định cao được sử dụng. Các loại thiết bị và quy trình siêu lọc này cũng được sử dụng trong các thiết lập khác nhau, chẳng hạn như lọc dòng trực tiếp (Direct Flow Filtration - DFF), hoặc lọc dòng tiếp tuyến (Tangential Flow Filtration - TFF). Lọc dòng tiếp tuyến (TFF), còn được gọi là lọc dòng chéo, khác với các hệ thống lọc khác ở chỗ chất lỏng được đi qua song song với bộ lọc, thay vì được đẩy qua màng theo phương vuông góc. Phương pháp này được ưu tiên vì khả năng lọc liên tục và hiệu suất có thể lặp lại. Các hạt đi qua màng, chất thấm qua, được đưa sang một bên, trong khi phần còn lại, chất được giữ lại, được đưa trở lại nguồn cấp liệu.

Theo một phương án, vi khuẩn được cho trải qua xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để gây cảm ứng, bao gồm làm tăng cường, sự sản sinh các MV trị liệu và giải phóng các MV trị liệu này vào môi trường nuôi cấy. Điều này có nghĩa là các MV trị liệu được tạo ra bởi vi khuẩn là chủng lợi khuẩn sau khi trải qua xử lý gây cảm ứng được giải phóng từ vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra hoặc theo cách khác, ít nhất một trong số các MV trị liệu được tạo ra bởi vi khuẩn có thể được liên kết với và/hoặc được gắn vào màng tế bào và/hoặc thành tế bào của vi khuẩn.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm phân lập các MV trị liệu từ môi trường nuôi cấy, ví dụ, từ huyền phù tế bào hoặc từ môi trường điều hòa. Theo một phương án, việc phân lập các MV trị liệu bao gồm cho môi trường nuôi cấy, ví dụ, huyền phù tế bào, trải qua ít nhất một lần ly tâm ở lực ly tâm tương đối được chọn trong khoảng thứ nhất để thu được phần dịch nổi đã loại vi khuẩn, tức là, môi trường điều hòa, và cho môi trường điều hòa trải qua ít nhất một lần siêu ly tâm ở lực ly tâm tương đối được chọn trong khoảng thứ hai để thu được cặn vón chứa MV. Khoảng thứ hai lớn hơn khoảng thứ nhất.

Lần ly tâm thứ nhất hoặc ít nhất một lần ly tâm ở lực ly tâm tương đối được chọn trong khoảng thứ nhất được thực hiện để loại tế bào sống và các mảnh vụn lớn ra khỏi môi trường nuôi cấy do đó tạo ra phần cặn vón mà được loại bỏ và phần dịch nổi bao gồm các MV trị liệu, được gọi là môi trường điều hòa ở trên. Bước thứ nhất trong quá trình phân lập có thể bao gồm một bước ly tâm duy nhất nhưng tốt hơn là bao gồm ít nhất hai bước ly tâm để loại bỏ vi khuẩn và các mảnh vụn lớn một cách hiệu quả hơn. Trong trường hợp có ít nhất hai bước ly tâm, tất cả các bước có thể được tiến hành ở cùng một lực ly tâm tương đối. Tuy nhiên, nhìn chung sẽ hiệu quả hơn nếu tăng lực ly tâm tương đối cho mỗi bước ly tâm tiếp theo. Khoảng thứ nhất tốt hơn là từ $100 \times g$ đến $50\,000 \times g$, chẳng hạn từ $200 \times g$

đến $25\,000 \times g$, và tốt hơn là từ $500 \times g$ đến $15\,000 \times g$. Chẳng hạn, bước ly tâm thứ nhất có thể ở $4\,000 \times g$ với bước ly tâm thứ hai ở $10\,000 \times g$. Theo cách khác, một bước ly tâm duy nhất ở $600 \times g$ có thể được sử dụng. Phần dịch nổi cũng có thể, hoặc theo cách khác, được cho chạy qua màng lọc micrômet ($0,20\mu\text{m}$ đến $0,50\mu\text{m}$, ví dụ, $0,45\mu\text{m}$) để loại bỏ bất kỳ mảnh vụn và/ hoặc vi khuẩn nào còn sót lại từ các quá trình ly tâm.

Sau đó, môi trường điều hòa bao gồm các MV trị liệu được cho trải qua ít nhất một lần siêu ly tâm ở lực ly tâm tương đối được chọn trong khoảng thứ hai để thu được cặn vón chứa MV. Bước thứ hai có thể bao gồm một hoặc nhiều bước siêu ly tâm. Trong trường hợp có nhiều bước siêu ly tâm, tất cả các bước có thể được tiến hành ở cùng một lực ly tâm tương đối hoặc lực ly tâm tương đối có thể được tăng lên như đã trình bày ở trên. Khoảng thứ hai tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn $75\,000 \times g$, chẳng hạn bằng hoặc lớn hơn $85\,000 \times g$, tốt hơn là bằng hoặc lớn hơn $100\,000 \times g$. Chẳng hạn, có thể sử dụng lực ly tâm tương đối là $118\,000 \times g$.

Theo một phương án, bước phân lập còn bao gồm nạp môi trường điều hòa lên gradien sacaroza hoặc đệm sacaroza và ly tâm với lực ly tâm tương đối được chọn trong khoảng thứ hai.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, môi trường điều hòa có thể được lọc trước khi siêu ly tâm. Trong trường hợp này, màng lọc có kích cỡ lỗ trung bình, chẳng hạn, từ $0,20\mu\text{m}$ đến $0,50\mu\text{m}$ có thể được sử dụng.

Các MV trị liệu phân lập được có thể được bảo quản, chẳng hạn bằng cách sấy khô, chẳng hạn bằng sấy phun, sấy đông lạnh, sấy đông lạnh phun hoặc sấy chân không, và/hoặc đông khô. Theo một phương án, các MV trị liệu là ổn định sau khi bảo quản trong ít nhất 1 tháng, ít nhất 3 tháng, ít nhất 5 tháng hoặc ít nhất 7 tháng.

Xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy chủng vi khuẩn probiotic với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy chủng vi khuẩn probiotic với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này. Chủng vi khuẩn khác tốt hơn là chủng vi khuẩn probiotic. Chẳng hạn, vi khuẩn khác có thể là chủng *Bifidobacterium*, tốt hơn là chủng *Bifidobacterium longum*, và tốt hơn nữa là *B. longum* DSM 32947 và/hoặc DSM 32948 (được BioGaia AB nộp lưu theo Hiệp định Budapest tại Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 1/11/2018). Các chủng *Bifidobacterium* được lấy ví dụ trên đây là đặc biệt hữu dụng liên quan đến vi khuẩn là chủng *Lactobacillus* làm chủng vi khuẩn probiotic, và cụ thể là với vi khuẩn là chủng *L. reuteri*, chẳng hạn *L. reuteri* DSM 17938 (được BioGaia AB nộp lưu theo Hiệp định Budapest tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 30/01/2006) và/hoặc *L. reuteri* DSM 32846 (được BioGaia AB nộp lưu theo Hiệp định Budapest tại DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức) vào ngày 04/07/2018).

Theo một phương án cụ thể, vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic có thể được đồng nuôi cấy với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác. Theo cách khác hoặc ngoài ra, môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác cũng có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy chứa vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho vi khuẩn trải qua xử lý phi sinh học gây cảm ứng trong nuôi cấy để cảm ứng, bao gồm gia tăng, sự sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn. Do đó, theo phương án này, vi khuẩn được cho tiếp xúc với cả xử lý sinh học gây cảm ứng và xử lý phi sinh học gây cảm ứng.

Xử lý phi sinh học liên quan đến xử lý bằng các thành phần hóa học và vật lý không sống mà ảnh hưởng đến các cơ thể sống. Xử lý sinh học liên quan đến xử lý bằng vật liệu sinh học, vật liệu này là cơ thể sống hoặc có nguồn gốc từ cơ thể sống.

Theo một phương án cụ thể, xử lý phi sinh học là xử lý bằng yếu tố gây stress phi sinh học, tức là, xử lý phi sinh học gây đáp ứng stress ở vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic khi được cho trải qua xử lý phi sinh học trong quá trình nuôi cấy. Yếu tố gây stress phi sinh học, theo một phương án, được chọn từ nhóm bao gồm stress oxy hóa (Xử lý bằng oxy), stress nhiệt độ, stress pH, stress tia cực tím (ultraviolet- (UV) và sự kết hợp của các stress này.

Xử lý bằng oxy có nghĩa là vi khuẩn được cho tiếp xúc với nồng độ oxy tăng. Theo một phương án, nồng độ oxy tăng là nồng độ không gây độc của oxy. Theo một phương án cụ thể, việc cho vi khuẩn trải qua xử lý bằng oxy bao gồm cho vi khuẩn kỵ khí chịu oxy

tương đối, vi khuẩn vi hiếu khí, vi khuẩn hiếu khí và/hoặc vi khuẩn kỵ khí tùy nghi tiếp xúc các nồng độ oxy tăng, tức là, các nồng độ tăng không gây độc của oxy, trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn kỵ khí chịu oxy tương đối, vi khuẩn vi hiếu khí, vi khuẩn hiếu khí và/hoặc vi khuẩn kỵ khí tùy nghi.

Xử lý bằng oxy như được sử dụng ở đây không bao gồm việc thêm các loại oxy phản ứng bất kỳ (reactive oxygen species - ROS), chẳng hạn các peroxit, bao gồm hydro peroxit, superoxit, hoặc các gốc hydroxyl.

Nồng độ oxy tăng chỉ nồng độ của oxy trong môi trường nuôi cấy cao hơn nồng độ oxy (bình thường) được lựa chọn là tối ưu, hoặc ít nhất phù hợp để nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic, tuy nhiên không gây độc cho vi khuẩn này. Theo một phương án, nồng độ không gây độc của oxy không gây ra sự chết tế bào vi khuẩn đáng kể, có nghĩa là vi khuẩn được cho tiếp xúc vẫn sống được ít nhất đến 70%, tốt hơn ít nhất đến 75%, tốt hơn nữa ít nhất đến 80%, chẳng hạn ít nhất đến 85% hoặc 90%, hoặc thậm chí là cao hơn so với khi cho vi khuẩn tiếp xúc với các nồng độ oxy bình thường. Việc tăng nồng độ oxy này có thể đạt được khi thêm (sục khí) oxy hoặc không khí vào môi trường nuôi cấy theo một hoặc nhiều đợt hoặc xung, hoặc trong một khoảng thời gian dài. Theo cách khác hoặc ngoài ra, việc tăng nồng độ oxy có thể đạt được bằng cách khuấy trộn hoặc khuấy môi trường nuôi cấy chứa vi khuẩn, bao gồm làm tăng lượng hoặc mức độ khuấy trộn hoặc khuấy môi trường nuôi cấy. Nồng độ oxy, ví dụ, nồng độ không gây độc, có thể thay đổi giữa các chủng vi khuẩn khác nhau, nhưng có thể thường được đặt nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10%. Theo một phương án, nồng độ oxy được đặt nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2%. Theo một phương án khác, nồng độ oxy được đặt nằm trong khoảng từ 2 đến 5%. Theo một phương án khác nữa, nồng độ oxy được đặt nằm trong khoảng từ 5 đến 10%.

Một khía cạnh cụ thể của các phương án bao gồm phương pháp sản sinh các MV trị liệu. Phương pháp này bao gồm nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic trong môi trường nuôi cấy và cho vi khuẩn trải qua xử lý bằng oxy hóa trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn.

Do đó, theo khía cạnh này của các phương án, sự sản sinh MV được cảm ứng, bao gồm được làm tăng, ở vi khuẩn bằng cách cho chúng trải qua xử lý bằng oxy (stress oxy hóa) nhưng không nhất thiết kết hợp với việc cho vi khuẩn trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng bất kỳ.

Theo một phương án, vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn kỵ khí chịu oxy tương đối, vi khuẩn vi hiếu khí, vi khuẩn hiếu khí và/hoặc vi khuẩn kỵ khí tùy nghi, tốt hơn là từ nhóm bao gồm vi khuẩn hiếu khí và vi khuẩn kỵ khí tùy nghi.

Theo một phương án cụ thể, vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này. Các chủng *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* ưu tiên có thể được lựa chọn trong số các ví dụ minh họa được mô tả dưới đây về các chủng vi khuẩn được ưu tiên.

Stress nhiệt độ có thể được gây ra bằng cách nâng nhiệt độ nuôi cấy cao hơn nhiệt độ bình thường để nuôi cấy vi khuẩn trong bình phản ứng sinh học, tức là, còn được gọi là stress nhiệt độ cao. Chẳng hạn, nếu nhiệt độ nuôi cấy bình thường là 37°C, nhiệt độ này có thể được tăng lên đến ít nhất là 42°C, ít nhất là 43°C, hoặc ít nhất là 44°C, và tốt hơn nữa là ít nhất 45°C, chẳng hạn ít nhất là 46°C, ít nhất là 47°C, ít nhất là 48°C, ít nhất là 49°C hoặc ít nhất là 50°C. Thay vì cho vi khuẩn tiếp xúc với stress nhiệt độ cao, vi khuẩn có thể được cho tiếp xúc với stress nhiệt độ thấp, tức là, bằng cách hạ nhiệt độ nuôi cấy xuống thấp hơn nhiệt độ nuôi cấy bình thường. Chẳng hạn, nhiệt độ nuôi cấy có thể được hạ xuống đến 10°C, chẳng hạn 8°C hoặc thấp hơn, 6°C hoặc thấp hơn, hoặc 4°C hoặc thấp hơn.

Stress pH có thể được gây ra bằng cách hạ độ pH của môi trường nuôi cấy, trong đó vi khuẩn được nuôi cấy, từ độ pH bình thường hoặc chuẩn xuống độ pH axit hoặc độ pH axit mạnh hơn. Theo cách khác, vi khuẩn có thể được tạm thời lấy ra khỏi môi trường nuôi cấy, và sau đó được cho tiếp xúc với stress pH, sau đó bổ sung vi khuẩn đã tiếp xúc với stress pH vào môi trường nuôi cấy hoặc vào môi trường nuôi cấy mới. Chẳng hạn, độ pH có thể được hạ từ khoảng pH bình thường là 6,5 đến 7 xuống độ pH bằng 2 hoặc thấp hơn.

Stress UV có thể được tạo ra bằng cách cho vi khuẩn trải qua xử lý UV, ví dụ, bằng cách chiếu thẳng ánh sáng UV vào trong môi trường nuôi cấy chứa vi khuẩn.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm cho vi khuẩn tiếp xúc với tác nhân gây stress trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng, bao gồm gia tăng, sản sinh các MV trị liệu bởi vi khuẩn. Do đó, theo phương án này, vi khuẩn được cho tiếp xúc với cả tác nhân gây stress và xử lý sinh học gây cảm ứng và/hoặc xử lý phi sinh học gây cảm ứng.

Chủng vi khuẩn probiotic tốt hơn là chủng vi khuẩn probiotic sinh axit lactic và cụ thể là được lựa chọn từ *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*. *Lactobacillus* bao gồm một số loài gồm *L. acetotolerans*, *L. acidifarinae*, *L. acidipiscis*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophobicus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. antri*, *L. apodemi*, *L. aviaries*, *L. bifementans*, *L. brevis*, *L.*

buchneri, *L. camelliae*, *L. casei*, *L. catenaformis*, *L. ceti*, *L. coleohominis*, *L. collinoides*, *L. composti*, *L. concavus*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. crustorum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. dextrinicus*, *L. diolivorans*, *L. equi*, *L. equigenerosi*, *L. farraginis*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fornicalis*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. fuchuensis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. gastricus*, *L. ghanensis*, *L. graminis*, *L. hammesii*, *L. hamster*, *L. harbinensis*, *L. hayakitensis*, *L. helveticus*, *L. hilgardii*, *L. homohiochii*, *L. iners*, *L. ingluviei*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranoferiens*, *L. kefir*, *L. kimchi*, *L. kitasatonis*, *L. kunkei*, *L. leichmannii*, *L. lindneri*, *L. malefermentans*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mindensis*, *L. mucosae*, *L. murinus*, *L. nagelii*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. oligofermentans*, *L. oris*, *L. panis*, *L. pantheris*, *L. parabrevis*, *L. parabuchneri*, *L. paracasei*, *L. paracollinoides*, *L. parafarraginis*, *L. parakefiri*, *L. paralimentarius*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. protectus*, *L. psittaci*, *L. rennini*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. rimae*, *L. rogosa*, *L. rossiae*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. satsumensis*, *L. secaliphilus*, *L. sharpeae*, *L. siliginis*, *L. spicheri*, *L. suebicus*, *L. thailandensis*, *L. ultunensis*, *L. vaccinostercus*, *L. vaginalis*, *L. versmoldensis*, *L. vini*, *L. vitulinus*, *L. zaeae*, và *L. zymae*. Các ví dụ ưu tiên về chủng vi khuẩn probiotic như vậy bao gồm *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus gasseri* và *Lactobacillus plantarum*. Các ví dụ được ưu tiên hiện nay về chủng vi khuẩn probiotic như vậy bao gồm chủng *Lactobacillus reuteri*, chẳng hạn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 và *Lactobacillus reuteri* DSM 32846. Các loài *Bifidobacterium* được ưu tiên là *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. thermophilum*, *B. bifidum* và *B. lactis*. Loài *Bifidobacterium* được ưu tiên hơn là *B. longum*. Các ví dụ được ưu tiên hiện nay về *Bifidobacterium* là *B. longum* DSM 32947 và *B. longum* DSM 32948.

L. reuteri là loài kỵ khí chịu oxy (theo cách khác là chịu khí hoặc chịu oxy tương đối), tức là, chỉ có thể tạo ra ATP bằng quá trình lên men.

Các khía cạnh khác của các phương án đề xuất *Bifidobacterium longum* DSM 32947, *Bifidobacterium longum* DSM 32948, và chế phẩm, chẳng hạn các dược phẩm, chế phẩm dinh dưỡng, chất bổ sung thực phẩm và chế phẩm probiotic, chứa *B. longum* DSM 32947 và/hoặc *B. longum* DSM 32948. Theo một phương án cụ thể, vi khuẩn thuộc chủng

vi khuẩn này, tức là, *B. longum* DSM 32947 và/hoặc *B. longum* DSM 32948, ở dạng được làm khô hoặc khô lạnh.

Các khía cạnh liên quan bao gồm chế phẩm probiotic chứa vi khuẩn là chủng *Bifidobacterium longum* được chọn từ nhóm bao gồm *B. longum* DSM 32947, *B. longum* DSM 32948 và hỗn hợp của các chủng này và vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic khác, tốt hơn là chủng *Lactobacillus*, và tốt hơn nữa chủng *L. reuteri*, và cụ thể là chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 32846, và hỗn hợp của các chủng này.

Các khía cạnh khác bao gồm các chế phẩm probiotic chứa chủng vi khuẩn vi khuẩn probiotic, tốt hơn là chủng *Lactobacillus*, và tốt hơn nữa chủng *L. reuteri*, và cụ thể là chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 32846 và hỗn hợp của các chủng này, và môi trường điều hòa từ chủng *Bifidobacterium longum* được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum* DSM 32947, *Bifidobacterium longum* DSM 32948 và hỗn hợp của các chủng này.

Vi khuẩn có trong chế phẩm probiotic theo khía cạnh trên tốt hơn là có trong chế phẩm probiotic dưới dạng vi khuẩn khô, chẳng hạn vi khuẩn khô lạnh hoặc đông khô, phun khô hoặc phun đông khô hoặc làm khô bằng chân không.

Vi khuẩn là *B. longum* DSM 32947 hoặc *B. longum* DSM 32948 có mặt trong chế phẩm probiotic được mô tả trên đây có thể được cung cấp ở dạng khô, ví dụ, đông khô (khô lạnh), phun khô, phun đông khô hoặc làm khô bằng chân không. Nếu các chế phẩm này còn chứa vi khuẩn thuộc chủng vi khuẩn probiotic khác, chẳng hạn *L. reuteri* DSM 17938 và/hoặc *L. reuteri* DSM 32846, thì các vi khuẩn này cũng có thể được cung cấp ở dạng khô, chẳng hạn đông khô (khô lạnh), phun khô, phun đông khô hoặc làm khô bằng chân không, trong chế phẩm.

B. longum DSM 32947 và DSM 32948 đã được cải biến (được làm thích nghi hoặc tiến hóa) từ các chủng gốc thông qua quá trình chọn lọc nhiều bước để cải thiện sinh trưởng và làm giảm vấn đề về sinh trưởng không đồng nhất. Do đó, *B. longum* DSM 32947 và DSM 32948 thể hiện sự sinh trưởng được cải thiện. Các chủng này không có trong tự nhiên bởi vì chúng bị buộc phải tiến hóa, tức là chúng là các chủng vi khuẩn không có nguồn gốc tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên.

Quá trình chọn lọc nhiều bước *Bifidobacterium* từ các mẫu lâm sàng bao gồm việc phân lập *Bifidobacterium* phân lập được từ các mẫu lâm sàng trên đĩa thạch MRS. Để cải thiện sinh trưởng và làm giảm vấn đề với sự sinh trưởng không đồng nhất, vi khuẩn được đưa vào quy trình sau:

1. Cấy vạch trên đĩa thạch MRS và sau ba ngày nuôi cấy kỵ khí ở 37°C chọn một khuẩn lạc có sinh trưởng tốt;
2. Nuôi cấy khuẩn lạc chọn được trong canh trường MRS và ủ ở 37°C trong các điều kiện kỵ khí;
3. Lấy mẫu và lặp lại bước 1 và 2 cho đến khi quan sát được các đặc tính mong muốn; và
4. Tạo huyền phù vi khuẩn trong glyxerol 15% và bảo quản ở -70°C.

Quá trình xử lý được mô tả trên đây đã cải thiện cả sinh trưởng và vấn đề hình thái khuẩn lạc không đồng nhất.

Bằng cách cho vi khuẩn trải qua ít nhất một quá trình xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy theo sáng chế, vi khuẩn được cải biến và/hoặc gây cảm ứng để sản sinh, bao gồm cả tăng sản sinh, các MV trị liệu và chúng ưu tiên giải phóng các MV vào môi trường nuôi cấy. Xử lý gây cảm ứng này liên quan đến các thay đổi về điều kiện nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sự sản sinh MV bởi vi khuẩn so với vi khuẩn không được cho trải qua xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy.

Để đánh giá và/hoặc định lượng sự tăng sản sinh MV hoặc thay đổi hiệu suất đổi của các MV được gây cảm ứng hoặc được sản sinh nhờ các xử lý gây cảm ứng khác nhau, các phương pháp khác nhau có thể được áp dụng. Một lựa chọn để định lượng MV, ví dụ, bằng thiết bị Nanosight hoặc bằng cách sử dụng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy hoặc sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang để nhuộm màng tế bào và nhờ đó xác định số lượng MV. Chẳng hạn, huỳnh quang có thể được đo (sau khi rửa) bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa (và so sánh với đường cong chuẩn). Còn một cách đơn giản hơn là thực hiện so sánh giữa kích thước viên vón của phần kết tủa hoặc viên vón sau khi ly tâm hoặc cân trọng lượng của các chất kết tủa. Kích thước viên vón càng lớn hoặc trọng lượng viên vón càng cao thì càng có nhiều MV. Các cách khác để đánh giá hiệu suất của các MV là

đánh giá hoạt tính của các MV trong các mô hình *in vitro* phức tạp hơn, chẳng hạn như được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Một quá trình trao đổi chất quan trọng trong cơ thể người là sự chuyển hóa purin, trong đó các purin được chuyển hóa và bị phá vỡ bởi các enzym cụ thể. Một ví dụ về enzym như vậy là ecto-5'-nucleotidaza (CD73), là 5'-nucleotidaza neo ở màng tế bào, được xem là một enzym chủ chốt trong quá trình tạo ra adenosin. Một số vi khuẩn probiotic có gen mã hóa 5'-nucleotidaza và sản sinh enzym 5'-nucleotidaza hoạt tính và do đó có thể tạo ra adenosin. Hoạt tính 5'-nucleotidaza, và nhờ đó quá trình tạo ra adenosin, có thể diễn ra ngoại bào, tức là, tức là bên ngoài hoặc trên bề mặt của vi khuẩn, do đó nó có thể có mặt ví dụ trong dịch nổi hoặc chất lỏng ngoại bào khác được sản sinh bởi vi khuẩn. Do đó, enzym 5'-nucleotidaza hoạt tính có thể có mặt trên bề mặt tế bào, ví dụ, ở dạng 5'-nucleotidaza neo ở thành tế bào, ngoại bào so với tế bào vi khuẩn, ví dụ, trong dịch nổi và/hoặc dưới dạng 5'-nucleotidaza liên hợp với màng MV. Kết quả là, trong nhóm vi khuẩn này, sự tạo ra adenosin và/hoặc hoạt tính của 5'-nucleotidaza (EC 3.1.3.5) có thể được sử dụng làm dấu chuẩn để xác định hiệu suất tạo ra MV.

Các mô hình khả thi khác, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các mô hình hiện nay được sử dụng để đánh giá hiệu quả lợi khuẩn của chủng vi khuẩn. Chẳng hạn, mô hình bao gồm các mô hình *in vitro* tiền lâm sàng, trong đó có thể đo nhu động ruột hoặc cảm nhận/tín hiệu đau, cho thấy, ví dụ, những khó chịu điển hình liên quan đến đau bụng ở trẻ sơ sinh và các rối loạn chức năng tiêu hóa khác. Một số mô hình được sử dụng ở đây để đánh giá các tác động tiềm ẩn đối với đau bụng ở trẻ sơ sinh, ví dụ, các mô hình được mô tả trong ví dụ 1, 3, 4, 9 và 10. Nó cũng bao gồm các mô hình kích thích miễn dịch dựa trên tế bào, trong đó các cytokine đã chọn có thể được đánh giá. Một cơ chế khác, thông qua đó vi khuẩn probiotic phát huy tác dụng của chúng, liên quan đến việc giảm tính thấm của niêm mạc, tức là, để bảo vệ tính toàn vẹn của hàng rào biểu mô. Do đó, hiệu quả của MV có thể được đo bằng mô hình *in vitro* thử thách ETEC (*Escherichia coli* sinh độc tố ruột) có tính thấm biểu mô. Ngoài ra, các mô hình động vật có liên quan có thể được sử dụng để điều tra tác động của các xử lý gây cảm ứng khác nhau và cũng có thể đánh giá thêm các tác động này trong một thử nghiệm lâm sàng trên người.

Các MV trị liệu có thể, tùy ý sau quá trình bảo quản, được sử dụng cho động vật có vú, chẳng hạn ở dạng các MV trị liệu được phân lập, như chế phẩm probiotic như được mô

tả thêm ở dưới đây, hoặc dưới dạng môi trường nuôi cấy, môi trường điều hòa hoặc huyền phù tế bào đã qua xử lý, chẳng hạn môi trường nuôi cấy khô, bao gồm môi trường nuôi cấy đông khô (khô lạnh), phun khô, phun đông khô hoặc sấy khô bằng chân không, môi trường điều hòa hoặc huyền phù tế bào, từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic.

Một phương án đề xuất chế phẩm probiotic gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và các MV trị liệu được tạo ra bởi chủng vi khuẩn probiotic này hoặc bởi chủng vi khuẩn probiotic khác. Chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn probiotic hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác đã được cho trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng theo các phương án. Do đó, theo một phương án, các MV trị liệu trong chế phẩm probiotic được tạo ra bởi phương pháp sản xuất các MV trị liệu theo các phương án. Do đó, theo một phương án, chế phẩm probiotic này bao gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và vi túi trị liệu được tạo ra bởi chủng vi khuẩn probiotic này hoặc bởi chủng vi khuẩn probiotic khác bằng cách cho vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn. Chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này. Xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này. Chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic khác.

Theo một phương án, các MV trị liệu được phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic, chẳng hạn được mô tả trong phần trên bằng cách cho vi khuẩn trải qua xử lý gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy và sau đó phân lập các MV trị liệu từ môi trường nuôi cấy. Các MV trị liệu phân lập được sau đó có thể được bổ sung vào vi khuẩn phân lập được là cùng một chủng vi khuẩn probiotic được sử dụng để sản sinh các MV trị liệu. Trong trường hợp này, chế phẩm probiotic bao gồm hỗn hợp của vi khuẩn phân lập là chủng vi

khuẩn probiotic và các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic. Theo một phương án khác, chế phẩm probiotic này bao gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic thứ nhất và các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic khác, thứ hai. Trong trường hợp sau, có thể kết hợp các đặc tính hoặc tính chất của các chủng vi khuẩn probiotic khác nhau bằng cách trộn vi khuẩn phân lập là chủng vi khuẩn probiotic với các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic khác. Cũng có thể có chế phẩm probiotic gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic thứ nhất và các MV trị liệu từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic thứ nhất và các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic khác, thứ hai. Theo một phương án khác, chế phẩm probiotic này bao gồm hỗn hợp của ít nhất một chủng vi khuẩn và các MV trị liệu từ bất kỳ trong số ít nhất một chủng vi khuẩn hoặc được sản sinh bởi chủng vi khuẩn khác.

Vi khuẩn có trong chế phẩm probiotic theo khía cạnh trên tốt hơn là có trong chế phẩm probiotic dưới dạng vi khuẩn khô, chẳng hạn vi khuẩn khô lạnh hoặc đông khô, phun khô hoặc phun đông khô hoặc làm khô bằng chân không.

Như được mô tả trước trong bản mô tả, chủng vi khuẩn probiotic tốt hơn là chủng vi khuẩn probiotic sinh axit lactic (chẳng hạn *Lactobacillus*), chẳng hạn chủng probiotic *Lactobacillus reuteri*, và tốt hơn nữa là *L. reuteri* DSM 17938 và/hoặc *L. reuteri* DSM 32846.

Dữ liệu thử nghiệm được trình bày ở đây thể hiện rằng các MV trị liệu, được tạo ra và phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic, không chỉ có thể tổng hợp lại các tác dụng có lợi trên nhu động đường tiêu hóa và tín hiệu đau của vi khuẩn sản sinh MV vi khuẩn probiotic. Quan trọng là, các MV trị liệu này thực tế có hiệu quả hơn chính các vi khuẩn probiotic, như được chứng minh nhờ sự khởi phát tác dụng có lợi nhanh hơn nhờ các MV trị liệu so với vi khuẩn. Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây cũng thể hiện rằng các MV trị liệu phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic có tác dụng kích thích miễn dịch. Các MV có thể làm giảm các xytokin đặc hiệu liên quan đến các bệnh tự miễn, và chúng cũng thể hiện bảo vệ tính toàn vẹn của hàng rào biểu mô. Dữ liệu thử nghiệm đã cho thấy rằng các MV trị liệu theo các phương án có thể được sử dụng để ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh hoặc rối loạn khác nhau mà trước đó đã được thể hiện là bị ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách sử dụng vi khuẩn probiotic. Theo cách tương tự, các MV trị liệu, khi được dùng cho động vật có vú, có thể được mong muốn tạo ra các tác dụng đặc hiệu và/hoặc chung

tương tự, và cũng có thể là các tác dụng được cải thiện, so với vi khuẩn probiotic khi được dùng cho đối tượng, chẳng hạn động vật có vú bất kỳ. Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây cũng cho thấy rằng việc sản sinh các MV có thể được gây cảm ứng bằng xử lý sinh học trong quá trình nuôi cấy, chẳng hạn bằng cách thêm dịch nổi từ một chủng vi khuẩn khác vào chủng vi khuẩn probiotic hoặc bằng cách thêm tế bào vi khuẩn từ chủng vi khuẩn khác vào chủng vi khuẩn probiotic trong quá trình nuôi cấy (còn gọi là đồng nuôi cấy). Xử lý sinh học gây cảm ứng như vậy tạo ra các MV có hiệu quả hoặc hiệu lực hơn trong các mô hình khác nhau so với các MV từ các chế phẩm vi khuẩn không được gây cảm ứng hoặc không được kích thích.

Sự khởi phát các tác dụng có lợi nhanh hơn như được thấy bởi các MV trị liệu có thể được sử dụng trong chế phẩm probiotic theo các phương án để đạt được tác dụng điều trị kéo dài khi được dùng cho động vật có vú. Do đó, các MV trị liệu trong chế phẩm probiotic gây ra hoặc tạo ra tác dụng sớm ở động vật có vú do sự khởi phát nhanh hơn của chúng, trong khi đó vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic chứa trong chế phẩm probiotic gây ra hoặc tạo ra tác dụng muộn hơn nhưng thường kéo dài. Hơn nữa, các MV trị liệu cũng có thể tạo ra tác dụng điều trị tăng cường so với tác dụng điều trị gây ra bởi vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic. Điều này có nghĩa là chế phẩm probiotic theo các phương án đạt được các tác dụng điều trị cải thiện đáng kể so với chỉ sử dụng vi khuẩn probiotic.

Nói cách khác, chế phẩm chứa cả tế bào vi khuẩn probiotic và các MV trị liệu tạo ra các lợi ích cao hơn chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn probiotic hoặc MV của chính chúng. Trong chế phẩm chứa cả tế bào vi khuẩn probiotic và các MV trị liệu, sự khởi phát các tác dụng có lợi nhanh hơn, như được quan sát với các MV trị liệu được kết hợp với các tác dụng kéo dài của tế bào vi khuẩn probiotic để cải thiện chế phẩm probiotic về mặt khởi phát nhanh và tác dụng điều trị kéo dài khi được dùng cho đối tượng, chẳng hạn động vật có vú.

Do đó, một khía cạnh của các phương án liên quan đến chế phẩm probiotic gồm thành phần tác động nhanh ở dạng các MV trị liệu từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này. chế phẩm probiotic này còn bao gồm thành phần tác động chậm, hoặc kéo dài ở dạng vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic sản sinh MV hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác. Chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ

nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này. Do đó, thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm cùng nhau tạo ra sự khởi phát sớm, được cải thiện và hiệu quả điều trị kéo dài khi được dùng cho đối tượng.

Theo một phương án, chủng vi khuẩn probiotic hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác đã được cho trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng theo các phương án. Do đó, theo một phương án, các MV trị liệu trong thành phần tác động nhanh của chế phẩm probiotic được sản xuất bằng phương pháp sản xuất các MV trị liệu theo các phương án. Do đó, theo một phương án chế phẩm probiotic này bao gồm thành phần tác động nhanh ở dạng vi túi trị liệu được tạo ra bởi vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic bằng cách cho vi khuẩn trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này. Xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này. Một chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và một chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic. Chế phẩm probiotic này còn bao gồm thành phần tác động chậm ở dạng vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác. Chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này. Chủng vi khuẩn probiotic khác là khác với chủng vi khuẩn khác. Thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm cùng nhau tạo ra hiệu quả điều trị kéo dài khi được dùng cho đối tượng.

Theo một phương án, thành phần tác động nhanh có sự khởi phát tác dụng điều trị sớm hơn ở đối tượng so với thành phần tác động chậm. Do đó, nhanh và chậm liên quan đến thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm xác định sự khởi phát tác dụng điều trị tương đối khi được gây ra bởi các thành phần này. Nói cách khác, thành phần tác động nhanh là thành phần có tác động nhanh hơn hoặc nhanh hơn so với thành phần tác động chậm, có thể được xem là thành phần có tác động chậm hơn hoặc chậm hơn khi so với thành phần tác động nhanh về mặt tạo ra tác dụng điều trị ở đối tượng.

Theo một phương án, thành phần tác động nhanh ở dạng các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic.

Phần bản luận được trình bày trên đây liên quan đến việc sử dụng cùng một chủng vi khuẩn probiotic hoặc các chủng vi khuẩn probiotic khác nhau đối với các MV trị liệu và vi khuẩn cũng áp dụng cho phương án này.

Các chế phẩm probiotic theo các phương án có thể được sử dụng làm thuốc và cụ thể được sử dụng trong việc điều trị rối loạn tiêu hóa.

Một khía cạnh của các phương án xác định chế phẩm probiotic gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và các MV trị liệu được tạo ra bởi chủng vi khuẩn probiotic hoặc bởi chủng vi khuẩn khác để sử dụng làm thuốc và cụ thể là để sử dụng trong điều trị đau bụng. Một khía cạnh của các phương án còn xác định chế phẩm probiotic gồm thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm được mô tả trên đây để sử dụng làm thuốc và cụ thể là để sử dụng trong điều trị đau bụng.

Theo một phương án, đau bụng là đau bụng ở trẻ sơ sinh (còn được gọi là đau bụng ở trẻ nhỏ).

Các khía cạnh khác của các phương án xác định chế phẩm probiotic chứa vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và các MV trị liệu được tạo ra bởi chủng vi khuẩn probiotic hoặc bởi chủng vi khuẩn khác hoặc chế phẩm probiotic chứa thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm để sử dụng trong điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hoặc rối loạn tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương, bệnh nha chu, và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này.

Các MV trị liệu có thể được sản sinh bởi vi khuẩn là cùng một chủng vi khuẩn probiotic như được bao gồm trong chế phẩm probiotic. Theo cách khác hoặc ngoài ra, các MV trị liệu có thể được sản sinh bởi vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic khác với vi khuẩn được bao gồm trong chế phẩm probiotic.

Theo một phương án, vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic trong chế phẩm probiotic đã được cho trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng theo các phương án.

Các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic có thể được sử dụng trong điều trị đau bụng, chẳng hạn đau bụng ở trẻ sơ sinh. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này.

Các phương án liên quan đến các MV trị liệu phân lập từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic có thể được sử dụng trong điều trị bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hoặc rối loạn tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương, bệnh nha chu, và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium* và hỗn hợp của các chủng này.

Các MV trị liệu tốt hơn là từ chủng *Lactobacillus reuteri* và thậm chí tốt hơn nữa là từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 và/hoặc *Lactobacillus reuteri* DSM 32846.

Các MV trị liệu phân lập được hoặc các MV trị liệu trong chế phẩm probiotic tốt hơn là được tạo ra bởi vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic được cho trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng như được bộc lộ ở đây. Một phương án đề xuất vi túi trị liệu phân lập được từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic được cho trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn. Chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này. Xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này. Chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và trong đó chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic.

Theo một phương án, chế phẩm probiotic và/hoặc các MV trị liệu có thể được sử dụng theo cách khác để điều trị rối loạn tiêu hóa. Tốt hơn, rối loạn tiêu hóa là rối loạn chức năng đường tiêu hóa được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn chức năng thực quản, chẳng hạn như ợ chua chức năng, đau ngực chức năng có nguồn gốc thực quản, khó nuốt và vướng họng chức năng; rối loạn chức năng dạ dày-tá tràng, chẳng hạn như khó tiêu chức năng, nuốt hơi, ợ hơi quá mức không xác định, buồn nôn vô căn mạn tính, nôn chức năng, hội chứng nôn có chu kỳ và hội chứng nhai lại; rối loạn chức năng ruột, chẳng hạn như hội chứng ruột kích thích (irritable bowel syndrome - IBS), táo bón chức năng, tiêu chảy chức năng và rối loạn chức năng ruột không xác định; hội chứng đau bụng chức năng, chẳng hạn như đau bụng chức năng (functional abdominal pain - FAP), rối loạn chức năng túi mật và cơ vòng Oddi, chẳng hạn như rối loạn chức năng túi mật, rối loạn chức năng cơ vòng mật Oddi và rối loạn chức năng cơ vòng tụy Oddi; rối loạn chức năng hậu môn trực tràng, chẳng

hạn như đại tiện không tự chủ chức năng, đau hậu môn trực tràng chức năng và rối loạn chức năng đại tiện; rối loạn chức năng tiêu hóa ở trẻ em, chẳng hạn như nôn trớ ở trẻ sơ sinh, hội chứng nhai lại ở trẻ sơ sinh, hội chứng nôn theo chu kỳ ở trẻ sơ sinh, tiêu chảy chức năng, chứng khó tiêu ở trẻ sơ sinh và táo bón chức năng.

Theo một phương án cụ thể, rối loạn tiêu hóa được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn nhu động đường tiêu hóa, chứng đau ở đường tiêu hóa, đau bụng, hội chứng ruột kích thích, và chứng táo bón.

Theo một phương án, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ là rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh, chẳng hạn rối loạn chức năng hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh. Theo một phương án cụ thể, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn nhu động đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh, chứng đau ở đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh, đau bụng ở trẻ sơ sinh, hội chứng ruột kích thích ở trẻ sơ sinh, không dung nạp thức ăn ở trẻ sơ sinh, chứng táo bón ở trẻ sơ sinh, chứng tiêu chảy ở trẻ sơ sinh, chứng nôn trớ ở trẻ sơ sinh, hội chứng nhai lại ở trẻ sơ sinh, chứng khó đại tiện ở trẻ sơ sinh, chứng táo bón chức năng ở trẻ sơ sinh và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này.

Theo phương án cụ thể khác, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh được chọn từ nhóm bao gồm đau bụng ở trẻ sơ sinh hoặc không dung nạp thức ăn ở trẻ sơ sinh và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này.

Theo phương án cụ thể khác, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh là rối loạn nhu động đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh, tốt hơn là chứng táo bón ở trẻ sơ sinh và/hoặc chứng tiêu chảy ở trẻ sơ sinh và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này.

Theo phương án cụ thể khác, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh là rối loạn nhu động đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và/hoặc đau bụng ở trẻ sơ sinh.

Theo một phương án, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh hoặc trẻ nhỏ là rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ em, chẳng hạn rối loạn chức năng hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ em.

Theo một phương án cụ thể, rối loạn hoặc bệnh đường tiêu hóa ở trẻ nhỏ được chọn từ nhóm bao gồm chứng nôn ở trẻ em, hội chứng nhai lại ở trẻ em, tiêu chảy chức năng ở

trẻ em, chứng khó đại tiện ở trẻ em, chứng táo bón chức năng ở trẻ em, và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này.

Theo phương án cụ thể khác, rối loạn tiêu hóa ở trẻ em được chọn từ nhóm bao gồm chứng nôn ở trẻ em, chứng khó đại tiện ở trẻ em, và sự kết hợp các rối loạn này.

Theo một phương án, rối loạn đau ở đường tiêu hóa được chọn từ nhóm bao gồm chứng đau bụng chức năng (FAP), đau quặn bụng, đau bụng tái phát thường xuyên (frequent recurrent abdominal pain - FRAP), và sự kết hợp các rối loạn này.

Theo một phương án, bệnh mất xương được chọn từ nhóm bao gồm chứng loãng xương, chứng thiếu xương, và sự kết hợp các bệnh này.

Theo một phương án, các chế phẩm probiotic để sử dụng trong điều trị chứng loãng xương hoặc chứng thiếu xương.

Theo một phương án, bệnh nha chu được chọn từ nhóm bao gồm viêm nha chu, viêm lợi và sự kết hợp các bệnh này.

Theo một phương án khác, các chế phẩm probiotic để sử dụng trong điều trị hoặc viêm nha chu.

Theo phương án cụ thể hơn, rối loạn nhu động đường tiêu hóa được chọn từ nhóm bao gồm chứng bụng, tắc nghẽn tái phát, đau quặn bụng, táo bón, bệnh trào ngược dạ dày thực quản, nôn tái phát, khó chữa, tiêu chảy, bệnh viêm ruột (IBD), đại tiện không tự chủ, đau bụng tái phát thường xuyên (FRAP), nôn trớ hoặc không dung nạp thức ăn

Các phương án cũng liên quan đến việc sử dụng chế phẩm probiotic hoặc các MV trị liệu phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic làm thuốc và để sản xuất thuốc dùng để điều trị rối loạn tiêu hóa.

Các phương án còn bao gồm phương pháp ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tiêu hóa. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng chế phẩm probiotic hoặc các MV trị liệu phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic cho đối tượng để ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tiêu hóa.

Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây cũng thể hiện rằng các MV trị liệu phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic có tác dụng kích thích miễn dịch và có khả năng làm

giảm sự tiết IFN- γ và IL-17A. Cũng nhận thấy có tác dụng làm tăng sự tiết IL-6. Do đó, các MV trị liệu này có thể được sử dụng làm các chất điều biến miễn dịch ở người.

Các chế phẩm probiotic theo sáng chế và/hoặc các MV trị liệu theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm hoặc hạ thấp lượng xytokin IFN- γ và/hoặc IL-17A khi được dùng cho đối tượng. Do đó, các chế phẩm probiotic và/hoặc các MV trị liệu có thể được sử dụng để ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện bất thường của IFN- γ và/hoặc IL-17A bao gồm các bệnh viêm, bệnh tự viêm và bệnh tự miễn. Theo một phương án cụ thể, các bệnh viêm, bệnh tự viêm và bệnh tự miễn được chọn từ nhóm bao gồm SLE, MCTD, RA, SS, DM, SSc, MS, bệnh vẩy nến, bệnh mất xương, chứng loãng xương, chứng thiếu xương, viêm nha chu, viêm lợi, bệnh thiếu cơ, chứng suy mòn, chứng suy dinh dưỡng và dị ứng, chẳng hạn AD, AR, và suyễn, cũng như chứng không dung nạp thức ăn và dị ứng.

Các chế phẩm probiotic theo sáng chế và/hoặc các MV trị liệu theo sáng chế có thể được sử dụng để làm tăng sự tiết xytokin IL-6 khi được dùng cho đối tượng. IL-6 là xytokin nhiều tác động có nhiều chức năng trong cơ thể. Hầu hết các chức năng và quy trình như vậy có liên quan đến các phản ứng viêm, tuy nhiên, các chức năng và phản ứng này rất quan trọng đối với, ví dụ, việc bảo vệ chống lại các tác nhân gây bệnh. Tuy nhiên, các quá trình tiền viêm trong cơ thể phải được cân bằng tốt và *L. reuteri* DSM 17938 cũng đã được mô tả là làm tăng số lượng tế bào T điều hòa (ví dụ: Liu, Y., Fatheree, N.Y., Dingle, B.M., Tran, D.Q., & Rhoads, JM (2013). *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 làm thay đổi tần suất của tế bào T điều hòa Foxp3⁺ trong ruột và hạch bạch huyết mạc treo ruột trong viêm ruột hoại tử thử nghiệm. PloS One, 8(2), e56547. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056547>). Sự tăng biểu hiện của IL-6 kết hợp với tần suất tế bào T điều hòa cao hơn có thể là một cách để làm cho hệ thống miễn dịch cảnh giác hơn và cải thiện khả năng bảo vệ chống nhiễm trùng mà không làm tăng nguy cơ viêm. Do đó, các chế phẩm probiotic và/hoặc các MV trị liệu có thể được sử dụng để cân bằng các quá trình chống viêm và tiền viêm của hệ miễn dịch.

Escherichia coli sinh độc tố ruột (ETEC) là một loại *E. coli* và một trong các vi khuẩn hàng đầu gây ra bệnh tiêu chảy ở các nước đang phát triển cũng như là nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh tiêu chảy ở khách đi du lịch. Ước tính có khoảng 157.000 ca tử vong mỗi năm, hầu hết là trẻ em do ETEC. Các dấu hiệu chính của ETEC là sự biểu hiện

của một hoặc nhiều độc tố ruột và sự xuất hiện của tiêm mao được dùng để gắn vào các tế bào ruột của vật chủ.

Dữ liệu thử nghiệm như được trình bày ở đây thể hiện rằng các MV trị liệu phân lập từ chủng vi khuẩn probiotic đã bảo vệ tính nguyên vẹn của hàng rào biểu mô khỏi tác dụng gây tổn thương của ETEC, đây là mô hình để nghiên cứu ảnh hưởng của tính thấm biểu mô. Chức năng chính của hàng rào đường ruột là điều hòa sự hấp thu các chất dinh dưỡng, chất điện giải và nước từ lòng ống ruột vào hệ tuần hoàn và mặt khác, để ngăn chặn sự xâm nhập của các vi sinh vật gây bệnh và các chất độc hại vào hệ tuần hoàn, do đó một hàng rào nguyên vẹn là cần thiết để có được một tình trạng khỏe mạnh. Hàng rào đường ruột bị phá hủy có liên quan đến một số bệnh và tình trạng khác nhau, chẳng hạn như hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh Crohn, trầm cảm, rối loạn phổ tự kỷ, bệnh túi thừa, viêm nha chu, thiếu xương và loãng xương.

Cũng có báo cáo rằng những thay đổi ở hàng rào ruột có thể là động lực chính của một số dấu hiệu suy mòn (Bindels et al. (2018)).

Tính toàn vẹn của hàng rào biểu mô không chỉ quan trọng trong ruột, một hàng rào nguyên vẹn cũng quan trọng trong khoang miệng, chẳng hạn. Biểu mô nướu là tuyến phòng thủ đầu tiên trong khoang miệng chống lại sự tấn công của vi sinh vật. Nếu bị phá vỡ, vi khuẩn sẽ tiếp cận tập thể vào mô liên kết bên dưới, điều này có thể dẫn đến viêm và phá hủy bộ máy gắn kết của răng (DiRienzo (2014)). Do đó, các chế phẩm probiotic và/hoặc MV trị liệu có thể được sử dụng để ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh hoặc tình trạng gây ra sự phá vỡ tính toàn vẹn của hàng rào biểu mô, tức là rối loạn chức năng hàng rào biểu mô, bao gồm IBS, bệnh Crohn, suy mòn, thiếu xương, loãng xương, viêm lợi, viêm nha chu, trầm cảm, rối loạn phổ tự kỷ, bệnh túi thừa và/hoặc ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa nhiễm ETEC và ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh tiêu chảy và/hoặc bệnh tiêu chảy ở khách du lịch do ETEC hoặc vi khuẩn gây bệnh khác gây ra.

Sự khởi phát nhanh hơn tác dụng y tế hoặc lợi khuẩn như được thấy bởi các MV trị liệu so với vi khuẩn probiotic có thể là hữu dụng để điều trị cho các đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn, chẳng hạn rối loạn tiêu hóa, bệnh viêm, bệnh tự viêm hoặc bệnh tự miễn, rối loạn chức năng hàng rào biểu mô, nhiễm ETEC, bệnh tiêu chảy và/hoặc bệnh tiêu chảy ở khách du lịch. Điều này có nghĩa là bằng cách sử dụng các MV trị liệu hoặc chế phẩm probiotic gồm các MV trị liệu này, có thể thu được sự khởi phát tác dụng điều trị, chẳng

hạn tác dụng y tế hoặc lợi khuẩn nhanh hơn so với chỉ sử dụng vi khuẩn probiotic. Thời gian khởi phát các tác dụng y tế hoặc lợi khuẩn khác nhau như được thấy bởi các MV trị liệu và vi khuẩn probiotic cũng có thể được sử dụng như được đề cập trong phần trên để đạt được tác dụng y tế hoặc lợi khuẩn kéo dài ở đối tượng. Do đó, các MV trị liệu được dùng cho đối tượng sẽ góp phần vào tác dụng điều trị nhanh hoặc tức thời ở đối tượng, trong khi đó nếu sử dụng vi khuẩn probiotic, theo cách riêng rẽ hoặc cùng với các MV trị liệu, cho đối tượng sẽ góp phần vào tác dụng điều trị chậm hơn hoặc chậm ở đối tượng. Kết quả là, bằng cách sử dụng cả các MV trị liệu và vi khuẩn probiotic, hoặc theo cách riêng rẽ hoặc cùng nhau, cho đối tượng, có thể thu được tác dụng y tế hoặc lợi khuẩn kéo dài, tức là cả tức thì và chậm.

Cách thức sử dụng và dạng bào chế thích hợp của chế phẩm probiotic hoặc các MV trị liệu có thể được lựa chọn dựa vào bệnh hoặc rối loạn. Cách thức sử dụng ưu tiên là theo đường miệng. Các cách thức 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, hoặc tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp.

Liều dùng thích hợp của chế phẩm probiotic hoặc các MV trị liệu như được xác định ở đây có thể được lựa chọn dễ dàng tùy thuộc vào bệnh hoặc rối loạn cần điều trị, cách thức sử dụng và dạng bào chế liên quan. Ví dụ, liều dùng và chế độ dùng được lựa chọn để đảm bảo rằng các MV trị liệu hoặc chế phẩm probiotic, được dùng cho đối tượng theo sáng chế, có thể dẫn đến các tác dụng điều trị, tác dụng phòng bệnh hoặc lợi ích sức khỏe mong muốn. Do đó, tốt hơn là liều dùng là liều có hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh, phù hợp với loại bệnh hoặc rối loạn được điều trị. Ví dụ, liều dùng hàng ngày là từ 10^4 đến 10^{10} , ví dụ, từ 10^5 đến 10^9 , hoặc từ 10^6 đến 10^8 , hoặc 10^8 đến 10^{10} tổng CFU 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 vi khuẩn. Ví dụ, liều dùng hàng ngày là 10^4 đến 10^{14} , ví dụ 10^5 đến 10^{13} , hoặc 10^6 đến 10^{12} , hoặc 10^8 đến 10^{12} , hoặc 10^{10} đến 10^{12} , hoặc 10^{10} đến 10^{14} tổng số MV trị liệu có thể được sử dụng. Liều dùng hàng ngày được ưu tiên là khoảng 10^{10} tổng số MV trị liệu, ví dụ, 10^9 đến 10^{11} hoặc 10^{10} đến 10^{11} MV trị liệu. Liều dùng hàng ngày khác được ưu tiên là khoảng 10^9 tổng số MV trị liệu, ví dụ, 10^8 đến 10^{10} MV trị liệu. Liều dùng hàng ngày khác được ưu tiên là khoảng 10^8 tổng số MV trị liệu, ví dụ, 10^7 đến 10^9 MV trị

liệu. Ví dụ khác sử dụng các MV được tạo ra bởi số lượng cố định của vi khuẩn, chẳng hạn 10^8 hoặc 10^9 CFU vi khuẩn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế, điều trị hoặc ngăn ngừa đau bụng, cụ thể là đau bụng ở trẻ sơ sinh, và/hoặc bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hoặc rối loạn ở đường tiêu hóa ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, rối loạn gây đau ở đường tiêu hóa, bệnh mất xương, bệnh nha chu, và sự kết hợp các rối loạn hoặc bệnh này ở đối tượng. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng chế phẩm probiotic và/hoặc các MV trị liệu theo sáng chế cho đối tượng.

Ức chế bệnh hoặc rối loạn như được sử dụng ở đây bao gồm việc làm chậm sự khởi phát bệnh hoặc rối loạn hoặc triệu chứng đi kèm với bệnh hoặc rối loạn này.

Đối tượng tốt hơn là đối tượng động vật có vú, và tốt hơn nữa là đối tượng người.

Các ví dụ như được bộc lộ ở đây mô tả quy trình để sản xuất và phân lập các MV trị liệu từ chủng vi khuẩn *L. reuteri* DSM 17938 đã được nghiên cứu kỹ với mục đích điều tra và sử dụng tác dụng lợi khuẩn của chủng vi khuẩn probiotic và các MV trị liệu của chúng. Tác dụng lợi khuẩn của các MV phân lập được so với tác dụng của toàn vi khuẩn. Phát hiện ra rằng các MV có khả năng tổng hợp lại các tác dụng có lợi của toàn vi khuẩn trong mô hình *ex vivo* để nghiên cứu nhu động đường tiêu hóa và trong mô hình *in vitro* để nghiên cứu tín hiệu đau. Ngạc nhiên là, các MV không chỉ tổng hợp lại tác dụng lợi khuẩn của vi khuẩn, mà chúng còn có hiệu quả hơn so với toàn vi khuẩn như được chứng minh bởi khả năng tác động nhanh hơn của chúng trong mô hình truyền tín hiệu thần kinh, điều này dẫn đến sự khởi phát tác dụng thu được sớm hơn. Để củng cố hơn nữa các kết quả này, một chủng *L. reuteri* khác (*L. reuteri* DSM 32846) được nghiên cứu, cũng thể hiện các tác dụng tương tự. Hơn nữa, tác dụng của *L. reuteri* DSM 17938 và *L. reuteri* DSM 32846 có thể còn được cải thiện hơn nữa khi vi khuẩn được trải qua các quá trình xử lý gây cảm ứng, bao gồm các thử nghiệm đồng nuôi cấy với các chủng vi khuẩn khác hoặc với môi trường điều hòa từ các chủng vi khuẩn khác, làm tăng cường khả năng của vi khuẩn sản sinh và giải phóng các MV.

Để nghiên cứu các MV trị liệu từ chủng vi khuẩn probiotic và tác dụng của chúng trong các mô hình sinh lý khác nhau, các phần MV phân lập được phân lập bằng cách nuôi cấy vi khuẩn, sau đó phân lập các MV được giải phóng. Các tác giả sáng chế đã xác định

các cách thức cải thiện để nuôi cấy vi khuẩn probiotic để làm tăng sản sinh MV đang có và còn thể hiện hoạt tính sinh học được tăng cường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Thay đổi hoạt tính enzym liên quan đến sự sản sinh MV

Lactobacillus reuteri DSM 17938 được nuôi cấy và cho trải qua các xử lý gây cảm ứng khác nhau ở các thời điểm cụ thể. Đáp ứng với các xử lý gây cảm ứng này được xác định nhờ sử dụng thử nghiệm enzym và so với đáp ứng thu được với xử lý đối chứng. Các xử lý gây cảm ứng bao gồm gây ra stress lên vi khuẩn trong suốt pha sinh trưởng của chúng, và sau đó đánh giá tác động lên hoạt tính enzym trong môi trường điều hòa vi khuẩn.

Vật liệu và phương pháp

Nuôi cấy/thu gom mẫu

L. reuteri DSM 17938 được nuôi cấy từ chủng gốc trữ đông trong 25mL môi trường de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) trong các điều kiện nuôi cấy thông thường, tức là, được nuôi cấy kỵ khí ở 37°C qua đêm. Sau đó, vi khuẩn (20mL) được nuôi cấy lại trong 200mL MRS và áp dụng các xử lý gây cảm ứng khác nhau, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Các mẫu vi khuẩn được ly tâm ở 5000 x g trong 10 phút, chuyển phần dịch nổi sang ống mới, sau đó ly tâm ở 10.000 x g trong 10 phút. Lọc phần dịch nổi qua bộ lọc 0,45 µm, và giữ trên nước đá trước khi ly tâm tiếp nhờ sử dụng máy siêu ly tâm ở 32 000 vòng/phút ở 4°C trong 3 giờ (Beckman SW 32 Ti Rôto, thùng lắc, ống 30 mL). Loại bỏ phần dịch nổi (nhẹ nhàng hút ra bằng pipet). Thận trọng tạo huyền phù lại các viên vón trong môi trường tạo huyền phù lại (dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS)). Thể tích tạo huyền phù lại thay đổi, trong khoảng từ 100 – 300 µL, tùy thuộc vào kích thước viên vón. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở -70°C.

Xử lý bằng oxy

Nồng độ oxy tăng (stress oxy hóa) được mô phỏng bằng cách lắc mạnh dịch nuôi cấy vi khuẩn. Mô phỏng stress oxy hóa tiếp tục được giữ lắc trong 24 giờ.

Xử lý bằng nhiệt độ cao

Stress gây ra bởi nhiệt độ được tạo ra bằng cách nâng nhiệt độ từ T=37°C đến T=50°C ở thời điểm khi mật độ quang (optical density - OD) đạt độ hấp thụ khoảng 1,6 và

được giữ ở $T=50^{\circ}\text{C}$ trong 20 phút. Sau bước xử lý bằng nhiệt độ cao này, vi khuẩn được nuôi cấy ở các điều kiện bình thường ở $T=37^{\circ}\text{C}$. Tổng thời gian nuôi cấy là 24 giờ.

Thay đổi trong xử lý bằng độ pH

Stress gây bởi độ pH được tạo ra bằng cách hạ độ pH từ pH 6,5 xuống pH 2 ở thời điểm khi (OD) đạt đến độ hấp thụ khoảng 1,6. Có được sự thay đổi độ pH bằng cách xoáy xuống tế bào vi khuẩn và thêm dịch vị mô phỏng vào viên vón vi khuẩn để đạt độ pH 2. Độ pH giảm xuống được giữ trong 10 phút trước khi bổ sung trở lại phần dịch nổi vào tế bào vi khuẩn để chuẩn hóa độ pH đến 6,5. Thời gian nuôi cấy thay đổi do hai mẫu khác nhau đã được lấy. Chúng được đặt tên khác nhau như được thể hiện trên Fig.1. pH: Mẫu được lấy sau thời gian nuôi cấy 24 giờ; pH + dịch vị: Mẫu được lấy ngay sau khi cảm ứng dịch vị 10 phút.

Xử lý đồng nuôi cấy

Trong xử lý này, *L. reuteri* DSM 17938 được đồng nuôi cấy với *Bifidobacterium longum* DSM 32947 và *B. longum* DSM 32948 trong SIM (môi trường ruột mô phỏng, công thức như mô tả dưới đây) bằng cách thêm phần dịch nổi, tức là, môi trường điều hòa, từ *B. longum* DSM 32947 hoặc *B. longum* DSM 32948. Để làm đối chứng, *L. reuteri* DSM 17938 được sinh trưởng trong SIM.

Bảng 1 - công thức cho SIM (môi trường ruột mô phỏng)

Môi trường ruột mô phỏng (mỗi lít)
2g trypton (Oxoid)
2g cao nấm men
1,0g NaCl
0,5g K_2HPO_4
0,5g KH_2PO_4
0,1g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,01g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

5,58g MOPS

1mL Tween 80

2,5mg Hemin (1,0mg/mL, 2,5mL; hòa tan trong
0,05M NaOH)

1mg Vitamin K (vitamin K_2 ; 2 mg/mL, 0,5mL; hòa
tan trong etanol)

0,4g Xystein-HCl

0,5g mật (lợn)

0,005g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,05g MnSO_4

100ng $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (100 $\mu\text{g/mL}$, 1 mL)

Điều chỉnh độ pH đến 6,8; hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Đường và các dung dịch chất nhận điện tử đã lọc vô trùng được bổ sung trước khi nuôi cấy. Các nồng độ cuối: 15mM của mỗi loại. Đường Galacto-oligosacarit (GOS) hoặc glucoza. Chất nhận điện tử: Xitrat, 1,2 propandiol hoặc fructoza.

Hoạt tính enzym

Các mẫu thu được từ các xử lý gây cảm ứng trên đây được rã đông và sau đó được kiểm tra trong thử nghiệm về hoạt tính 5'-nucleotidaza nhờ sử dụng kit Crystal Chem 5'-Nucleotidase Assay (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, Mỹ). Nói ngắn gọn, quy trình được thực hiện trong hai bước. Đầu tiên, chất phản ứng 1 (CC1) chứa AMP được bổ sung vào các mẫu dịch nổi để chuyển hóa AMP thành adenosin nhờ enzym 5'-nucleotidaza bất kỳ có mặt trong các mẫu dịch nổi. Adenosin được thủy phân tiếp thành inosin và hypoxanthin bởi các thành phần trong chất phản ứng 1. Trong bước thứ hai, chất phản ứng

2 (CC2) được bổ sung vào để chuyển hóa hypoxantin thành axit uric và hydro peroxit, mà được sử dụng để tạo ra thuốc nhuộm quinon được đo động học ở 550nm trong máy đo quang phổ. Hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các mẫu được xác định bằng cách tính toán sự thay đổi về độ hấp thụ giữa 3 và 5 phút và so sánh với giá trị từ mẫu của bộ định chuẩn.

Kết quả

Như có thể được thấy từ các kết quả trình bày trên Fig.1, hoạt tính 5'-nucleotidaza tăng lên bằng xử lý bằng oxy (DSM17938+O₂) và đồng nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 và *B. longum* DSM 32947 hoặc *B. longum* DSM 32948 trong môi trường SIM (DSM17938+DSM32947 trong SIM hoặc DSM17938+DSM32948 trong SIM).

Các xử lý gây cảm ứng khác không gây ra bất kỳ sự tăng về hoạt tính 5'-nucleotidaza so với *L. reuteri* DSM 17938 được sinh trưởng đối chứng (DSM17938 trong môi trường MRS hoặc DSM17938 trong môi trường SIM).

Ví dụ 2 – Các điều kiện nuôi cấy cụ thể liên quan đến sự tăng sản sinh MV

Lactobacillus reuteri DSM 17938 được nuôi cấy và cho trải qua các xử lý gây cảm ứng khác nhau. Lượng MV được sản sinh là kết quả từ các xử lý gây cảm ứng này được xác định bằng cách sử dụng phân tích truy vết hạt nano (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) và các kết quả được so sánh với đáp ứng thu được với các xử lý đối chứng. Các xử lý gây cảm ứng bao gồm xử lý bằng oxy và xử lý bằng sucroza, và sau đó đánh giá tác động lên sự sản sinh MV trong môi trường điều hòa vi khuẩn.

Vật liệu và phương pháp

Xử lý bằng oxy

L. reuteri DSM 17938 được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy bình thường, tức là, được nuôi cấy kỵ khí trong môi trường de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) ở 37°C trong chai/bình thót cổ. Xử lý bằng oxy được tạo ra bằng cách lắc mạnh dịch nuôi cấy vi khuẩn trong 24 giờ. Để làm đối chứng *L. reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy bình thường, tức là, được nuôi cấy kỵ khí trong môi trường MRS ở 37°C trong chai/bình thót cổ mà không làm tăng nồng độ oxy (không xử lý bằng oxy).

Xử lý bằng sucroza

L. reuteri DSM 17938 được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy bình thường, tức là, được nuôi cấy kỵ khí trong môi trường (Lactobacillus Carrying Medium - LCM) ở 37°C trong chai/bình thốt cổ. Stress được tạo ra bằng cách thêm sucroza (nồng độ cuối 2% trong LCM) vào dịch nuôi cấy vi khuẩn ở thời điểm bắt đầu lên men. Tổng thời gian nuôi cấy là 24 giờ. Để làm đối chứng, *L. reuteri* DSM 17938 được cho sinh trưởng trong các điều kiện nuôi cấy bình thường có bổ sung glucoza 2% thay vì sucroza 2%.

Phân tích truy vết hạt nano (NTA)

Nghiên cứu đặc tính hóa lý của MV bằng cách sử dụng phương pháp NTA. Các MV được pha loãng phù hợp bằng PBS không chứa hạt (được lọc qua bộ lọc 0,02µm) để thu được nồng độ trong khoảng giá trị được khuyến cáo ($1-10 \times 10^8$ hạt/mL), và được truy vết trực tiếp bằng cách sử dụng hệ thống NanoSight NS300 (NanoSight™ technology, Malvern, Anh). Phân tích này được thực hiện theo thiết lập công cụ sau đây:

1. Nạp mẫu: Nạp mẫu bằng bơm tiêm vào đĩa có phần trên hình vòng tròn chữ O, được gắn trên môđun laza (chùm tia laze là 488nm).

2. Đo mẫu: Sau khi tối ưu hóa hình ảnh, các video được thu thập ở 25°C bằng camera sCMOS có độ nhạy cao và được phân tích bằng phần mềm NTA (phiên bản 3.2) sau khi chụp ở chế độ điều khiển bản chính (3 video 90 giây mỗi lần đo) bằng cách sử dụng bơm tiêm tốc độ 50.

3. Phân tích mẫu: Các mẫu được chụp và phân tích bằng cách áp dụng các cài đặt được tối ưu hóa bằng thiết bị, đây là hình ảnh trực quan tốt nhất về các hạt bằng cách áp dụng các điều chỉnh phần mềm (mức camera, tiêu điểm và ngưỡng phát hiện) để tối ưu hóa kết quả phân tích đối với các mẫu khác nhau. Các cài đặt khác, chẳng hạn chế độ mờ, độ dài rãnh tối thiểu và kích thước dự kiến tối thiểu được đặt “tự động” và độ nhót là 0,890 cP. Phần mềm NTA đã được tối ưu hóa và sau đó truy vết từng hạt trên cơ sở từng khung hình, và truy vết chuyển động Brown của nó và đo khung hình này sang khung hình khác bằng cách chụp một tệp video. Phần mềm theo dõi nhiều hạt riêng lẻ và sử dụng phương trình Stokes-Einstein để tính toán đường kính thủy động lực học của chúng. Nhiều video có thời lượng 90 giây đã được ghi lại để tạo ra các biểu đồ lặp lại được tính trung bình cho mỗi mẫu.

Kết quả

Cả xử lý bằng oxy và bổ sung sucroza đều dẫn đến sự tăng sản sinh MV so với các đối chứng tương ứng, xem bảng 2 bên dưới.

Bảng 2 – Sự sản sinh MV

Mẫu	MV/mL
<i>L. reuteri</i> DSM 17938 trong MRS	$2,6 \times 10^8 \pm 3,0 \times 10^7$
<i>L. reuteri</i> DSM 17938 trong MRS và xử lý bằng oxy	$1,4 \times 10^{10} \pm 4,5 \times 10^8$
<i>L. reuteri</i> DSM 17938 trong LCM	$2,5 \times 10^7$
<i>L. reuteri</i> DSM 17938 trong LCM và bổ sung sucroza 2%	$4,7 \times 10^7$

Ví dụ 3 - Các vi túi của vi khuẩn phân lập được tổng hợp lại tác động của vi khuẩn trên nhu động ruột

Vật liệu và phương pháp

Động vật

Chuột đực Swiss Webster trưởng thành (6-8 tuần tuổi) được thu nhận từ Charles River Laboratories (Wilmington, MA, Mỹ). Các con vật được nhốt 4-5 con/lồng theo chu kỳ sáng/tối 12 giờ và được cung cấp thức ăn và nước uống theo nhu cầu. Các quy trình tiếp theo diễn ra trong ống nghiệm, sau khi cắt cổ tử cung theo quy định của Ban Nghiên cứu đạo đức động vật McMaster (McMaster McMaster Animal Ethics Research Board - AREB) (giấy phép 16-08-30).

Ghi hình bề nổi mô

Việc ghi hình bề nổi mô được thực hiện như được mô tả trong Wu et al. (2013). Tối thiểu các đoạn hỗng tràng và kết tràng dài 4 cm được cắt và gắn trong một bể nổi mô 20 mL chứa đầy Krebs oxy hóa ở 34°C. Đầu phía miệng của đoạn ruột được đặt ống thông và các chất bên trong được đẩy ra khỏi lòng ống ruột bằng cách truyền trọng lực Krebs có khí cacbogen bằng cách sử dụng chai Mariotte. Khi đã sạch, đầu phía hậu môn của các đoạn ruột được đặt ống thông với ống thoát silicon. Ngăn trong lòng ống ruột được tưới Krebs ở nhiệt độ phòng ở 5mL/phút. Ngăn thanh dịch được tưới Krebs có khí cacbogen được làm

ấm ở 34°C ở tốc độ 2mL/phút. Krebs oxy hóa bao gồm (mmol L⁻¹): 118 NaCl, 4,8 KCl, 25 NaHCO₃, 1,0 NaH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 11,1 glucoza, và 2,5 CaCl₂ được sục khí cacbogen (95% O₂ và 5% CO₂). Trước khi ghi, áp suất trong lòng ống ruột được điều chỉnh đến 2-3 hPa bằng cách tăng và giảm chiều cao của ống dòng vào và ống dòng ra. Áp dụng các xử lý bằng cách mở và đóng các khóa vòi tương ứng để chặn dòng Krebs đi vào trong ống ruột và bắt đầu dòng vi khuẩn. *L. reuteri* DSM 17938 được sử dụng ở nồng độ 8-log đơn vị hình thành khuẩn lạc (colony-forming unit - CFU)/mL. Môi trường điều hòa từ *L. reuteri* DSM 17938, các vi túi được tạo ra bởi *L. reuteri* DSM 17938 và môi trường điều hòa với các vi túi đã được lấy ra được sử dụng ở các nồng độ bằng với nồng độ của toàn vi khuẩn.

Ghi hình video

Các video được ghi lại bằng cách sử dụng webcam video JVC được đặt cao hơn đoạn mô 7cm. Các đoạn phim video ngắn được ghi lại và lưu trữ ở định dạng tập tin MOV ở tốc độ khung là 10 fps và tỷ lệ hình ảnh là 4:3 nhờ sử dụng phần mềm NCH Debut Video Capture. Thời gian ghi hình thay đổi từ 20 phút đến 40 phút. Sử dụng phần mềm chỉnh sửa VideoPad Video Editor, các video được phóng to đến 4 xentimet nhờ sử dụng tỷ lệ hình ảnh bắt buộc 4:3. Video được chuyển sang đen trắng bằng cách điều chỉnh đường cong màu và áp dụng bộ lọc hai tông màu. Video đen trắng này được xuất ra ở 10 fps ở độ phân giải 400 x 300 điểm ảnh.

Phân tích

Tất cả việc tạo, thao tác và phân tích bản đồ đường kính không gian được thực hiện như được mô tả trong Wu et al. (2013). Các bản ghi video được phân tích bằng cách sử dụng plugin StMap cho phần mềm NIH Image J. Sử dụng quy trình phát hiện cạnh, đường kính của mỗi vị trí trên ruột được biểu diễn dưới dạng giá trị màu từ 0 đến 255. Sự co thắt của ruột nơi đường kính nhỏ hơn, đạt đến giá trị màu bằng 0 và được biểu thị dưới dạng các vùng màu đen đậm hơn. Các khu vực giãn hoặc phục hồi đạt giá trị màu là 255 và có màu trắng. Phần mềm tạo ra bản đồ không gian thời gian trong suốt thời gian của video. Bản đồ hiển thị các màu sáng và tối xen kẽ dựa trên vị trí dọc theo đường ruột, thời gian và đường kính. Bản đồ không gian thời gian này chạy từ phía miệng đến hậu môn trên trục tung và theo thời gian trên trục hoành. Vận tốc lan truyền phức hợp co thắt (Propagating contractile complexes - PCC) được xác định bằng cách đo độ dốc của các co thắt tối lớn.

Tần số PPC được xác định bằng cách đo số lần co thắt giữa các khoảng thời gian. Biên độ được đo bằng chiều cao (đường kính ruột) của các cơn co thắt đỉnh điểm.

Vi khuẩn

L. reuteri DSM 17938 từ chủng gốc được cho sinh trưởng trong môi trường de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), thu hoạch ở 48 đến 72 giờ, rửa trong nước muối đệm phosphat (PBS), và bảo quản ở -20°C trong các phần phân ước 1,1 ml ở 1×10^{10} CFU/mL, và các vi túi của chúng được phân lập như mô tả dưới đây.

Các MV được phân lập từ canh trường nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 (48-72 giờ). Sau khi ly tâm ở $600 \times g$ trong 30 phút, dịch nổi được lọc qua bộ lọc $0,22\mu\text{m}$, rửa hai lần trong PBS ở $100.000 \times g$ ở 4°C , tạo huyền phù lại trong PBS vô trùng tương ứng với thể tích của dịch nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 ban đầu, và bảo quản ở -80°C trong các phần phân ước 0,5mL biểu thị 1×10^{12} CFU/mL. Các MV được định lượng bằng cách tham chiếu đến số lượng vi khuẩn sống được trong dịch nuôi cấy và cũng được chuẩn hóa bằng hàm lượng protein (phù hợp 5–8 mg/mL protein, 25–60 ng/mL ADN, và 18–30 ng/mL ARN; $n = 10$) đo được bằng NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, Mỹ). Các chế phẩm MV được sử dụng ở đương lượng 10^{10} CFU/mL trong toàn bộ các thử nghiệm trừ khi được chỉ rõ khác.

Vi khuẩn được pha loãng đến nồng độ 8-log CFU/mL để sử dụng.

Kết quả

L. reuteri DSM 17938 và các sản phẩm của quá trình nuôi cấy được sử dụng trong lòng ống ruột vào các phần chuẩn bị *in vitro* của hồng tràng và kết tràng của chuột để xác định xem các vi túi được tạo ra bởi *L. reuteri* DSM 17938 có thể tổng hợp lại tác động của vi khuẩn mẹ lên nhu động ruột hay không. Môi trường điều hòa (CM) được xác định là môi trường sinh trưởng (canh trường), trong đó vi khuẩn *L. reuteri* DSM 17938 đã được nuôi cấy. Vi khuẩn được tách ra khỏi CM bằng cách ly tâm và CM còn lại được sử dụng trong lòng ống ruột vào các phần ruột đã chuẩn bị *in vitro* như được mô tả trên đây. Các vi túi (MV) được phân lập bằng cách ly tâm từ *L. reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy trong 72 giờ, sau đó được tạo huyền phù trong dung dịch đệm Krebs. Môi trường điều hòa còn lại sau khi các vi túi và vi khuẩn đã được loại bỏ (CM-MV) sau đó được sử dụng trong lòng ống ruột cho mô. Để làm đối chứng âm, môi trường sinh trưởng được sử dụng để nuôi cấy

vi khuẩn (canh trường) được sử dụng riêng rẽ. Tác dụng của các xử lý này được so sánh với đối chứng sử dụng dung dịch đệm Krebs và đánh giá qua ba tham số của phức co thắt lan truyền (PCC) trong các đoạn ruột: vận tốc, tần số và biên độ.

Các kết quả được lập lại một cách chắc chắn với các phân được chuẩn bị 24 giờ.

L. reuteri DSM 17938 và các sản phẩm của nó làm giảm nhu động ruột non

Vận tốc PCC của hồng tràng

L. reuteri DSM 17938, CM, và MV đều làm giảm vận tốc PCC ở mức độ tương tự trong hồng tràng. *L. reuteri* DSM 17938 làm giảm đáng kể vận tốc PCC ở hồng tràng đến 34% khi được dùng trong lòng ống ruột ($p = 0,0067$, $n = 20$) (Fig.2A). CM tổng hợp lại tác động của vi khuẩn mẹ và làm giảm vận tốc PCC đến 29% ($p = 0,0107$, $n = 28$) (Fig.2B). Để làm đối chứng âm, canh trường được dùng làm môi trường để nuôi cấy vi khuẩn được kiểm tra một cách độc lập và có tác động không đáng kể lên vận tốc PCC ở hồng tràng (giảm 5%) so với đối chứng Krebs ($p = 0,0877$, $n = 20$) (Fig.2C). Các vi túi phân lập từ mẹ nuôi cấy 72 giờ làm giảm đáng kể vận tốc PCC ở hồng tràng đến 19% ($p = 0,0002$, $n = 20$) (Fig.2D). CM-MV không làm thay đổi vận tốc PCC ở hồng tràng khi được dùng cho ống ruột ($p = 0,5203$, $n = 20$) (Fig.2E).

Tần suất PCC ở hồng tràng

Việc làm giảm tần suất PCC ở hồng tràng cũng được tạo ra bởi *L. reuteri* DSM 17938, CM, và MV. *L. reuteri* DSM 17938 làm giảm đáng kể tần suất PCC đến 26% ở hồng tràng ($p = 0,0482$, $n = 20$) (Fig.3A). Tương tự, CM làm giảm tần suất PCC đến 21% ($p = 0,0139$, $n = 28$) (Fig.3B). Canh trường không làm thay đổi đáng kể tần suất PCC ở hồng tràng (giảm 6%) khi được dùng cho ống ruột ($p = 0,2424$, $n = 20$) (Fig.3C). Các vi túi làm giảm đáng kể tần suất PCC ở hồng tràng đến 26% khi so với vi khuẩn ($p = 0,0004$, $n = 20$) (Fig.3D). Tần suất PCC ở hồng tràng không bị ảnh hưởng đáng kể do sự bổ sung CM-MV vào ống ruột ($p = 0,3408$, $n = 20$) (Fig.3E).

Biên độ PCC ở hồng tràng

Biên độ PCC ở hồng tràng không bị thay đổi đáng kể trong nhóm bất kỳ trong số các nhóm xử lý, ngoại trừ các vi túi. Các vi túi làm giảm biên độ PCC ở hồng tràng đến 17% ($p = 0,0453$, $n = 20$) (Fig.4D), mặc dù tác động này không có mặt trong các thử nghiệm *L. reuteri* DSM 17938 hoặc CM ($p = 0,3917$, $n = 20$ và $p = 0,1989$, $n = 28$, tương ứng, các

Fig. 4A và 4B). Canh trường và CM-MV không làm thay đổi biên độ PCC ở hồng tràng ($p = 0,8472$ và $p = 0,5627$, $n = 20$) (các Fig. 4C và 4E).

L. reuteri DSM-17938 và các sản phẩm của nó làm tăng các thông số nhu động kết tràng

Vận tốc PCC ở kết tràng

Nhu động co thắt ở kết tràng được kích thích bằng cách bổ sung *L. reuteri* DSM 17938, CM, hoặc MV. *L. reuteri* DSM 17938 làm tăng đáng kể vận tốc của các cơn co thắt PCC trong kết tràng đến 65% ($p = 0,0004$, $n = 20$) (Fig.5A). Tác động này được tổng hợp lại bởi CM, làm tăng đáng kể vận tốc PCC đến 72% ở kết tràng ($p = 0,0021$, $n = 28$) (Fig.5B). Canh trường tiếp tục có ít tác động đến nhu động ruột, làm tăng vận tốc PCC ở kết tràng đến 8%, nhưng không nằm trong khoảng có ý nghĩa 0,05 ($p = 0,1861$, $n = 20$) (Fig.5C). Các vi túi làm tăng đáng kể vận tốc của PCC trong kết tràng đến 24% ($p = 0,0051$, $n = 20$), nhưng ở mức độ nhỏ hơn các vi túi được tạo ra bởi *L. reuteri* DSM 17938 và CM (Fig.5D). CM-MV được dùng trong ống ruột không làm thay đổi vận tốc PCC ở kết tràng đáng kể ($p = 0,6475$, $n = 20$) (Fig.5E).

Tần suất PCC ở kết tràng

L. reuteri DSM 17938, CM, và MV đều kích thích nhu động kết tràng bằng cách làm tăng tần suất các cơn co thắt PCC. *L. reuteri* DSM 17938 làm tăng đáng kể tần suất PCC ở kết tràng đến 30% ($p = 0,0231$, $n = 20$) (Fig.6A). Với cùng khả năng, CM làm tăng đáng kể tần suất PCC đến 31% ở kết tràng ($p = 0,0073$, $n = 28$) (Fig.6B). Canh trường làm tăng tần suất PCC ở kết tràng chỉ 4%, nhưng không đáng kể ($p = 0,7219$, $n = 20$) (Fig.6C). Tương tự với vận tốc PCC, các vi túi làm tăng tần suất của PCC ở kết tràng đến 18% ($p = 0,0424$, $n = 20$); (Fig.6D). CM-MV không có tác động đáng kể lên tần suất PCC ở kết tràng ($p = 0,3298$, $n = 20$) (Fig.6E).

Biên độ PCC ở kết tràng

Biên độ PCC ở kết tràng không bị ảnh hưởng đáng kể bởi *L. reuteri* DSM 17938 hoặc nhóm bất kỳ trong số các nhóm xử lý khác (các Fig. 7A-E).

Kết luận

L. reuteri DSM 17938 có tác động đặc hiệu vùng lên nhu động ruột; làm giảm vận tốc PCC và tần số co thắt ở hồng tràng và làm tăng vận tốc PCC và tần số co thắt ở kết tràng. Nghiên cứu này chứng minh rằng cả các vi túi và môi trường điều hòa đều tổng hợp lại tác động của *L. reuteri* DSM 17938 lên nhu động ruột ở cả ruột non và kết tràng. Hơn nữa, các kết quả này không được thấy khi môi trường điều hòa được sử dụng sau khi loại bỏ các vi túi (CM-MV). Toàn bộ các kết quả được tổng hợp trên Fig.8.

Các kết quả này chứng minh vai trò của các vi túi trong quá trình truyền tín hiệu của vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* với sinh vật chủ và cơ chế tác động của chúng trong trục hệ vi khuẩn - ruột - não bộ. Điều này thể hiện rằng các vi túi được tạo ra bởi hoặc giải phóng bởi vi khuẩn là nguyên nhân gây ra các thay đổi ở nhu động ruột gây ra bởi *L. reuteri* DSM 17938

Ví dụ 4 - Các vi túi của vi khuẩn phân lập tổng hợp lại tác động của vi khuẩn lên quá trình truyền tín hiệu đau

Tác động của các vi túi phân lập từ môi trường nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 lên sự truyền tín hiệu đau được kiểm tra nhờ sử dụng tế bào Jurkat biểu hiện TrpV1 với sự có mặt của capsaixin 10 μ M.

Vật liệu và phương pháp

Nuôi cấy tế bào

Tế bào Jurkat (Clone E6-1 (ATCC® TIB-152™), ATCC) được tạo huyền phù trong môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) chứa 2% huyết thanh bào thai bò (FBS) ở nồng độ $\sim 5 \times 10^6$ tế bào/mL tổng thể tích là 20 mL.

L. reuteri DSM 17938 được nuôi cấy, thu hoạch và bảo quản như mô tả trong ví dụ 3 trên đây. Chế phẩm phân lập các vi túi từ *L. reuteri* DSM 17938 cũng được thực hiện theo ví dụ 3 trên đây (48 giờ). Vi khuẩn được pha loãng trong canh trường MRS đến nồng độ cuối là 10¹⁰ CFU/ml, và giữ đông lạnh ở -80°C cho đến khi sử dụng cho các thử nghiệm.

Dòng canxi tỷ lệ được đo bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy

50 μ g của mỗi trong hai thuốc nhuộm, Fluo-3 AM (F1242; Sigma) và Fura Red AM (F3021; Sigma), được hòa tan trong 100 μ L axit pluronic 0,1% (PLURONIC® F127 hòa tan trong dimethyl sulfoxit (DMSO)). 50 μ L dung dịch Fluo-3 và 100 μ L dung dịch Fura Red

sau đó được bổ sung vào 20 mL tế bào Jurkat, tạo ra tỷ lệ Fluo-3 so với Fura Red bằng 1:2,5. Sau đó tế bào được ủ ở 37°C trong 1 giờ và được rửa bằng PBS (ly tâm ở $300 \times g$ trong 10 phút). Sau đó, tế bào được tạo huyền phù trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) hoặc môi trường RPMI 1640 chứa 2% FBS.

Vào ngày thử nghiệm, vi khuẩn được làm tan băng, rửa trong PBS ba lần, và sau đó được bổ sung vào dịch nuôi cấy tế bào. Theo cách khác, các vi túi phân lập từ vi khuẩn (như mô tả trong ví dụ 3) được làm tan băng, rửa và bổ sung vào dịch nuôi cấy tế bào. Tiếp tục ủ ở 37°C thêm 1 giờ nữa. Sau đó, huyền phù tế bào được xoáy xuống như trên và được tạo huyền phù lại trong PBS chứa 1,25 mM Ca^{2+} .

Tất cả các thử nghiệm được thực hiện trên BD FACSCelesta (BD Bioscience, Mississauga, Canada) được trang bị các tia laser sau: Tia laser màu xanh phát ra ở bước sóng 488 nm, tia laser màu đỏ phát ra ở bước sóng 640 nm và tia laser màu tím phát ra ở bước sóng 406 nm. Hiệu chuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng các hạt BD PMT (BD, Mississauga, Canada). Các phân bù được thực hiện với các hạt bù BD một màu.

Đối với thử nghiệm FACS, một mL huyền phù tế bào được chuyển vào ống 5 mL có nắp lọc tế bào (Falcon 352235), và quay trong 1 phút trước khi phân tích. Capsaicin được điều chế từ dung dịch gốc 100 mM và được pha loãng thành 100 μM trong PBS chứa canxi và magiê.

Nền tương ứng với dòng canxi không đặc hiệu được ghi lại trong 30 giây. Tất cả các mẫu được thu nhận trong một thời gian cố định (30 hoặc 60 giây) với tốc độ dòng chảy không đổi (số tế bào/giây). 100 μL dung dịch Capsaicin (tạo ra nồng độ cuối cùng là 10 μM) được thêm vào huyền phù tế bào ngay trước khi ghi bằng FACSCelesta.

Ghi liên tục với tốc độ 400–600 sự kiện/giây trong tổng số 30 đến 60 giây.

Cả Fluo-3 và Fura Red đều được kích thích ở 488 nm với phát xạ Fluo-3 được phát hiện ở 575nm và phát hiện Fura Red ở 610nm. Dữ liệu được thu thập dưới dạng biểu đồ hiển thị tỷ lệ giữa huỳnh quang Fluo-3 màu tím đến xanh lam so với thời gian và huỳnh quang Fura Red so với thời gian.

Phân tích tỷ lệ của Fluo-3/Fura Red được đo bằng cách kích thích bằng tia laser Blue (488nm). Sự phát xạ được phát hiện bởi hai bộ lọc khác nhau: sự tăng phát xạ được theo dõi trên tia laser Violet (610/20 nm), trong khi sự giảm phát xạ được phát hiện ở tia laser

Blue (575/25 nm). Tỷ lệ, 'tỷ lệ Fluo-3/Fura Red' được tính toán theo tín hiệu tăng được kích thích bởi tia laser Violet trên tín hiệu giảm được kích thích bởi tia laser Blue (406nm/488nm) bằng cách sử dụng công cụ Kinetics trong phần mềm FlowJo (Tree Star Inc., OR, USA).

Kết quả

Capsaixin riêng hoặc các MV phân lập từ một chủng vi khuẩn khác, JB-1, (MV-JB-1) được sử dụng làm đối chứng. Chỉ báo (Fig. 9) cho hoạt hóa capsaixin là canxi đi vào tế bào Jurkat, làm tăng tỷ lệ FLuo-3/Fura Red. Capsaixin riêng ở 10 μ M làm cho canxi đi vào tế bào Jurkat, đáp ứng này bị chặn đáng kể bằng cách sử dụng các MV phân lập từ *L. reuteri* DSM 17938 (DSM-MV) ở nồng độ cao tương ứng với *L. reuteri* DSM 17938 ở 10¹¹ CFU/mL. Các nồng độ thấp của MV từ *L. reuteri* DSM 17938 tương ứng với *L. reuteri* DSM 17938 ở 10⁹-10¹⁰ CFU/mL có tác động tương tự, nhưng giảm nhẹ, trong khi các MV từ *L. rhamnosus* JB-1 ở nồng độ cao tương ứng với JB-1 ở 10¹¹ CFU/mL không có tác động đáng kể lên đáp ứng với xử lý capsaixin.

Ví dụ 5 - Sự khởi phát tác dụng trên sự kích thích dây thần kinh tủy sống bằng các vi túi của vi khuẩn phân lập nhanh hơn so với sự khởi phát tác dụng thu được bởi toàn vi khuẩn

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ quan sát được rằng các vi túi từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 không chỉ tổng hợp lại tác động của toàn vi khuẩn lên sự kích thích dây thần kinh mạc treo ruột, các MV này có thể tạo ra tác dụng tăng cường so với toàn vi khuẩn. Phát hiện này thu được nhờ phân tích lượng thời gian từ khi bắt đầu xử lý đến khi đáp ứng đỉnh (khởi phát tác dụng hoàn toàn) khi sử dụng các vi túi phân lập từ *L. reuteri* DSM17938 so với toàn vi khuẩn.

Vật liệu và phương pháp

L. reuteri DSM 17938 được nuôi cấy, thu hoạch và bảo quản như mô tả trong ví dụ 3 trên đây. Việc phân lập và điều chế các vi túi từ *L. reuteri* DSM 17938 được thực hiện theo ví dụ 3 trên đây.

Các bản ghi hình thần kinh mạc treo ruột hồng tràng được thực hiện như đã mô tả trước đó (Perez-Burgos et al. (2013); Perez-Burgos et al. (2015)). Nói ngắn gọn, đoạn hồng tràng dài 3cm của chuột được cắt và gắn lên đĩa petri đã phủ thạch được nạp đầy dung dịch

đệm Krebs oxy hóa và chất chặn kênh canxi kiểu L, nicardipin ($3 \mu\text{M}$). Các chất trong lòng ống của hồng tràng được đẩy ra bằng dung dịch Krebs và các đầu phía miệng và đầu phía hậu môn được đặt ống thông silicon để cho phép dòng xử lý đi qua đoạn hồng tràng. Bó dây thần kinh mạc treo đã được phân tách cẩn thận khỏi đoạn hồng tràng bằng cách dùng kẹp mảnh cạo nhẹ đi phần mạc treo gắn vào. Sau đó, đĩa chứa phần dây thần kinh đã chuẩn bị được gắn trên bàn kính hiển vi và được tưới liên tục dung dịch Krebs oxy hóa, ấm bằng bơm.

Bó dây thần kinh lộ ra được hút lên bằng pipet thủy tinh nhỏ gắn với giá đỡ điện cực kẹp miệng. Hoạt động điện đa đơn vị được ghi lại từ bó dây thần kinh bằng cách sử dụng bộ khuếch đại Multi-Clamp 700B và bộ chuyển đổi tín hiệu Digidata 1440A. Các khoảng thời gian kiểm soát được ghi lại trong 15-30 phút trong quá trình tưới dung dịch Krebs trong lòng ống ruột. *L. reuteri* DSM 17938 hoặc các vi túi trong lòng ống ruột được sử dụng ngay sau khi kiểm soát trong khoảng thời gian 20-30 phút.

Hoạt động điện đa đơn vị được phân tích cho hoạt động một đơn vị bằng cách sử dụng phân tích thành phần nguyên tắc (principle component analysis - PCA) và phân tích dạng sóng đột biến trong chương trình Dataview (Heitler (2007)). Thời gian để đạt được phản ứng cao nhất được đo từ thời điểm bắt đầu xử lý đến khi thấy phản ứng (thay đổi tốc độ kích thích).

Kết quả

Các MV của *L. reuteri* (MV) có thể kích hoạt phản ứng kích thích dây thần kinh nhanh hơn, dẫn đến sự khởi phát tác dụng sớm hơn, so với toàn vi khuẩn (DSM) như được thể hiện trên Fig.10.

Ví dụ 6 - Quy trình nuôi cấy và phân lập

Quy trình chuẩn bị MV điển hình bao gồm các bước sau: nuôi cấy, loại bỏ vi khuẩn nguyên vẹn và phân lập MV từ dịch lọc nuôi cấy, và tùy chọn cô sơ bộ và tinh chế. Việc lựa chọn các phương pháp cụ thể dựa trên nhiều yếu tố, ví dụ, lượng nguyên liệu được xử lý và độ tinh khiết cần thiết theo các ứng dụng tiếp theo.

Các điều kiện nuôi cấy

Các nhà sáng chế đã xác định các thông số nuôi cấy cho các chủng vi khuẩn để tạo ra các MV trị liệu với hiệu quả được cải thiện trong các mô hình ưu tiên về nhu động đường

tiêu hóa và chứng đau ở đường tiêu hóa. *L. reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy bình thường, tức là, được nuôi cấy kỵ khí trong môi trường de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) ở 37°C trong 24 giờ trong chai/bình thốt cổ, có bổ sung 2% sucroza làm yếu tố cảm ứng.

Các điều kiện phân lập

Việc điều chế các MV vi khuẩn bao gồm các bước xác định đã mô tả ở trên gồm nuôi cấy vi khuẩn, sau đó là phân lập MV. Để thu được các phân đoạn MV với số lượng lớn, độ tinh khiết cao và giữ được tác dụng sinh học, dịch nổi vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút (máy ly tâm tốc độ cao Beckman với rôto góc cố định JA-18), tiếp theo là ly tâm lần thứ hai ở $10\,000 \times g$ trong 20 phút và sau đó lọc qua bộ lọc 0,45µm. Các bước đầu tiên này loại bỏ vi khuẩn sống và các mảnh vụn lớn. Sau đó, viên vón được loại bỏ và dịch nổi phía trên chứa các MV được nạp lên đệm sucroza và được ly tâm siêu tốc ở $118\,000 \times g$ ở 4°C trong 20,5 giờ. Cuối cùng, viên vón được rửa và ly tâm ở $118\,000 \times g$, ở 4°C qua đệm để thu được các MV trị liệu ở dạng các viên vón.

Ví dụ 7 - Kích thích miễn dịch bằng các vi túi (MV) thu được từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Trong ví dụ này, đã thể hiện rằng các MV thu được từ dịch nổi không chứa tế bào (cell free supernatant - CFS) của *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 có hoạt tính kích thích miễn dịch và làm giảm interferon gama (IFN-γ), thể hiện rằng các MV ngoại bào thu được từ vi khuẩn trong ruột có thể là các chất điều biến miễn dịch quan trọng ở người.

Vật liệu và phương pháp

Tuyển bố đạo đức và phân lập các tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Các tình nguyện viên là người trưởng thành, giấu tên, khỏe mạnh (18-65 tuổi) được đưa vào nghiên cứu này, đã được Ủy ban Đạo đức Khu vực tại Viện Karolinska, Stockholm, Thụy Điển phê duyệt {Dnr 04-106/1 và 2014/2052-32}. Tất cả các đối tượng nghiên cứu đã đồng ý bằng văn bản. Máu tĩnh mạch được thu gom trong các ống hút chân không đã chứa heparin (BD Biosciences Pharmingen) và được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy tế bào RPMI-1640 có bổ sung 20 mM HEPES (HyClone Laboratories, Inc.). Sau đó, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) được phân lập bằng cách tách gradien Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB). PBMC được

rửa trong RPMI-1640, được tạo huyền phù lại trong môi trường đông lạnh chứa RPMI-1640 40%, huyết thanh bào thai bê 50% và DMSO 10%, được đông lạnh từ từ trong thùng đông lạnh (Mr Frosty, Nalgene Cryo 1° C; Nalge Co.) và được bảo quản trong nitơ lỏng.

Kích thích PBMC *in vitro*

PBMC được làm tan băng, rửa và khả năng sống được đánh giá bằng cách nhuộm xanh Trypan, sau đó đếm bằng kính hiển vi quang học 40×. Tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy tế bào (RPMI-1640 bổ sung HEPES (20 mM), penixilin (100 U/mL), streptomycin (100µg/mL), L-glutamin (2mM) (tất cả của hãng HyClone Laboratories, Inc.) và huyết thanh bào thai bê 10% (Gibco by Life Technologies)) ở nồng độ cuối là 1×10^6 tế bào/mL. Tế bào được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy tế bào đáy phẳng và ủ ở 37°C với môi trường 5% CO₂. Phần dịch nổi không chứa tế bào (CFS) *Staphylococcus aureus* được dùng làm chất kích thích ở 2,5% (thể tích/thể tích), và các MV phân lập từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được bổ sung vào PBMC ở tỷ lệ Mv-với-tế bào là 500:1, 100:1 và 20:1.

Phân lập các vi túi

Các tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy trong môi trường de Man Rogosa Sharpe (Oxoid) trong 24 giờ ở 37°C. Tế bào vi khuẩn được loại bỏ khỏi canh trường nuôi cấy bằng cách ly tâm ở $5.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C và sau đó ly tâm một lần nữa ở $10.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C. Tiếp theo, phần dịch nổi được lọc nhờ sử dụng bộ lọc cỡ lỗ 0,45µm (Millipore). Phần dịch nổi không có tế bào được cô đặc bằng cách sử dụng bộ lọc Amicon Ultra với MwCO 100 kDa, loại bỏ protein và các phân tử khác dưới 100 kDa. Phần dịch nổi phía trên được nạp lên trên đệm sucroza 12% với đệm Tris 50 mM pH 7,2, với tỷ lệ thể tích 5:1, và được ly tâm bằng máy siêu ly tâm coulter Beckman coulter Optima L - 80XP (Beckman coulter, Mỹ) ở $118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ. Phần dịch nổi phía trên được loại bỏ, tạo huyền phù lại viên vón trong dung dịch đệm PBS và ly tâm siêu tốc lần thứ hai ($118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ). Sau đó, viên vón được hòa tan trong PBS, chia phần phân ước và bảo quản ở -70°C.

Quy trình thử nghiệm

Các MV phân lập từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được bổ sung vào PBMC ở tỷ lệ Mv-trên-tế bào là 500:1, 100:1 và 20:1 và được ủ trong 48 giờ. Các dịch nổi dịch nuôi cấy tế bào được thu gom và phân tích về sự cảm ứng các xytokin bằng phương pháp ELISA.

ELISA

Các mức tiết của các xytokin IL-1ra (R&D Systems-BioTechne), IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A và IFN- γ (MabTech AB) được đo trong các dịch nổi dịch nuôi cấy tế bào bằng kit ELISA bán kẹp theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 405nm bằng thiết bị đọc vi đĩa (Molecular Devices Corp.) và phân tích kết quả bằng phần mềm SoftMax Pro 5.2 rev C (Molecular Devices Corp.).

Thống kê

Tất cả các kiểm định thống kê được thực hiện bằng phần mềm GraphPad Prism (GraphPad Software). Toàn bộ dữ liệu được coi là phi tham số theo đó sử dụng phép đa so sánh của Dunn hoặc kiểm định t Mann-Whitney. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa khi $p < 0,05$ và các mức ý nghĩa sau được sử dụng $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Kết quả

Các MV của *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 gây cảm ứng một cách rõ ràng sự sản sinh cả IL-6 và IL-10 theo cách phụ thuộc nồng độ, trong khi không phát hiện thấy sự cảm ứng IFN- γ hoặc IL-17A (Fig.11A). Hơn nữa, việc bổ sung các MV phân lập vào PBMC được kích thích bởi *S. aureus* làm giảm đáng kể sự tiết IFN- γ và IL-17A ở mức tương tự như phần đoạn MV cao (Fig.11B).

Ví dụ 8 - Các vi túi (MV) thu được từ *Lactobacillus reuteri* bảo vệ tính nguyên vẹn của hàng rào biểu mô trước tác dụng gây tổn thương của *Escherichia coli* sinh độc tố ruột.

Vật liệu và phương pháp

Phân lập các vi túi (MV) ngoại bào

Tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy trong môi trường Man-Rogosa-Sharpe, thu gom sau 24 giờ và được loại bỏ khỏi canh trường nuôi cấy bằng cách ly tâm ở $5.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C và sau đó ly tâm ở $10.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C , sau đó các tế bào còn lại được loại bỏ khỏi dịch nổi bằng cách lọc bằng bộ lọc cỡ lỗ $0,45\mu\text{m}$. Các dịch nổi được cô đặc bằng bộ siêu lọc Amicon (100 kDa), loại bỏ các

protein và các phân tử khác dưới 100 kDa. Các dịch nổi được ly tâm bằng máy siêu ly tâm Beckman coulter Optima L – 80XP (Beckman coulter, Mỹ) ở $118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ. Loại bỏ phần dịch nổi, tạo huyền phù lại viên vón trong dung dịch đệm PBS và siêu ly tâm lại lần hai ($118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ). Sau đó, viên vón được hòa tan trong PBS, chia phần phân ước và bảo quản ở -70°C .

Khả năng thấm của ruột *in vitro* (đồng nuôi cấy tế bào Caco-2/HT29)

Nuôi cấy tế bào biểu mô (Caco-2/HT29)

Tế bào Caco-2 và HT29 được nuôi cấy riêng trong các bình nuôi cấy mô trong môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò, 1% axit amin không thiết yếu, và 1% penixilin và streptomycin, ở 37°C trong môi trường 5% CO_2 với độ ẩm tương đối 90%. Tế bào Caco-2 và HT29 được nuôi cấy trong các bình nuôi cấy mô 25cm^2 và phân tách ở mức hợp lưu 80–90% bằng cách sử dụng 0,25% trypsin và 0,02% axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA). Tế bào được cấy ở mật độ 6×10^4 tế bào cho mỗi bình 25-cm^2 .

Đồng nuôi cấy tế bào

Tế bào Caco-2 và HT29 được cấy trên ngăn đỉnh của các đĩa chèn Transwell (màng lọc được phủ collagen Transwell-COL) với tỷ lệ 9:1 và được nuôi trong các đĩa Transwell 12 giếng với mật độ cuối là 1×10^5 tế bào/ cm^2 trong mỗi đĩa chèn. Các tế bào được duy trì trong cùng các điều kiện và được để sinh trưởng trong 21 ngày với môi trường (0,5mL ở cạnh đỉnh và 1,5mL ở cạnh đáy) thay đổi mỗi ngày để cho phép các tế bào biệt hóa.

Tính toàn vẹn của lớp tế bào

Tính toàn vẹn của lớp tế bào được xác định bằng hai phương pháp: Điện trở xuyên biểu mô (transepithelial electrical resistance - TEER) và xác định khả năng thấm fluorescein isothiocyanat-dextran (FITC-dextran).

Tính toàn vẹn của lớp đơn tế bào trong các thử nghiệm được xác định bằng phép đo điện trở xuyên biểu mô (TEER) nhờ sử dụng hệ thống điện trở Millicell (Millipore, Darmstadt, Đức). Ba khu vực khác nhau được chọn để phát hiện các giá trị TEER trong mỗi giếng và các giá trị trung bình là kết quả cuối cùng. Các giá trị TEER cao hơn $250\Omega\text{cm}^2$ được dùng cho các nghiên cứu về khả năng thấm.

Tế bào Caco-2/HT29 đã cấy được xử lý trước bằng tế bào *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 sống ở 100 số bội của vi khuẩn (multiplicity of bacteria - MOB) hoặc các vi túi ngoại bào (MV) từ tế bào *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 ở 200 số bội của MV trong 6 giờ trước khi thử thách với ETEC (*E. coli* sinh độc tố ruột gây bệnh, được biết đến là có tác động phá vỡ tính toàn vẹn của biểu mô) ở 100 số bội của nhiễm trùng (multiplicity of infection - MOI) trong 6 giờ nữa. TEER được đo trước khi xử lý trước và thử thách với ETEC, sau đó là đo mỗi giờ thứ hai trong toàn bộ thử thách. Để định lượng khả năng thấm qua khe giữa các tế bào của lớp đơn, 1mg/mL fluorescein isothiocyanat-dextran (FITC-dextran; Sigma) 4kDa được thêm vào mặt đỉnh của các đĩa chèn khi bắt đầu thử thách với ETEC. Các mẫu từ ngăn đáy bên được lấy sau 6 giờ ủ. Chất truy vết huỳnh quang khuếch tán sau đó được phân tích ba lần bằng quang phổ huỳnh quang (kích thích, 485 nm; phát xạ, 520 nm) sử dụng thiết bị đọc FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Đức).

Kết quả

Thử thách với ETEC gây giảm TEER. Cả các MV thu được từ *L. reuteri* và tế bào vi khuẩn phần nào có thể bảo vệ lớp đơn biểu mô trước thử thách này (Fig.12). 6 giờ sau thử thách ETEC, sự giảm TEER đối với nhóm ETEC đạt 35%, và việc xử lý trước với tế bào vi khuẩn *L.reuteri* và MV đều cho thấy TEER cao hơn đáng kể so với nhóm được xử lý bằng ETEC.

Hiệu quả bảo vệ của các MV thu được từ *L. reuteri* và tế bào vi khuẩn chống lại tổn thương do ETEC đối với lớp đơn cũng xuất hiện trong các thử nghiệm dòng FITC-dextran (Fig.12). Việc xử lý trước các lớp đơn bằng các MV thu được từ *L. reuteri* và tế bào vi khuẩn làm giảm sự rò rỉ FITC-dextran so với nhóm ETEC.

Do đó, cả các MV thu được từ *L. reuteri* và tế bào vi khuẩn đều thể hiện hiệu quả bảo vệ tổn thương do ETEC gây ra cho các lớp đơn đồng nuôi cấy Caco-2/HT29.

Ví dụ 9 - Thay đổi hoạt tính enzym liên quan đến sự sản sinh MV

Lactobacillus reuteri DSM 17938 và *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 được nuôi cấy và đưa vào một số xử lý sinh học gây cảm ứng. Đáp ứng, liên quan đến những thay đổi trong quá trình sản sinh MV, đối với các xử lý gây cảm ứng này được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm enzym và so sánh với đáp ứng thu được đối với các đối chứng, tức là

nuôi cấy vi khuẩn mà không có các xử lý gây cảm ứng. Sau đó, hoạt tính enzym được đo trong môi trường điều hòa vi khuẩn.

Vật liệu và phương pháp

Nuôi cấy và xử lý sinh học

L. reuteri DSM 17938 hoặc *L. reuteri* DSM 32846 được nuôi cấy từ chủng gốc trữ đông trong 25 mL môi trường de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) trong các điều kiện nuôi cấy bình thường, tức là, nuôi cấy kỵ khí ở 37°C qua đêm. Sau đó, vi khuẩn (40mL) được nuôi cấy lại trong 400 mL SIM cùng với dịch nổi (4%) từ mẻ nuôi cấy vi khuẩn khác hoặc bằng cách bổ sung các tế bào vi khuẩn khác (25%, được rửa và tạo huyền phù trong PBS) và sau đó được nuôi cấy trong 48 giờ nữa. Các mẫu vi khuẩn được nghiên cứu được tổng hợp trong bảng dưới đây.

Bảng 3 - Tổng hợp các mẫu vi khuẩn và các xử lý

Chủng vi khuẩn sản sinh MV	Xử lý sinh học
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	- (đối chứng)
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	4% dịch nổi của <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC BAA-999
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	4% dịch nổi của <i>Bifidobacterium longum</i> DSM 32947
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	4% dịch nổi của <i>Lactobacillus paracasei</i> LMG-P-17806
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	25% tế bào của <i>Bifidobacterium longum</i> DSM 32947
<i>L. reuteri</i> DSM 32846	- (đối chứng)
<i>L. reuteri</i> DSM 32846	4% dịch nổi của <i>Bifidobacterium longum</i> DSM 32947

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 và *Lactobacillus paracasei* LMG-P-17806 là các chủng vi khuẩn có bán sẵn trên thị trường và đã được nộp lưu lần lượt tại Bảo tàng giống chuẩn Mỹ - ATCC (American Type Culture Collection) và Phòng thử nghiệm Vi sinh vật học, Bảo tàng Vi sinh vật phối hợp của Bỉ (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms).

Thiết lập thử nghiệm liên quan đến các chủng vi khuẩn probiotic và các xử lý sinh học khác nhau và được thiết kế để bắt chước tình huống thực tế được mở rộng trong các cơ sở sản xuất hoặc bắt chước tình huống trong đường tiêu hóa của con người. 4% dịch nổi

của các xử lý sinh học trong quá trình nuôi cấy được lựa chọn làm nồng độ thích hợp đủ để có thể có tác dụng nhưng mặt khác không được thêm quá nhiều do có nguy cơ có các thành phần từ vi khuẩn gây cảm ứng sinh học dưới dạng một phần của sản phẩm cuối cùng. Nồng độ cao hơn, 25%, của các tế bào của xử lý sinh học được chọn để bắt chước hiệu ứng xảy ra cục bộ trong đường tiêu hóa của con người nếu hai (hoặc nhiều) chủng vi khuẩn được sử dụng cùng nhau dưới dạng một chế phẩm kết hợp.

Lấy mẫu

Các mẫu vi khuẩn được ly tâm lần đầu ở 5000 x g trong 10 phút, sau đó dịch nổi được chuyển sang ống mới và sau đó ly tâm lần hai ở 10.000 x g trong 10 phút để loại bỏ tế bào vi khuẩn và các mảnh vỡ tế bào vi khuẩn. Các dịch nổi chứa các MV này được lọc qua bộ lọc 0,45 μm , và giữ trên nước đá trước khi ly tâm tiếp theo bằng máy siêu ly tâm ở 32000 vòng/phút ở 4°C trong 3 giờ (Beckman SW 32 Ti Rotô, thùng lắc, ống 30 mL). Loại bỏ dịch nổi (hút nhẹ nhàng ra bằng pipet). Các viên vón chứa MV được tạo huyền phù một cách cẩn thận trong môi trường tạo huyền phù lại (nuôi muối đệm phosphat - PBS)) và ly tâm lại ở 32.000 vòng/phút ở 4°C, rửa sạch tàn dư của môi trường nuôi cấy. Thể tích tạo huyền phù lại thay đổi, trong khoảng từ 100 - 300 μL , tùy thuộc vào kích thước viên vón. Các mẫu được chia thành các phần phân ước và bảo quản ở -70°C.

Hoạt tính enzym

Hoạt tính enzym 5'-nucleotidaza được sử dụng như một thước đo để định lượng những thay đổi về số lượng và/hoặc hiệu lực của các MV được tạo ra bởi các phương pháp xử lý sinh học gây cảm ứng khác nhau. Các mẫu thu được từ các xử lý sinh học gây cảm ứng ở trên được làm tan băng và sau đó được kiểm tra trong thử nghiệm hoạt tính 5'-nucleotidaza bằng kit xét nghiệm Crystal Chem 5'-Nucleotidase (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, Hoa Kỳ). Nói ngắn gọn, quy trình được thực hiện trong hai bước. Đầu tiên, chất phản ứng 1 (CC1) chứa AMP được bổ sung vào các mẫu dịch nổi để chuyển hóa AMP thành adenosin nhờ enzym 5'-nucleotidaza bất kỳ có mặt trong các mẫu dịch nổi. Adenosin được thủy phân tiếp thành inosin và hypoxanthin bởi các thành phần trong chất phản ứng 1. Trong bước thứ hai, chất phản ứng 2 (CC2) được bổ sung vào để chuyển hóa hypoxanthin thành axit uric và hydro peroxit, chất này được sử dụng để tạo ra thuốc nhuộm quinon được đo động học ở 550nm trong máy đo quang phổ. Hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các mẫu

được xác định bằng cách tính toán sự thay đổi về độ hấp thụ giữa 3 và 5 phút và so sánh với giá trị từ mẫu của bộ định chuẩn.

Kết quả

Fig.13 thể hiện hoạt tính 5'-nucleotidaza trong các mẫu MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 (đối với các mẫu đối chứng và xử lý). Như có thể thấy được từ hình vẽ, hoạt tính 5'-nucleotidaza tăng ở các mẫu thu được từ mề nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 có bổ sung 4% dịch nổi từ *B. longum* ATCC BAA-999 hoặc *B. longum* DSM 32947 trong môi trường SIM (DSM 17938 + 4% dịch nổi DSM 32947 hoặc DSM 17938 + 4% dịch nổi ATCC BAA-999) so với *L. reuteri* DSM 17938 trong SIM (đối chứng) hoặc *L. reuteri* DSM 17938 với 4% dịch nổi từ *L. paracasei* LMG-P-17806 (DSM 17938 trong SIM hoặc DSM 17938 + 4% dịch nổi LMG-P-17806). Hiệu quả của xử lý sinh học gây cảm ứng lên hoạt tính 5'-nucleotidaza là rõ rệt nhất khi *L. reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy với dịch nổi từ *B. longum* DSM 32947, nhưng cũng thu được hiệu quả với dịch nổi từ *B. longum* ATCC BAA-999. Điểm mật độ quang (OD) từ mỗi mẫu chứng minh rằng số lượng tế bào tương đối không bị thay đổi đáng kể giữa các xử lý.

Các kết quả được trình bày trên Fig.14 là giống như được trình bày trên Fig.13 nhưng đã được chuẩn hóa liên quan đến hoạt tính 5'-nucleotidaza và mật độ quang của DSM 17938 trong SIM, giúp dễ dàng so sánh sự thay đổi ở mức số lần về hoạt tính 5'-nucleotidaza giữa các thử nghiệm khác nhau.

Các kết quả trên Fig.15 (được chuẩn hóa), minh họa thêm rằng hoạt tính 5'-nucleotidaza được tăng lên sau xử lý sinh học gây cảm ứng so với các mẫu đối chứng (tức là, DSM 17938 trong SIM) bằng cách đồng nuôi cấy *L. reuteri* DSM 17938 với 25% tế bào từ *B. longum* DSM 32947 trong môi trường SIM. Điểm OD từ các mẫu này minh họa sự khác nhau tương đối về số lượng tế bào thu được bằng các xử lý sinh học khác nhau (tức là điểm tăng ở các mẫu xử lý sinh học gây cảm ứng do tổng số lượng tế bào vi khuẩn cao hơn).

Fig.16 minh họa các giá trị hoạt tính 5'-nucleotidaza được chuẩn hóa trong các mẫu đối chứng và được xử lý bằng cách sử dụng *L. reuteri* DSM 32846. Như có thể được thấy từ đồ thị, hoạt tính enzym tăng lên nhờ nuôi cấy *L. reuteri* DSM 32846 có bổ sung 4% dịch nổi từ *B. longum* DSM 32947 trong môi trường (DSM 32846 + 4% dịch nổi DSM 32947)

so với đối chứng *L. reuteri* DSM 32846 trong SIM (DSM 32846 trong SIM). Các điểm OD từ các mẫu này minh họa sự khác nhau tương đối về số lượng tế bào thu được bằng các xử lý sinh học khác nhau này.

Ví dụ 10 – Cải thiện tác dụng đối kháng của *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 đối với tín hiệu đau qua trung gian TrpV1 sau khi đồng nuôi cấy với *Bifidobacterium longum* DSM 32947 hoặc *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

Hiệu quả của các xử lý sinh học lên sự sản sinh MV bởi *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được thử nghiệm trong mô hình kích thích trường điện *in vitro* (Electric Field Stimulation - EFS) sử dụng các neuron biểu hiện TrpV1 thu được từ các hạch rễ ở lưng chuột (dorsal root ganglia - DRG) và nền tảng Celectricon Cellaxess Elektra. *L. reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy trong 48 giờ để làm đối chứng trong môi trường mô phỏng ruột (SIM đối chứng DSM 17938 48 giờ), hoặc sử dụng xử lý sinh học gây cảm ứng gồm đồng nuôi cấy với 25% tế bào vi khuẩn của một trong hai chủng *Bifidobacterium longum* strains DSM 32947 hoặc ATCC BAA-999 trong SIM trong 48 giờ. (Công thức môi trường có thể được tìm thấy trong ví dụ 1). Các MV được phân lập từ các chế phẩm vi khuẩn khác nhau theo ví dụ 6. Các tế bào thần kinh DRG nguyên thủy của chuột được nuôi cấy trong 48 giờ trong các đĩa 384 giếng cùng với yếu tố tăng trưởng thần kinh (nerve growth factor - NGF) để mô phỏng sự làm nhạy cảm ngoại vi. Sau đó, tác dụng đối kháng của các chế phẩm MV thu được đối với sự hoạt hóa TrpV1 do capsaixin gây ra đã được đánh giá. Vào ngày thử nghiệm, các mẫu cấy DRG được nhuộm bằng chất chỉ thị Ca^{2+} (Ca5; không có bộ sàng lọc rửa) để có thể chụp ảnh khoảnh khắc canxi được kích hoạt bởi capsaixin, một chất chủ vận TrpV1 đặc hiệu. Đầu tiên, EC_{50} của capsaixin được xác định trong các thử nghiệm EFS riêng biệt và nồng độ này sau đó được thêm vào tất cả các mẫu cấy DRG để cảm ứng sự kích hoạt TrpV1. Sau đó, tác động của các chế phẩm MV đối với sự hoạt hóa TrpV1 được đánh giá ở định dạng đáp ứng liều (sáu nồng độ được thử nghiệm làm ba lần trong mỗi đĩa) với nồng độ ban đầu là 1:10 của nồng độ gốc MV ban đầu và sử dụng các bước pha loãng 1:3. Các mẫu cấy DRG được ủ với các chế phẩm MV trong 1 giờ trước khi chạy thử nghiệm EFS. Các đĩa được đặt trên bàn máy Cellaxess và một loạt các giao thức EFS đã được áp dụng. Các giao thức EFS này bao gồm các chuỗi xung để bắt giữ những thay đổi về tính dễ bị kích thích xảy ra trong các mẫu nuôi cấy DRG do ủ với các chế phẩm MV. Sau đó, tác động của các chế phẩm MV đối với sự hoạt hóa TrpV1 do capsaixin gây ra được phân

tích và các giá trị EC_{50} được xác định cho mỗi chế phẩm (EC_{50} thường được mô tả là một nửa nồng độ hiệu quả tối đa và đề cập đến nồng độ của một chất gây ra đáp ứng nửa giữa mức cơ sở và tối đa sau một thời gian tiếp xúc quy định). Ở đây EC_{50} biểu thị % nồng độ gốc của MV tách được từ 400mL dịch nuôi cấy vi khuẩn). Thử nghiệm được thực hiện hai lần và giá trị EC_{50} trung bình được tính toán. Giá trị EC_{50} của thử nghiệm đối chứng là 7,4, trong khi các giá trị EC_{50} cho cả hai xử lý sinh học gây cảm ứng đều thấp hơn nhiều (1,8 đối với DSM 17938 + DSM 32947; 2,7 đối với DSM 17938 + ATCC BAA-999). Các kết quả này thể hiện rằng các xử lý sinh học gây cảm ứng làm tăng hiệu quả đối kháng của chế phẩm lên sự truyền tín hiệu TrpV1, tức là, cần một lượng chế phẩm MV được gây cảm ứng thấp hơn để ức chế sự truyền tín hiệu TrpV1 do capsaixin gây ra so với chế phẩm MV đối chứng. Một khía cạnh quan trọng đề cập ở đây là đối chứng (DSM 17938 SIM 48 giờ) đã thể hiện trước đó hiệu quả ức chế lên sự truyền tín hiệu TrpV1 (xem ví dụ 4) và do đó có thể được xem là đối chứng dương. Tóm lại, bằng cách cho vi khuẩn trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy theo sáng chế, vi khuẩn được gây cảm ứng để sản sinh các MV trị liệu. Điều này đã cải thiện hiệu quả ức chế/ngăn chặn đối với sự kích hoạt TrpV1 do capsaixin gây ra.

Bảng 4 - Giá trị EC_{50} của vi khuẩn đối với sự ức chế TrpV1

Xử lý	Trị số EC_{50} của vi khuẩn đối với sự ức chế TrpV1
Đối chứng: DSM 17938 SIM 48 giờ	7,4
Xử lý gây cảm ứng 1: DSM 17938 + DSM 32947 48 giờ	1,8
Xử lý gây cảm ứng 2: DSM 17938 + ATCC BAA-999 48 giờ	2,7

Trị số EC_{50} được thể hiện dưới dạng % của nồng độ gốc của MV được tách từ 400mL dịch nuôi cấy vi khuẩn lỏng và tác dụng đối kháng gia tăng của các chế phẩm MV từ DSM 17938 lên TrpV1 trong đáp ứng với xử lý sinh học gây cảm ứng.

Ví dụ 11 - Các thay đổi trong điều biến miễn dịch là kết quả của các xử lý sinh học trong quá trình nuôi cấy

Trong ví dụ này, đã thể hiện rằng các MV thu được từ dịch nổi không chứa tế bào (CFS) của *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 có tác dụng điều biến miễn dịch mạnh hơn

(tăng IL-6) so với các MV thu được từ dịch nổi không chứa tế bào (CFS) của *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Cũng được thể hiện rằng hiệu quả điều biến miễn dịch của các MV thu được từ dịch nổi không chứa tế bào (CFS) từ *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 hoặc *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được cải thiện sau khi xử lý sinh học trong quá trình nuôi cấy.

Vật liệu và phương pháp

Tuyên bố đạo đức và phân lập các tế bào đơn nhân máu ngoại vi

Các tình nguyện viên là người trưởng thành, giấu tên, khỏe mạnh (18-65 tuổi) được đưa vào nghiên cứu này, đã được Ủy ban Đạo đức Khu vực tại Viện Karolinska, Stockholm, Thụy Điển phê duyệt {Dnr 04-106/1 và 2014/2052-32}. Tất cả các đối tượng nghiên cứu đã đồng ý bằng văn bản. Máu tĩnh mạch được thu gom trong các ống hút chân không đã chứa heparin (BD Biosciences Pharmingen) và được pha loãng bằng môi trường nuôi cấy tế bào RPMI-1640 có bổ sung 20 mM HEPES (HyClone Laboratories, Inc.). Sau đó, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) được phân lập bằng cách tách gradien Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB). PBMC được rửa trong RPMI-1640, được tạo huyền phù lại trong môi trường đông lạnh chứa RPMI-1640 40%, huyết thanh bào thai bê 50% và DMSO 10%, được đông lạnh từ từ trong thùng đông lạnh (Mr Frosty, Nalgene Cryo 1° C; Nalge Co.) và được bảo quản trong nitơ lỏng.

Kích thích PBMC *in vitro*

PBMC được làm tan băng, rửa và khả năng sống được đánh giá bằng cách nhuộm xanh Trypan, sau đó đếm bằng kính hiển vi quang học 40×. Tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy tế bào (RPMI-1640 bổ sung HEPES (20 mM), penixilin (100 U/mL), streptomycin (100µg/mL), L-glutamin (2mM) (tất cả của hãng HyClone Laboratories, Inc.) và huyết thanh bào thai bê 10% (Gibco by Life Technologies)) ở nồng độ cuối là 1×10^6 tế bào/mL. Tế bào được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy tế bào đáy phẳng và ủ ở 37°C với môi trường 5% CO₂. Các MV phân lập từ các chế phẩm vi khuẩn khác nhau như mô tả chi tiết hơn dưới đây được thêm vào PBMC ở tỷ lệ Mv-so với-tế bào là 500:1.

Phân lập các vi túi

Tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 hoặc DSM 32846 được nuôi cấy trong SIM (môi trường ruột mô phỏng, công thức được mô tả trong ví dụ 1) trong 48 giờ ở

37°C. Đối với các thử nghiệm trong đó các xử lý sinh học khác nhau được nghiên cứu, tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 hoặc DSM 32846 được nuôi cấy với sự có mặt của các dịch nổi từ *Bifidobacterium longum* DSM 32947 hoặc *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 được nuôi cấy riêng trong SIM trong 48 giờ ở 37°C. Ngoài ra, tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 được nuôi cấy với sự có mặt của 25% tế bào vi khuẩn từ *Bifidobacterium longum* DSM 32947.

Tế bào vi khuẩn được loại ra khỏi canh trường nuôi cấy bằng cách ly tâm ở $5.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C và sau đó ly tâm lần nữa ở $10.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C. Sau đó, các dịch nổi được lọc bằng bộ lọc cỡ lỗ 0,45µm (Millipore). Phần dịch nổi không có tế bào được cô đặc bằng cách sử dụng bộ lọc Amicon Ultra với MwCO 100 kDa, loại bỏ protein và các phân tử khác dưới 100 kDa. Các dịch nổi được ly tâm bằng máy siêu ly tâm Beckman coulter Optima L - 80XP (Beckman coulter, Mỹ) ở $118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ. Loại bỏ phần dịch nổi, tạo huyền phù lại viên vón trong dung dịch đệm PBS và siêu ly tâm lần hai ($118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ). Sau đó, viên vón được hòa tan trong Neurobasal A + chất bổ sung B27 + Glutamax, chia phần phân ước và bảo quản ở -70°C.

Quy trình thử nghiệm

Các MV phân lập từ các chế phẩm vi khuẩn khác nhau mô tả trên đây được bổ sung vào PBMC ở tỷ lệ Mv-so với-tế bào là 500:1 và được ủ trong 48 giờ. Các dịch nổi dịch nuôi cấy tế bào được thu gom và phân tích về sự cảm ứng các xytokin bằng phương pháp ELISA.

ELISA

Các mức xytokin IL-6 tiết ra được đo trong các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng kit ELISA bán kẹp theo hướng dẫn của nhà sản xuất (MabTech AB). Đo độ hấp thụ ở bước sóng 405nm bằng thiết bị đọc vi đĩa (Molecular Devices Corp.) và phân tích kết quả bằng phần mềm SoftMax Pro 5.2 rev C (Molecular Devices Corp.).

Kết quả

Các vi túi từ *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 có hiệu quả hơn trong việc cảm ứng sản sinh IL-6 so với các vi túi phân lập từ *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (Fig.17). Hơn nữa, các MV phân lập từ cả hai chủng *Lactobacillus reuteri* sau khi đồng nuôi cấy với chủng *Bifidobacterium longum* (cả 4% dịch nổi và 25% tế bào) làm tăng sự sản sinh IL-6

được cảm ứng so với các đối chứng (các Fig. 18, 19 và 20). Các kết quả này thể hiện rằng các MV phân lập có hiệu quả hơn sau khi xử lý sinh học trong quá trình nuôi cấy.

Ví dụ 12 - Các vi túi (MV) thu được từ *Lactobacillus reuteri* bảo vệ tính nguyên vẹn của hàng rào biểu mô trước tác dụng gây hại của *Escherichia coli* sinh độc tố ruột.

Vật liệu và phương pháp

Phân lập các vi túi (MV) ngoại bào

Tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 hoặc *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 được nuôi cấy trong môi trường Man-Rogosa-Sharpe, thu hoạch sau 24 giờ và được loại bỏ khỏi canh trường nuôi cấy bằng cách ly tâm ở $5.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C và sau đó ly tâm ở $10.000 \times g$ trong 10 phút ở 4°C , sau đó các tế bào còn lại được loại bỏ khỏi dịch nổi bằng cách lọc bằng bộ lọc cỡ lỗ $0,45\mu\text{m}$. Các dịch nổi được cô bằng bộ siêu lọc Amicon (100 kDa), loại bỏ các protein và các phân tử khác dưới 100 kDa. Các dịch nổi được ly tâm bằng máy siêu ly tâm Beckman coulter Optima L – 80XP (Beckman coulter, Mỹ) ở $118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ. Loại bỏ phần dịch nổi, tạo huyền phù lại viên vón trong dung dịch đệm PBS và siêu ly tâm lại lần hai ($118.000 \times g$ ở 4°C trong 3 giờ). Sau đó, viên vón được hòa tan trong PBS, chia phần phân ước và bảo quản ở -70°C .

Khả năng thấm của ruột *in vitro* (đồng nuôi cấy tế bào Caco-2/HT29)

Nuôi cấy tế bào biểu mô (Caco-2/HT29)

Tế bào biểu mô Caco-2 và HT29 được nuôi cấy riêng trong các bình nuôi cấy mô trong môi trường Eagle được cải biến của Dulbecco (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò, 1% axit amin không thiết yếu, và 1% penixilin và streptomycin, ở 37°C trong môi trường 5% CO_2 với độ ẩm tương đối 90%. Tế bào Caco-2 và HT29 được nuôi cấy trong các bình nuôi cấy mô 25cm^2 và phân tách ở mức hợp lưu 80–90% bằng cách sử dụng 0,25% trypsin và 0,02% axit etylendiamintetraaxetic (EDTA). Tế bào được cấy ở mật độ 6×10^4 tế bào cho mỗi bình 25-cm^2 .

Đồng nuôi cấy tế bào

Tế bào Caco-2 và HT29 được cấy trên ngăn đỉnh của các đĩa chèn Transwell (màng lọc được phủ collagen Transwell-COL) với tỷ lệ 9:1 và được nuôi trong các đĩa Transwell 12 giếng với mật độ cuối là 1×10^5 tế bào/ cm^2 trong mỗi đĩa chèn. Các tế bào được duy trì

trong cùng các điều kiện và được để sinh trưởng trong 21 ngày với môi trường (0,5mL ở cạnh đỉnh và 1,5mL ở cạnh đáy) thay đổi mỗi ngày để cho phép các tế bào biệt hóa.

Tính toàn vẹn của lớp tế bào

Tính toàn vẹn của lớp tế bào được xác định bằng hai phương pháp: Điện trở xuyên biểu mô (transepithelial electrical resistance - TEER) và xác định khả năng thẩm fluorescein isothiocyanat-dextran (FITC-dextran).

Tính toàn vẹn của lớp đơn tế bào trong các thử nghiệm được xác định bằng phép đo điện trở xuyên biểu mô (TEER) nhờ sử dụng hệ thống điện trở Millicell (Millipore, Darmstadt, Đức). Ba khu vực khác nhau được chọn để phát hiện các giá trị TEER trong mỗi giếng và các giá trị trung bình là kết quả cuối cùng. Các giá trị TEER cao hơn 250Ω cm² được dùng cho các nghiên cứu về khả năng thẩm.

Tế bào Caco-2/HT29 đã cấy được xử lý trước bằng tế bào *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 hoặc *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 sống ở 100 số bội của vi khuẩn (multiplicity of bacteria - MOB) hoặc các vi túi ngoại bào (MV) từ tế bào *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 hoặc *Lactobacillus reuteri* DSM 32846 ở 200 số bội của MV trong 6 giờ trước khi thử thách với ETEC (*E. coli* sinh độc tố ruột gây bệnh, được biết đến là có tác động phá vỡ tính toàn vẹn của biểu mô) ở 100 số bội của nhiễm trùng (multiplicity of infection - MOI) trong 6 giờ nữa. TEER được đo trước khi xử lý trước và thử thách với ETEC, sau đó là đo mỗi giờ thứ hai trong toàn bộ thử thách. Để định lượng khả năng thẩm qua khe giữa các tế bào của lớp đơn, 1mg/mL fluorescein isothiocyanat-dextran (FITC-dextran; Sigma) 4kDa được thêm vào mặt đỉnh của các đĩa chèn khi bắt đầu thử thách với ETEC. Các mẫu từ ngăn đáy bên được lấy sau 6 giờ ủ. Chất truy vết huỳnh quang khuếch tán sau đó được phân tích ba lần bằng quang phổ huỳnh quang (kích thích, 485 nm; phát xạ, 520 nm) sử dụng thiết bị đọc FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Đức).

Kết quả

Thử thách với ETEC gây ra sự giảm TEER chứng tỏ rằng các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 đã phần nào có thể bảo vệ lớp đơn biểu mô trước thử thách này (Fig.21). Ở thời điểm 6 giờ sau thử thách ETEC, sự giảm TEER đối với nhóm ETEC đạt 27%, trong khi việc xử lý trước với MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 ở 10, 50, 100

và 200 MOM cho thấy TEER cao hơn đáng kể so với nhóm được xử lý bằng ETEC. Tế bào không được xử lý vẫn còn khoảng 90%.

Hiệu quả bảo vệ này của các MV thu được từ *L. Reuteri* DSM 32846 chống lại tổn thương do ETEC đối với lớp đơn cũng xuất hiện trong các thử nghiệm dòng FITC-dextran (Fig.21). Xử lý trước các lớp đơn bằng các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 ở 10, 50, 100 và 200 MOM làm giảm sự rò rỉ FITC-dextran so với nhóm ETEC.

Do đó, các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 thể hiện hiệu quả bảo vệ tổn thương do ETEC gây ra đối với các lớp đơn đồng nuôi cấy Caco-2/HT29.

Trên Fig.22, so sánh giữa hiệu quả bảo vệ của các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 như được thể hiện trong thử nghiệm dòng FITC-dextran được so sánh với hiệu quả nhận được bởi các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938. Xử lý trước các lớp đơn tế bào biểu mô bằng các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 làm giảm sự rò rỉ FITC-dextran một cách hiệu quả hơn, cụ thể là ở các nồng độ MV thấp hơn, so với các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938. Điều này thể hiện rằng các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 32846 có hiệu quả hơn các MV thu được từ *L. reuteri* DSM 17938 trong việc bảo vệ tính nguyên vẹn của hàng rào biểu mô.

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abusleme, L. et al. IL-17; overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis.* 23(7): 854-865 (2017).
- Bindels, L. et al. Increased gut permeability in cancer cachexia: mechanisms and clinical relevance. *Oncoraget.* Vol. 9, (No.26), pp:18224-18238, (2018).
- DiRienzo, J. Breaking the Gingival Epithelial Barrier: Role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin in Oral Infectious Disease. *Cells.* 3, 476-499, (2014).
- Funauchi, M. et al. Serum level of interferon-gamma in autoimmune diseases, *Tohoku J Exp Med.* 164(4): 259-267 (1991).
- Gu, Z. W. et al. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response. *Oncoraget.* Vol. 8, (No.14), pp:22361-22369, (2017).
- Heitler, W. J. DataView: A Tutorial Tool for Data Analysis. Template-based Spike Sorting and Frequency Analysis. *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* 6, A1-7 (2007).
- Klonowska, J. et al. New Cytokines in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis – New Therapeutic Targets. *Int. J. Mol Sci.* 19, 3086 (2018).
- Koga, C. et al. Possible Pathogenic Role of Th17 Cells for Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 128, 2625-2630, (2008).
- Lee, Youngkyun. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. *BMB Reports.* 46 (1): 479-483 (2013).
- Perez-Burgos, A. et al. Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304, G211–G220 (2013).
- Perez-Burgos, A. et al. Transient receptor potential vanilloid 1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic *L. reuteri* DSM 17938. *J. Physiol.* 17, n/a-n/a (2015).
- Pollard, K. M et al. Interferon- γ and systemic autoimmunity, *Discov. Med.* 16(87),

123-131 (2013).

Tachibana, K. et al. IL-17 and VEGF are increased and correlated to systemic inflammation, immune suppression, and malnutrition in patients with breast cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. Vol. 15(3) 219-228, (2017).

Wang, Y-H. et al. The cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 20(6): 697-702, (2008).

Wu, R. Y. et al. Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for *Lactobacillus reuteri* and *ramnosus* strains. *Neurogastroenterol. Motil*. 25, e205–e214 (2013).

Zbikowska-Gotz, M. et al. Expression of IL17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. Vol. 29(1) 90-98, (2015).

Zhang, J. et al. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis. *Gynecological Endocrinology*, 31:3, 183-190 (2015).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất vi túi trị liệu, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic trong môi trường nuôi cấy, trong đó chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này; và

cho vi khuẩn này trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh các vi túi trị liệu bởi vi khuẩn, trong đó xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp của các xử lý này, trong đó chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và trong đó chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc cho vi khuẩn trải qua xử lý bao gồm việc cho vi khuẩn trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu và giải phóng vi túi trị liệu này vào môi trường nuôi cấy, và tùy ý phân lập vi túi trị liệu từ môi trường nuôi cấy.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, còn bao gồm việc cho vi khuẩn trải qua xử lý phi sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn, trong đó xử lý phi sinh học gây cảm ứng tốt hơn là xử lý bằng oxy, tốt hơn là bằng cách khuấy trộn vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy và/hoặc sục khí.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium longum*, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm *B. longum* DSM 32947, *B. longum* DSM 32948 và hỗn hợp của các chủng này.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chủng vi khuẩn probiotic là chủng *Lactobacillus reuteri*, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 32846, và hỗn hợp của các chủng này.

6. Chủng vi khuẩn, trong đó chủng vi khuẩn này là *Bifidobacterium longum* DSM 32947 hoặc *Bifidobacterium longum* DSM 32948, tốt hơn là ở dạng sấy khô hoặc dạng khô lạnh.

7. Chế phẩm probiotic gồm:

vi khuẩn là chủng *Lactobacillus*, tốt hơn là chủng *L. reuteri*, và tốt hơn nữa là chủng *L. reuteri* được chọn từ nhóm bao gồm *L. reuteri* DSM 17938, *L. reuteri* DSM 32846 và hỗn hợp của các chủng này; và

vi khuẩn là chủng *Bifidobacterium longum* được chọn từ nhóm bao gồm *B. longum* DSM 32947, *B. longum* DSM 32948 và hỗn hợp của các chủng này, hoặc môi trường điều hòa từ chủng *B. longum*.

8. Chế phẩm probiotic gồm vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic và vi túi trị liệu được tạo ra bởi chủng vi khuẩn probiotic này hoặc bởi chủng vi khuẩn probiotic khác bằng cách cho vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic hoặc chủng vi khuẩn probiotic khác trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn, trong đó

chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic khác được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này;

xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và sự kết hợp các xử lý này;

chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium*; và

chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic và chủng vi khuẩn probiotic khác.

9. Chế phẩm probiotic theo điểm 8, trong đó chế phẩm probiotic bao gồm:

thành phần tác động chậm ở dạng vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic; và

thành phần tác động nhanh ở dạng vi túi trị liệu được tạo ra bởi vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic hoặc bởi chủng vi khuẩn probiotic khác bằng cách cho vi khuẩn này trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn, trong đó thành phần tác động nhanh và thành phần tác động chậm cùng nhau tạo ra hiệu quả điều trị kéo dài khi được dùng cho đối tượng.

10. Vi túi trị liệu phân lập được từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn probiotic được cho trải qua xử lý sinh học gây cảm ứng trong quá trình nuôi cấy để cảm ứng sản sinh vi túi trị liệu bởi vi khuẩn, trong đó

chủng vi khuẩn probiotic được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus*, chủng *Bifidobacterium*, và hỗn hợp của các chủng này;

xử lý sinh học gây cảm ứng được chọn từ nhóm bao gồm đồng nuôi cấy vi khuẩn này với vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác, nuôi cấy vi khuẩn với sự có mặt của môi trường điều hòa từ vi khuẩn là chủng vi khuẩn khác và hỗn hợp của các chủng này và

chủng vi khuẩn khác là chủng *Bifidobacterium* và trong đó chủng vi khuẩn khác là khác với chủng vi khuẩn probiotic.

Thử nghiệm 5'-nucleotidaza

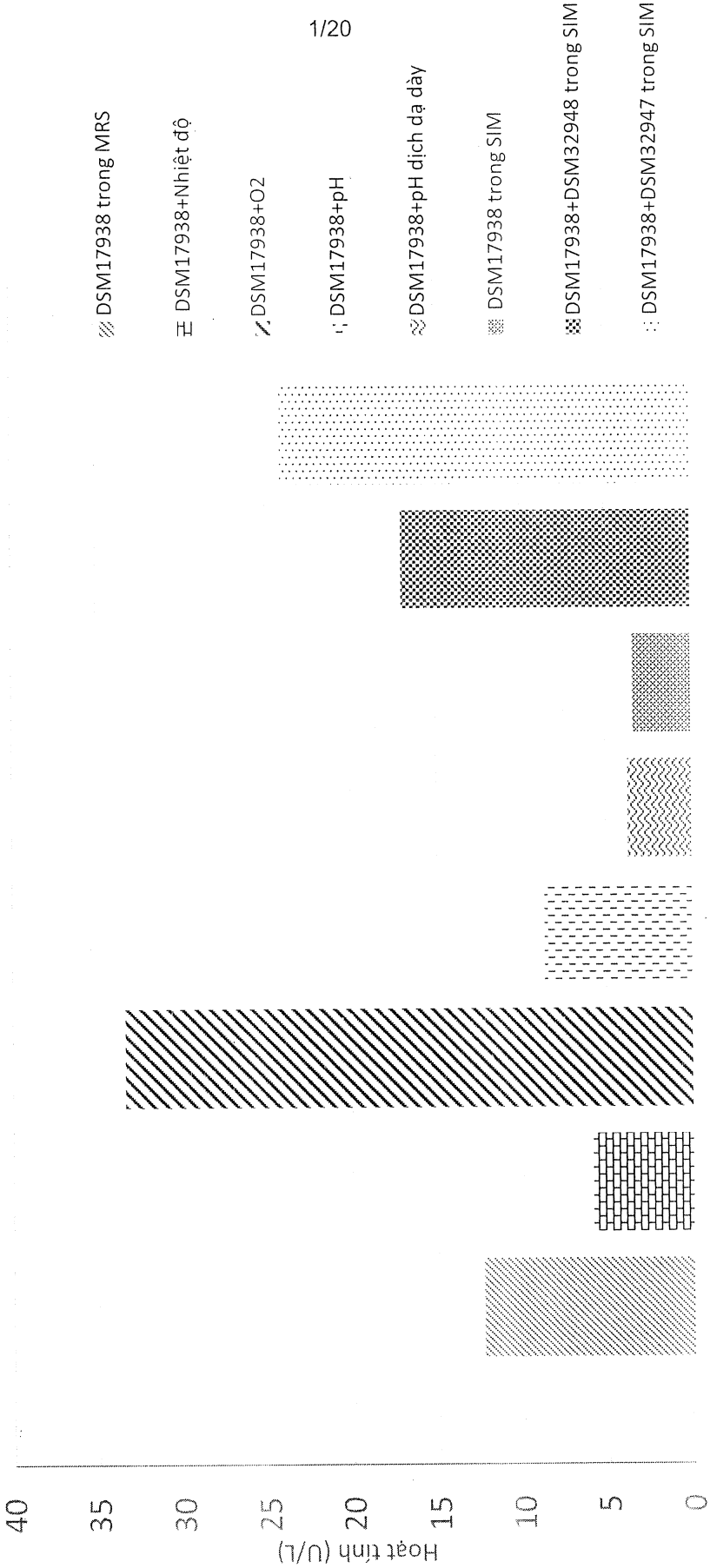


Fig. 1

2/20

Hồng trạng

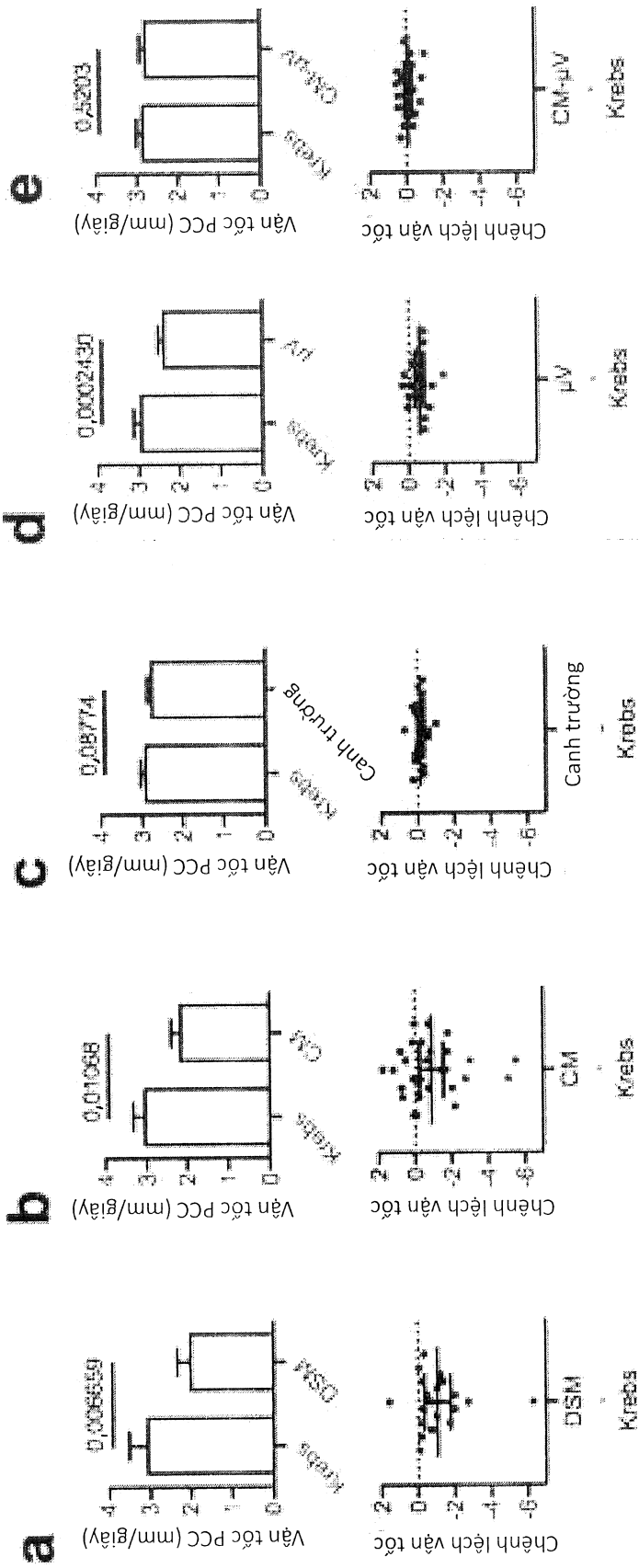


Fig. 2

3/20

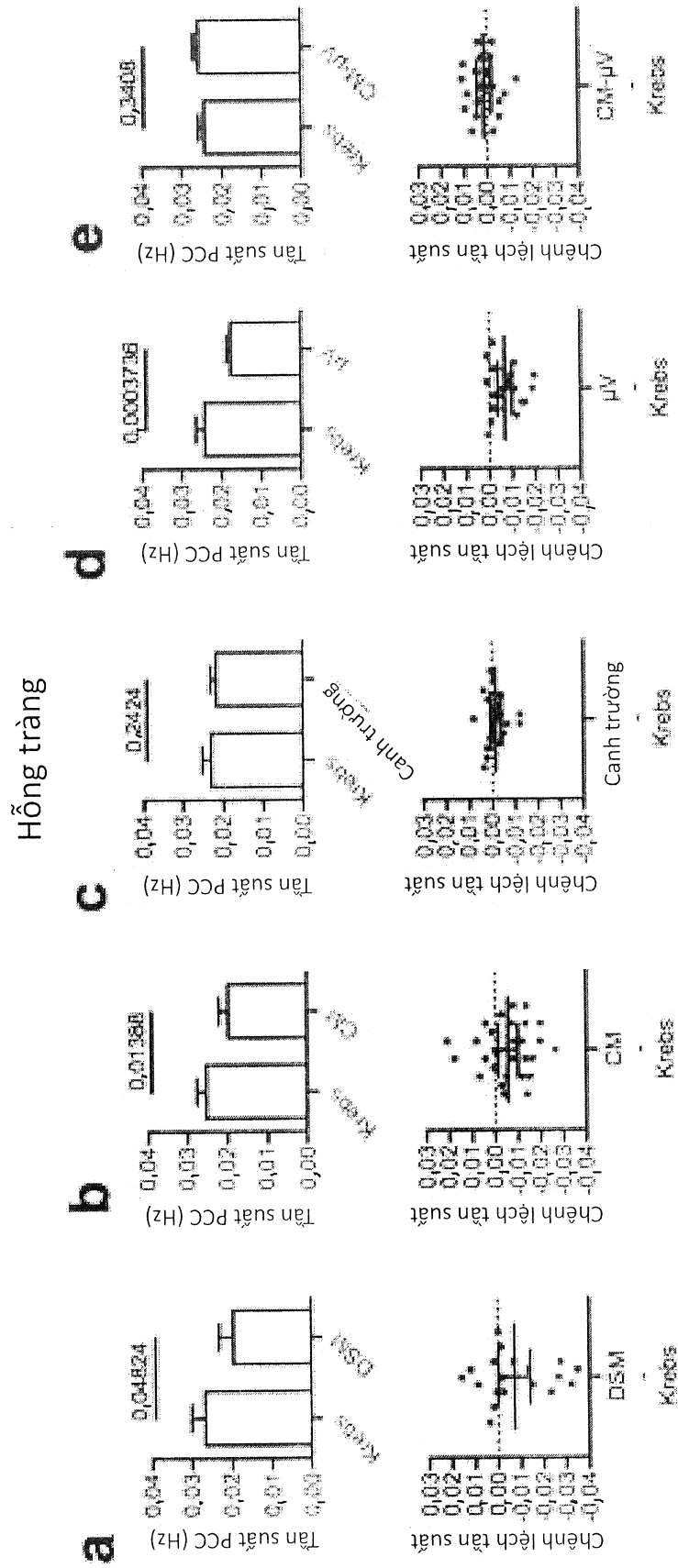


Fig. 3

4/20

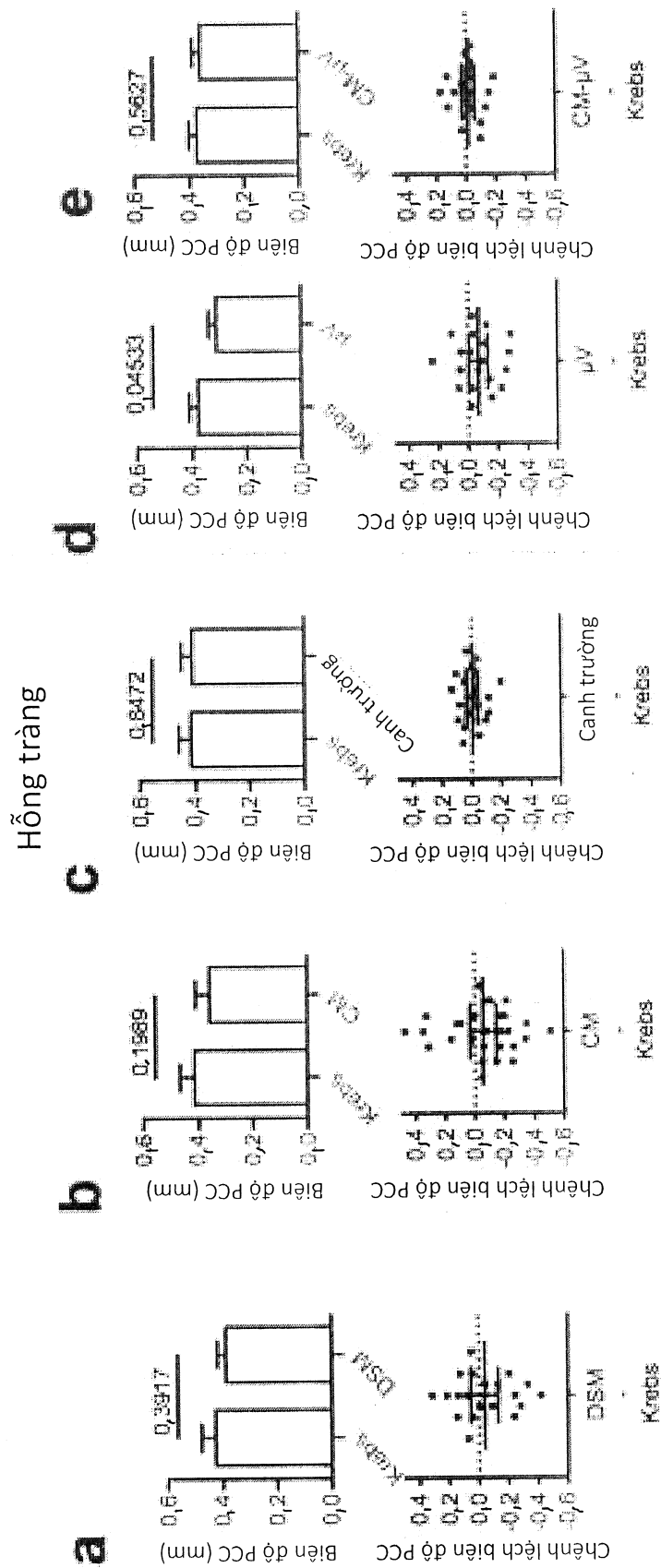


Fig. 4

5/20

Kết tràng

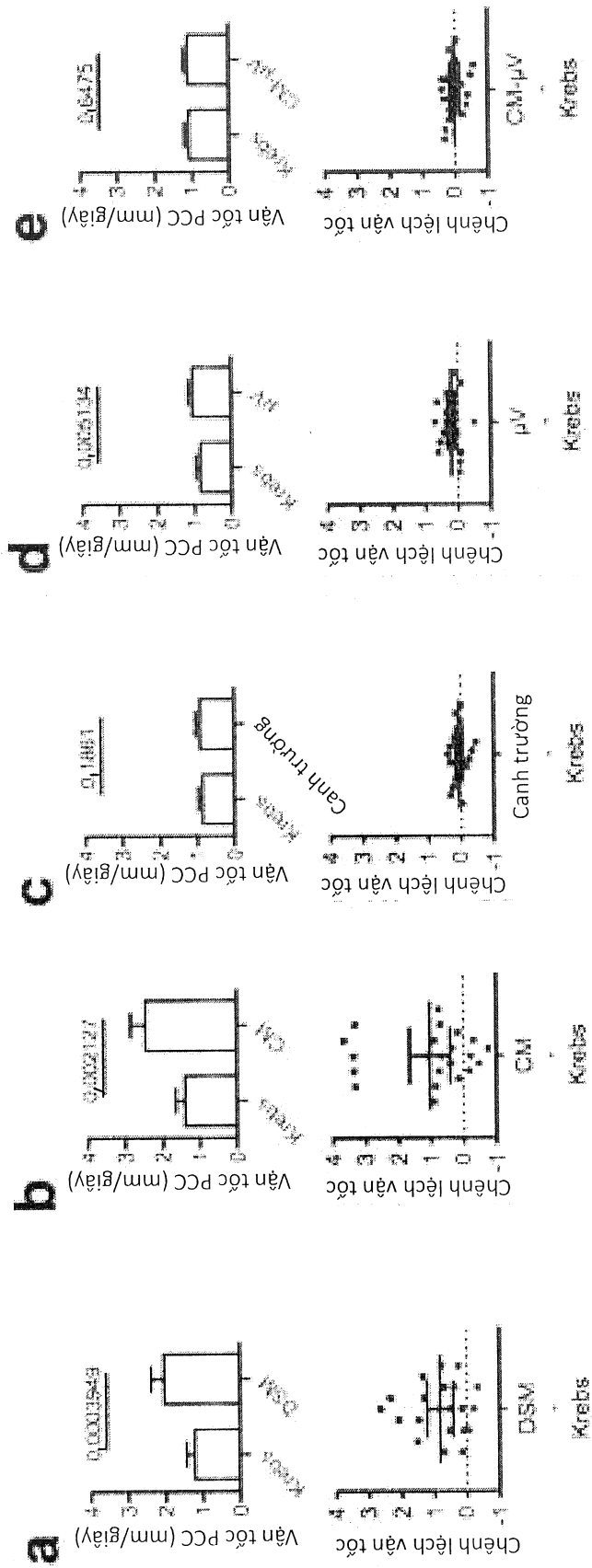


Fig. 5

6/20

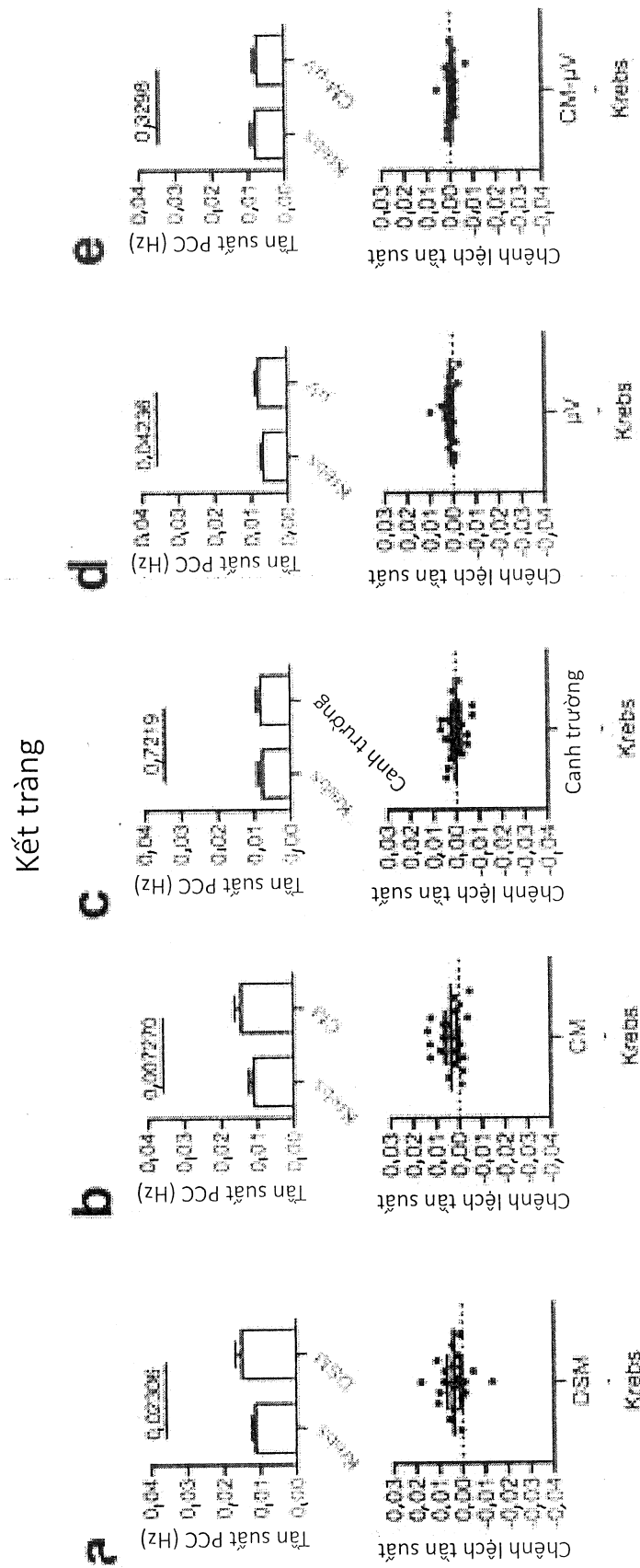


Fig. 6

7/20

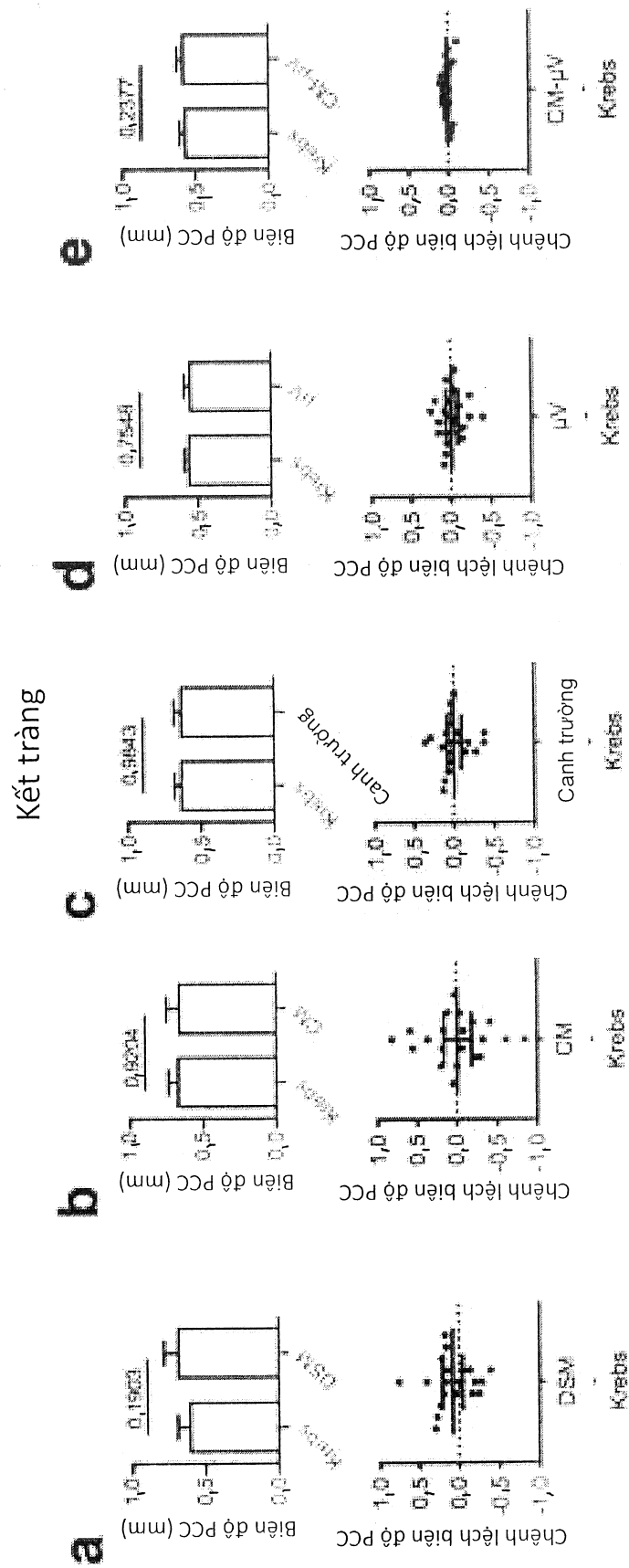


Fig. 7

8/20

Hồng trạng	DSM	CM	Canh trường	μV	CM - μV
Vận tốc	↓↓	↓↓	↓	↓↓	-
Tần số	↓↓	-	↓	↓↓	-
Biên độ đỉnh	↓	↓	-	↓	-

Kết trạng	DSM	CM	Canh trường	μV	CM - μV
Vận tốc	↑↑	↑↑	-	↑	-
Tần số	↑↑	↑↑	-	↑	-
Biên độ đỉnh	↑	-	-	-	-

Fig. 8

9/20

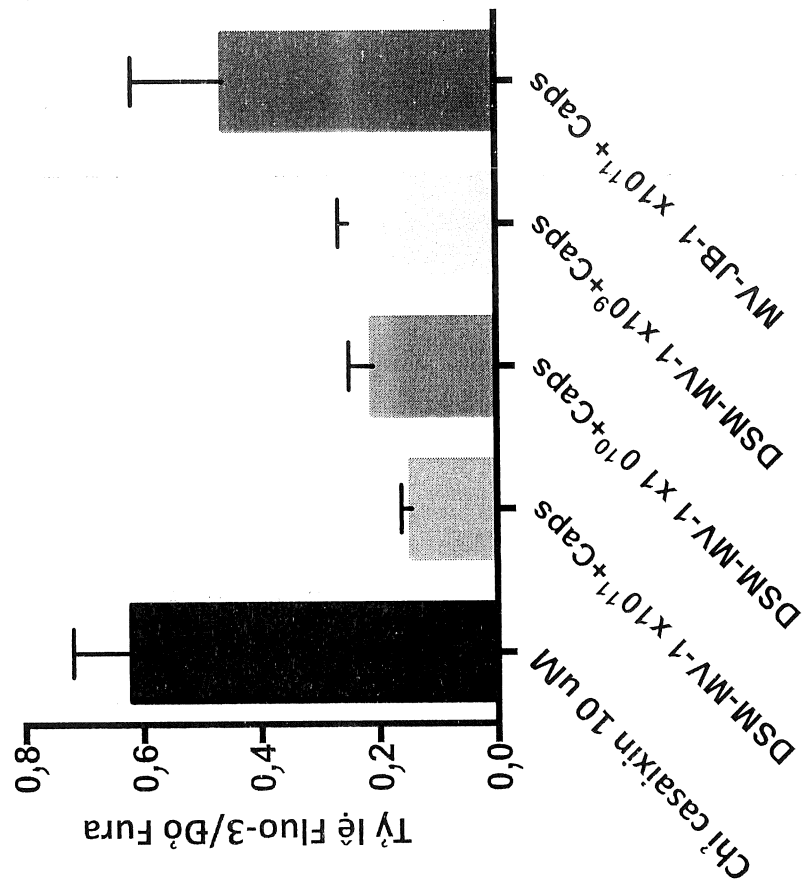


Fig. 9

10/20

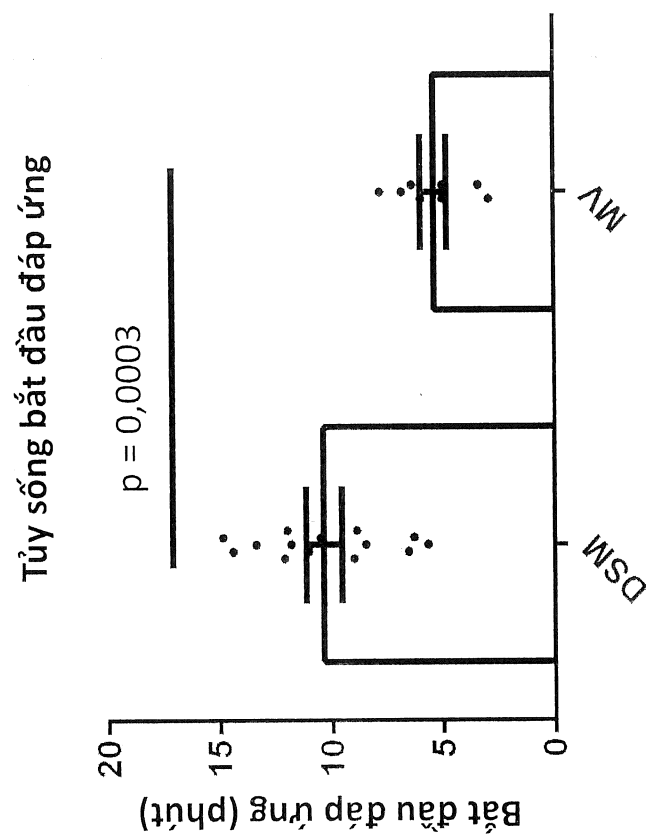
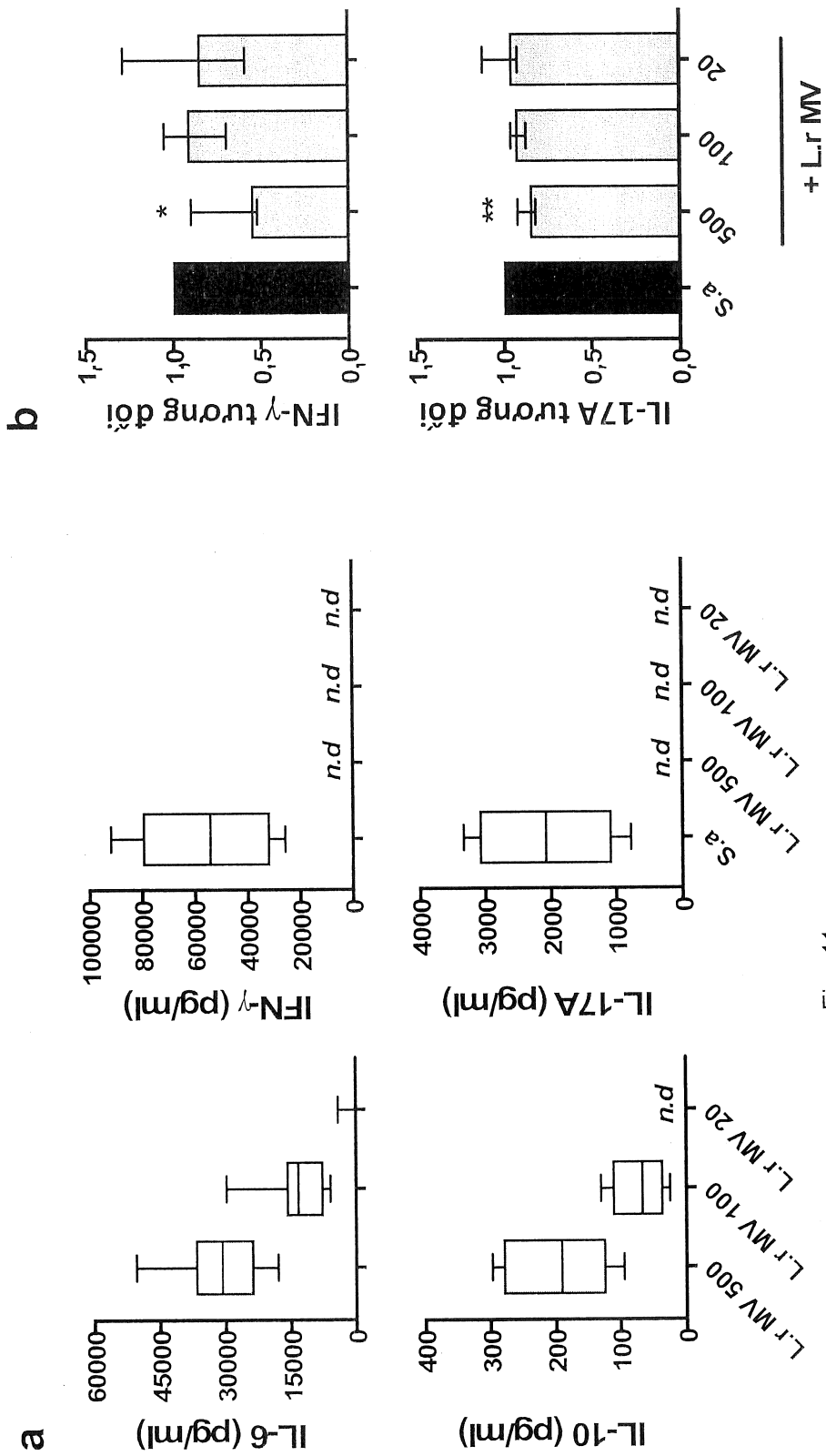


Fig. 10

11/20



12/20

Đồng nuôi cấy Caco-2/HT29

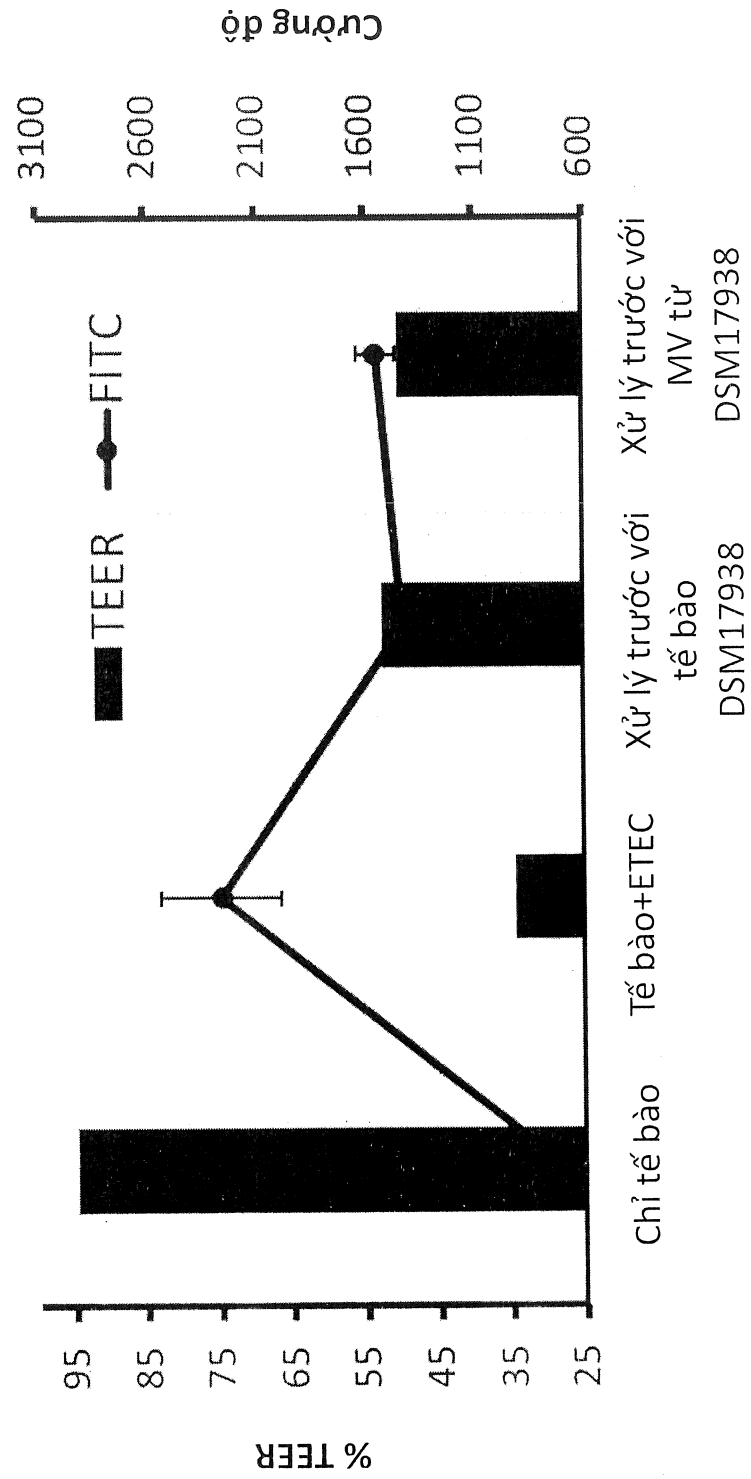


Fig. 12

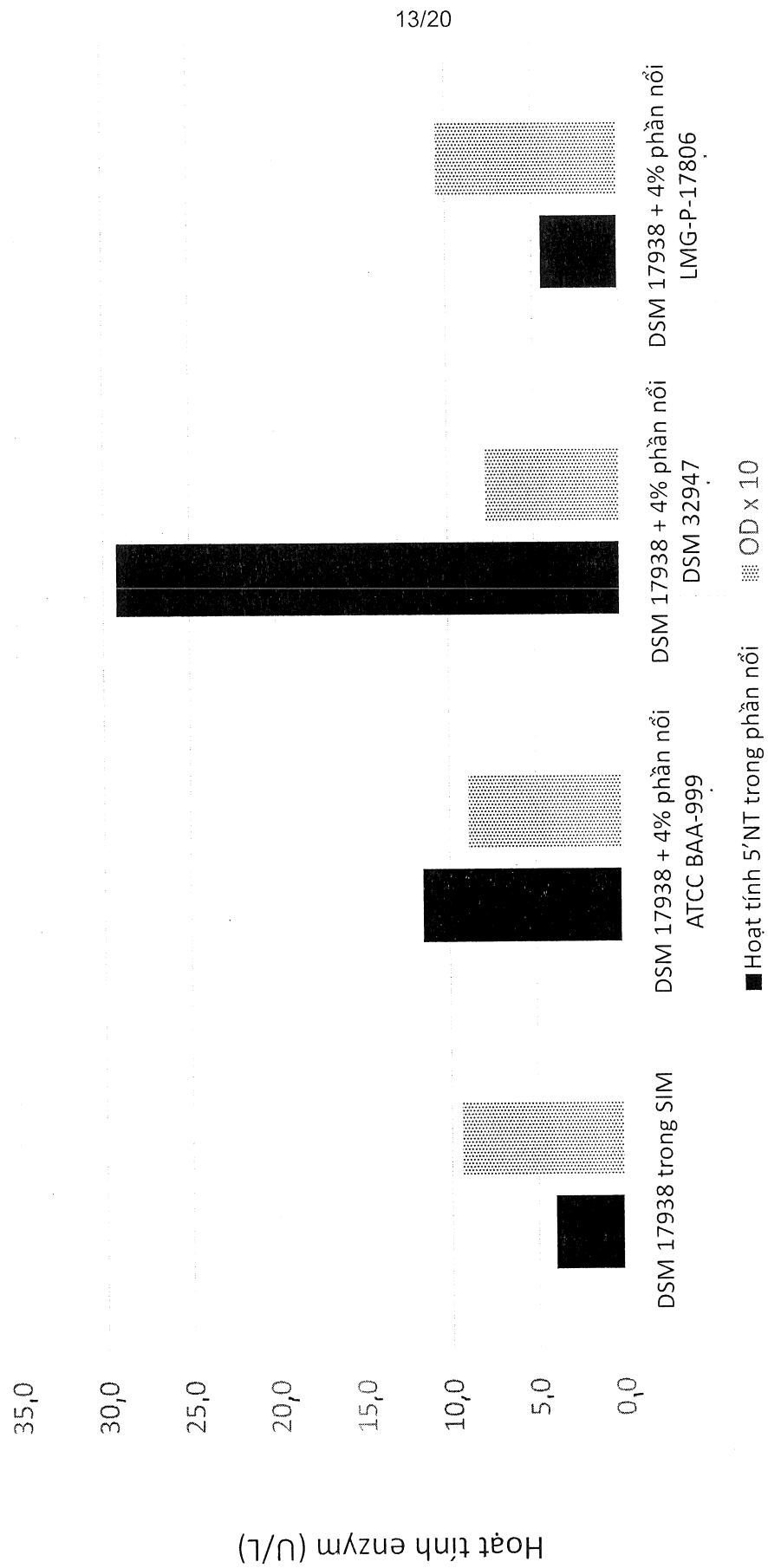


Fig. 13

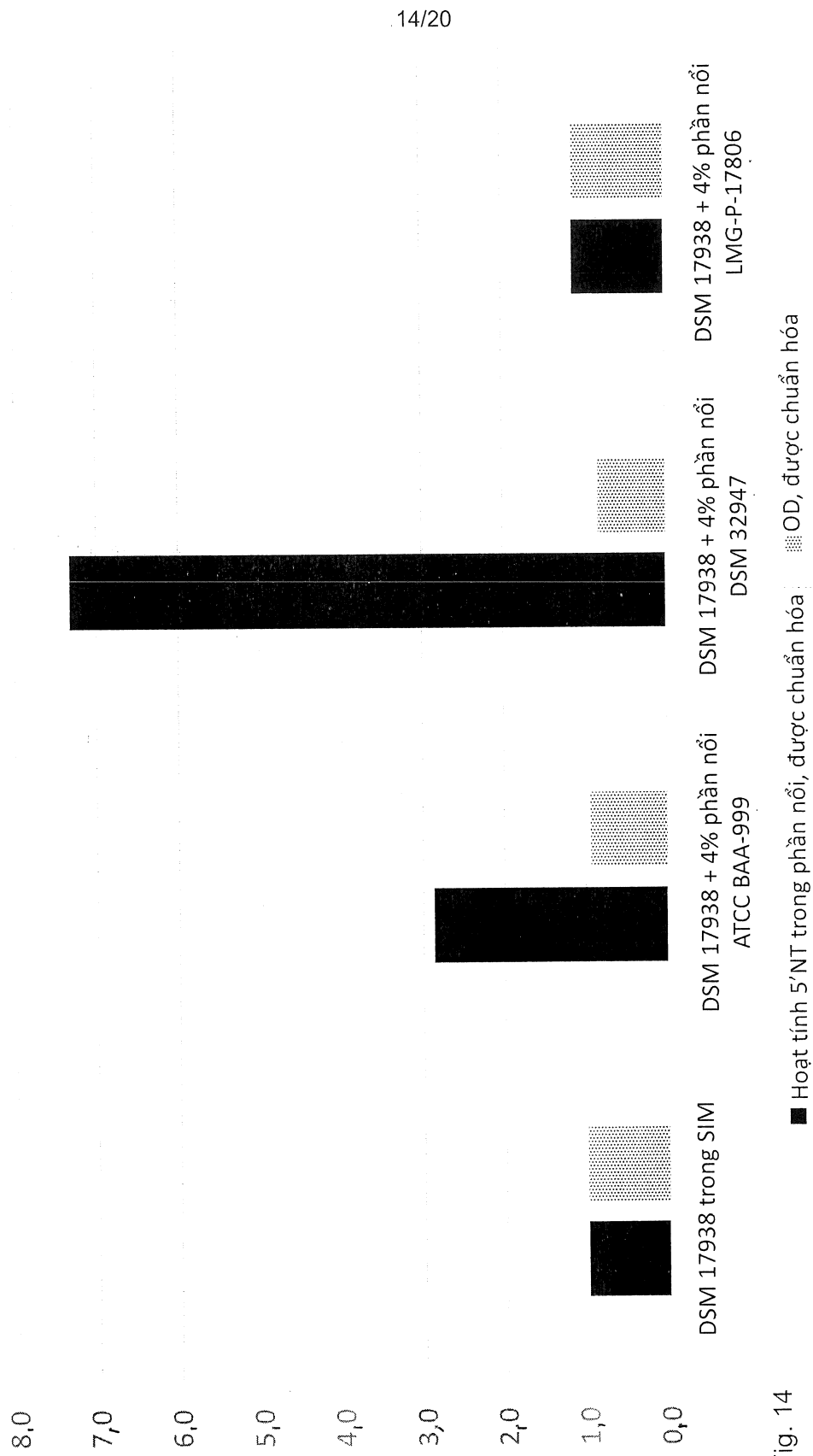


Fig. 14

15/20

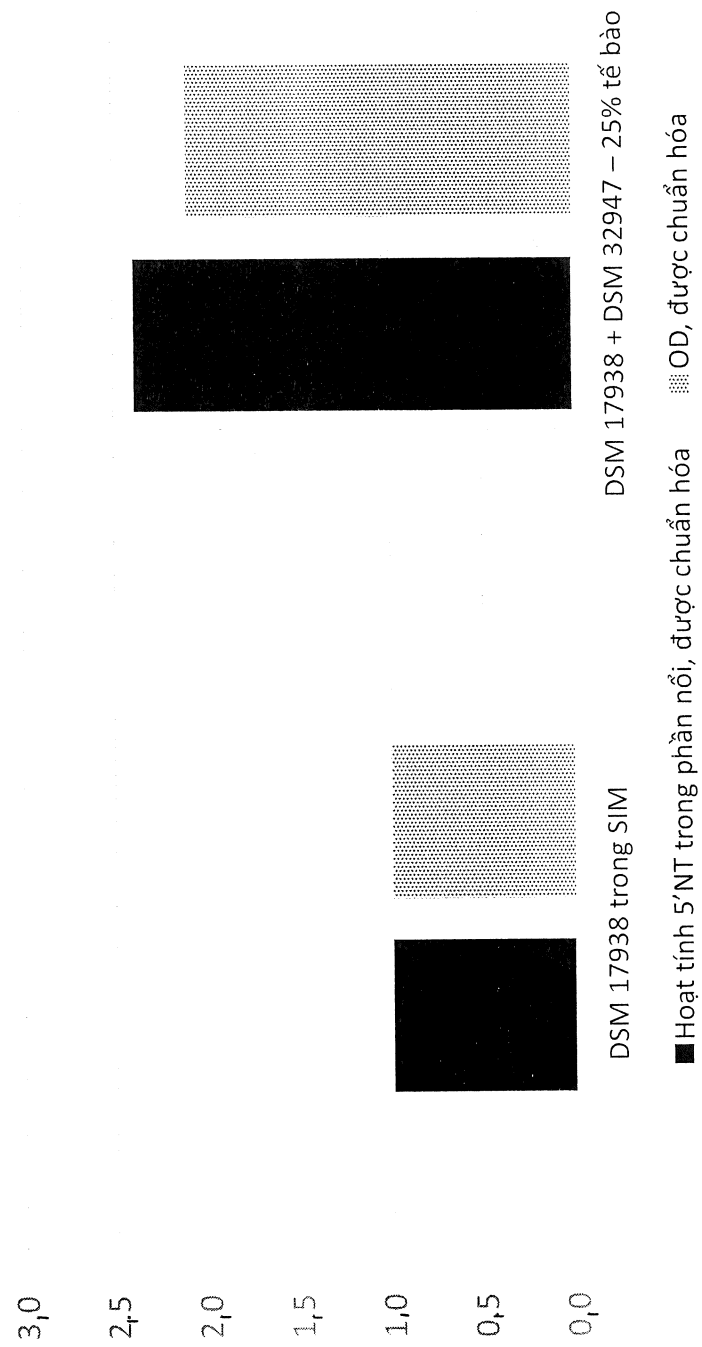


Fig. 15

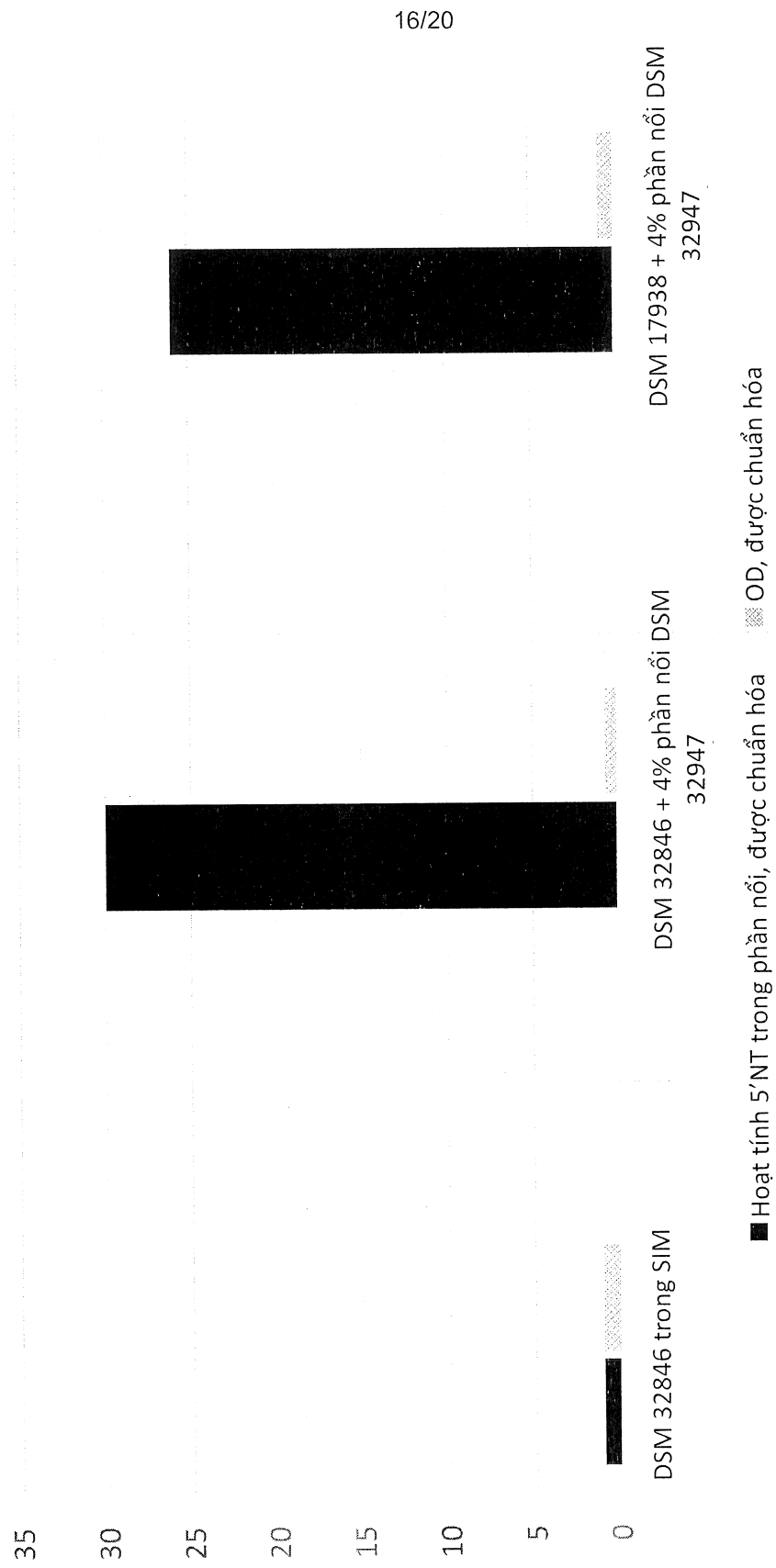


Fig. 16

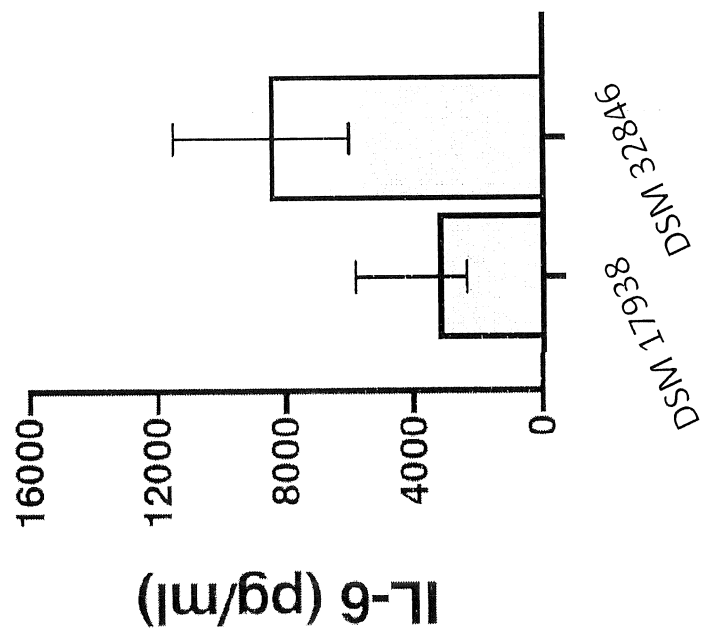


Fig. 17

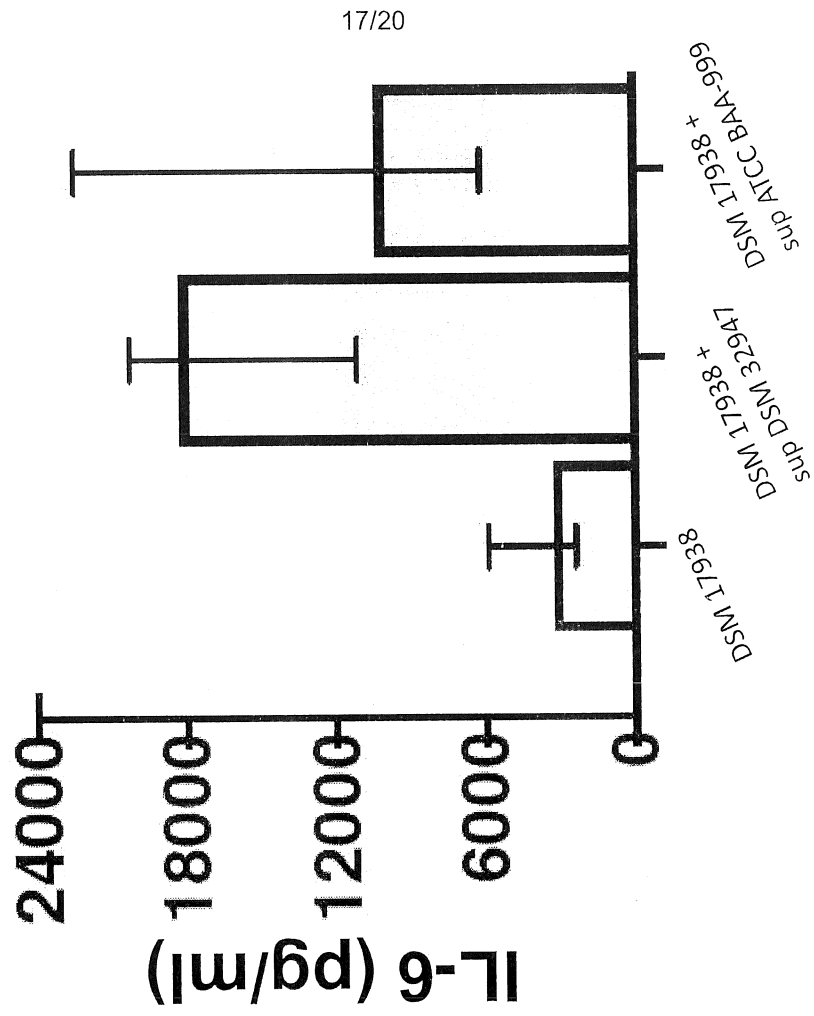


Fig. 18

18/20

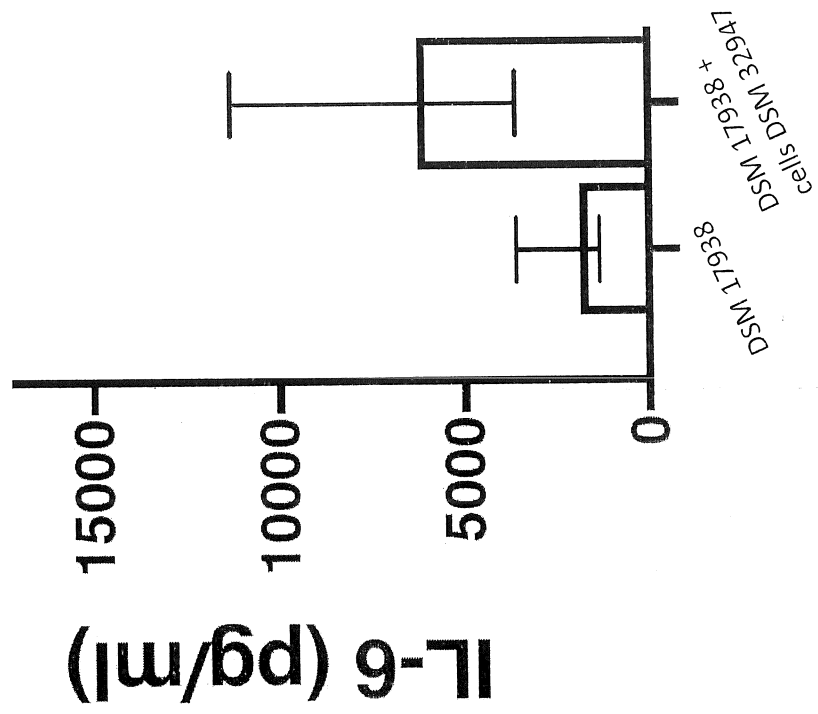


Fig. 20

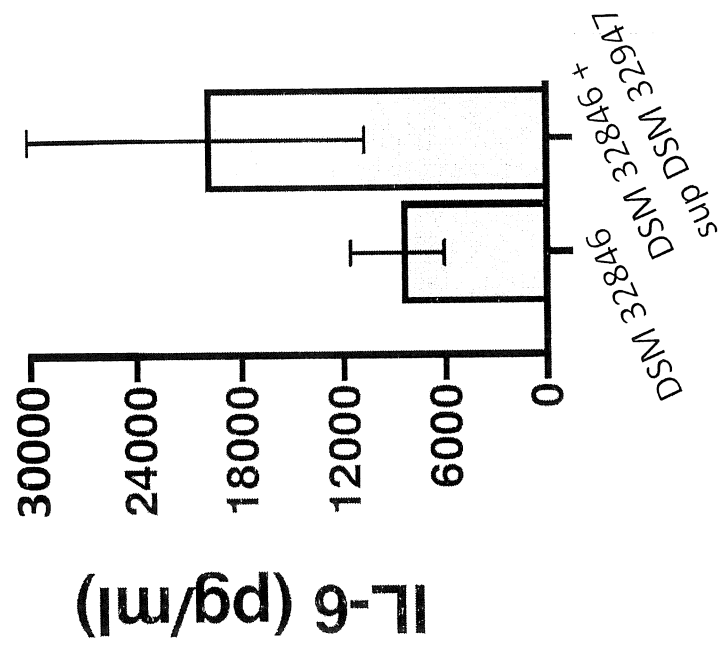


Fig. 19

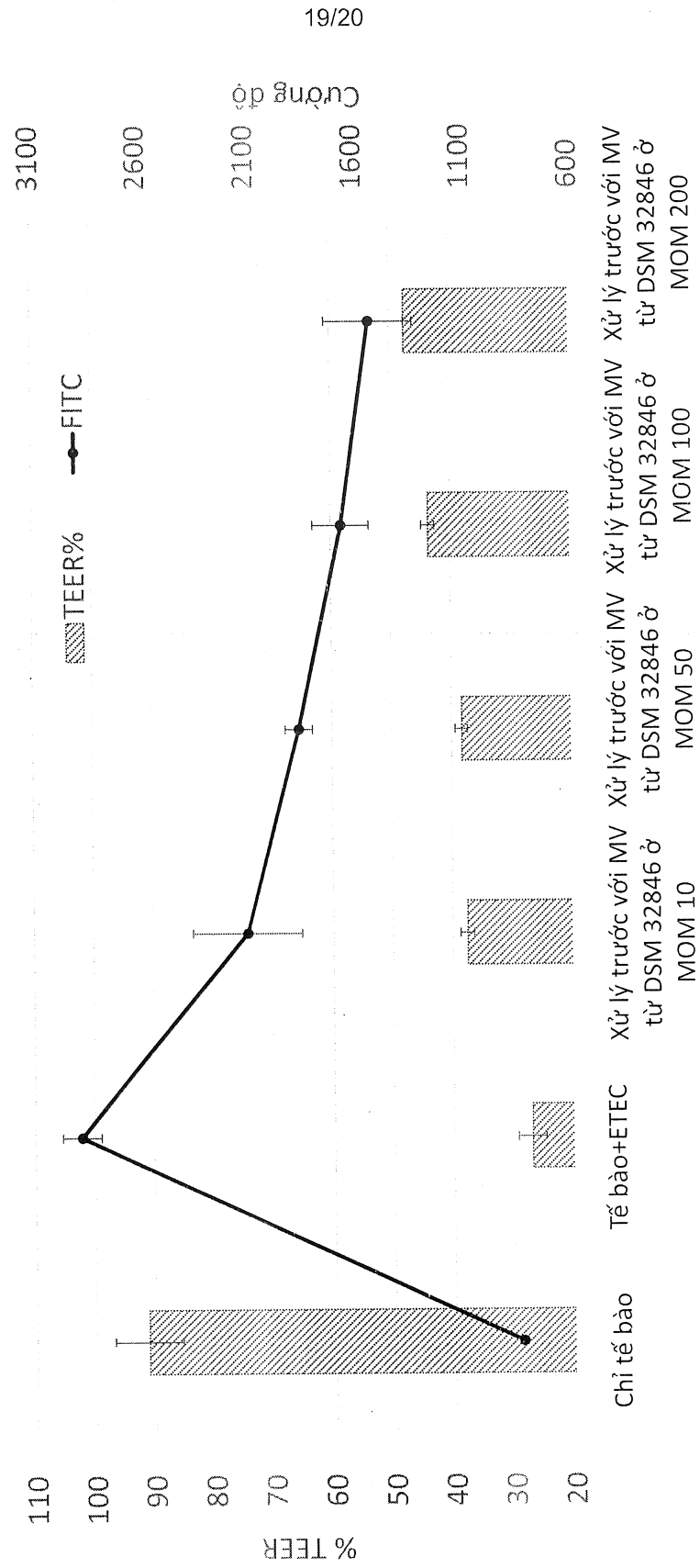


Fig. 21

20/20

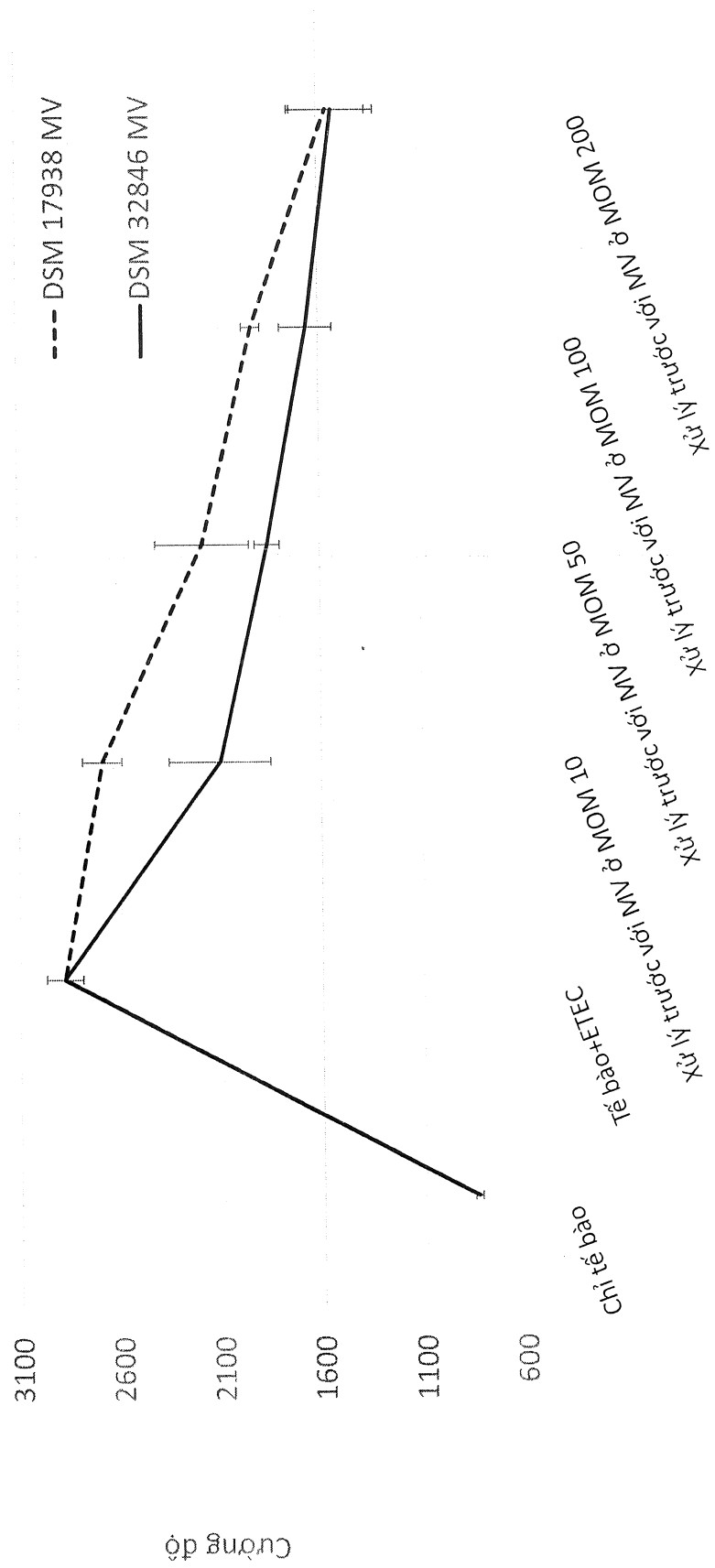


Fig. 22