



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048768

(51)<sup>2020.01</sup> A23L 33/125; A61Q 19/00; A61K 8/73; (13) B  
A23L 33/18; A61K 8/65

(21) 1-2021-07062

(22) 07/05/2020

(86) PCT/KR2020/006054 07/05/2020

(87) WO 2021/221221 04/11/2021

(30) 10-2020-0052861 29/04/2020 KR

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/04/2023 421A

(73) NEO CREMAR CO., LTD. (KR)

211, Jungdae-ro, Songpa-gu, Seoul 05702, Republic of Korea

(72) KIM, Jae-Hwan (KR); SUH, Hyung-Joo (KR); HONG, Ki-Bae (KR); SHIN, Jung-Cheul (KR); KIM, Na-Ri (KR); JO, Kyung Ae (KR).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) CHẾ PHẨM THỰC PHẨM CHỨA GALACTO-OLIGOSACARIT VÀ COLAGEN  
TRIPLEPTIT ĐỂ ỨNG DỤNG CHẾ SỰ TỔN THƯƠNG DA DO BỨC XẠ TỬ NGOẠI GÂY  
RA

(21) 1-2021-07062

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) làm thành phần hoạt tính để cải thiện chức năng miễn dịch hoặc làm giảm tình trạng viêm. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm thực phẩm chức năng chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để cải thiện tình trạng của da hoặc cải thiện chức năng miễn dịch hoặc hệ vi khuẩn đường ruột. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm mỹ phẩm chứa galacto-oligosacarit hoặc galacto-oligosacarit và collagen tripeptit làm thành phần hoạt tính để cải thiện tình trạng của da. Chế phẩm theo sáng chế có hiệu quả rất tốt đối với các mục đích nêu trên, và do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm dùng cho các mục đích nêu trên.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chế phẩm thực phẩm và chế phẩm mỹ phẩm, mỗi chế phẩm này chứa galacto-oligosacarit (GOS) hoặc galacto-oligosacarit và collagen tripeptit (CTP) để cải thiện chức năng miễn dịch và tình trạng của da.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Sự lão hóa da là do tình trạng giảm khả năng phục hồi của các tế bào cấu thành da. Các nguyên nhân gây lão hóa da được phân loại thành sự lão hóa nội tại xảy ra khi độ tuổi tăng dần và sự lão hóa do tác động bên ngoài (ví dụ, sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng) do sự tiếp xúc với tia tử ngoại liên tục. Sự lão hóa nội tại được đặc trưng về mặt lâm sàng với sự giảm số lượng tế bào, sự giảm lượng sợi protein của khuôn nền ngoại bào được tổng hợp, cấu trúc lỏng lẻo, các nếp nhăn nhỏ trong đó cấu trúc của lớp sừng bị thay đổi do sự mất độ ẩm trong các tế bào da, sự giảm các lớp mỡ dưới da, và sự dưỡng ẩm cho da bị giảm đi. Đối với sự lão hóa do tác động bên ngoài, các gốc oxy có khả năng phản ứng (ROS) được tạo ra bởi tác nhân kích thích là tia tử ngoại kích thích sự sản sinh các xytokin gây viêm, tạo ra các nếp nhăn dày và sâu, làm khô da, và làm giảm độ đàn hồi. Nếu không được loại bỏ thích hợp, các gốc oxy có khả năng phản ứng, yếu tố phổ biến của sự lão hóa nội tại hoặc sự lão hóa do tác động bên ngoài, cản trở khả năng phục hồi của da để xúc tiến sự lão hóa da.

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

Các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu chuyên sâu để xác định các hiệu quả khác nhau của galacto-oligosacarit (GOS) và hỗn hợp của galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) trên da và các cơ chế của nó. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã

phát hiện được hiệu quả cải thiện chức năng miễn dịch và kháng viêm hoặc chống oxy hóa của galacto-oligosacarit và hiệu quả cải thiện chức năng miễn dịch, kháng viêm, chống oxy hóa, làm giảm nếp nhăn, cải thiện độ đàn hồi, dưỡng ẩm cho da, và ức chế sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng của hỗn hợp của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit, và do đó đã hoàn thành sáng chế.

Theo đó, mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) làm thành phần hoạt tính để làm giảm tình trạng viêm hoặc cải thiện chức năng miễn dịch.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm mỹ phẩm chứa galacto-oligosacarit hoặc galacto-oligosacarit và collagen tripeptit làm thành phần hoạt tính để cải thiện tình trạng của da.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1A thể hiện lượng sử dụng thực phẩm của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.1B thể hiện lượng sử dụng nước của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.2A thể hiện khả năng giữ nước của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.2B thể hiện sự thay đổi về khả năng giữ nước của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.3A thể hiện mức độ mất nước qua biểu bì của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.3B thể hiện sự thay đổi về mức độ mất nước qua biểu bì của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.4A thể hiện giá trị ban đỏ của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.4B thể hiện sự thay đổi về giá trị ban đỏ của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.5 thể hiện kết quả quan sát bằng mắt thường và chụp ảnh của da lưng chuột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.6A thể hiện tổng diện tích nếp nhăn trên da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.6B thể hiện độ sâu của nếp nhăn lớn nhất của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.7 thể hiện kết quả nhuộm da chuột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế bằng thuốc nhuộm H&E.

Fig.8 thể hiện độ dày biểu bì được xác định từ kết quả nhuộm da chuột bằng thuốc nhuộm H&E của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.9 thể hiện kết quả nhuộm collagen trong da chuột bằng phương pháp hóa mô miễn dịch (IHC) của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.10 thể hiện giá trị collagen được xác định từ kết quả nhuộm collagen trong da chuột bằng phương pháp IHC của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.11 thể hiện kết quả xác định lượng elastin trong chân bì chuột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Các hình vẽ từ Fig.12 đến Fig.15 thể hiện mức độ biểu hiện mRNA của MMP2/3/9/13 trong mô da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.16 và Fig.17 thể hiện mức độ biểu hiện mRNA của TIMP1 và TMP2 trong mô da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.18 thể hiện mức độ biểu hiện mRNA của collagen typ I (COL1a1) trong mô da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.19 thể hiện mức độ biểu hiện mRNA của hyaluronidaza trong mô da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Các hình vẽ từ Fig.20 đến Fig.22 thể hiện nồng độ xytokin gây viêm được tiết ra trong mô da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế (Fig.20: IL-6, Fig.21: IL-12, và Fig.22: TNF-alpha).

Các hình vẽ từ Fig.23 đến Fig.27 thể hiện lượng axit béo mạch ngắn (SCFA) của

mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế (Fig.23: axit axetic, Fig.24: axit propionic, Fig.25: axit butyric, Fig.26: axit valeic, và Fig.27: tổng lượng SCFA).

Fig.28 thể hiện kết quả phân tích theo cụm UPGMA để phân tích quần thể của hệ vi sinh vật chức năng có lợi cho sức khỏe ở da và ruột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Các hình vẽ từ Fig.29 đến Fig.31 thể hiện sự phân bố của các vi khuẩn *Bacteroidetes* và *Firmicutes* trong hệ vi sinh vật đường ruột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Các hình vẽ từ Fig.32 đến Fig.35 thể hiện sự phân bố của các vi khuẩn *Bacteroidetes* và *Firmicutes* trong hệ vi sinh vật đường ruột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Các hình vẽ từ Fig.36 đến Fig.40 thể hiện sự phân bố của các ngành và họ của các vi sinh vật đường ruột trong hệ vi sinh vật đường ruột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Các hình vẽ từ Fig.41 đến Fig.44 thể hiện sự phân bố các giống của các vi sinh vật đường ruột trong hệ vi sinh vật đường ruột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) làm thành phần hoạt tính để làm giảm tình trạng viêm hoặc cải thiện chức năng miễn dịch.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “galacto-oligosacarit (GOS)” là hỗn hợp của một số loại sacarit bao gồm cả galacto-oligosacarit. Galacto-oligosacarit này có thể bao gồm: các hợp chất monosacarit của glucoza và galactoza; các hợp chất disacarit, như galactobioza, lactoza, và alolactoza; và các hợp chất trisacarit bao gồm galactosylactoza và các hợp chất tetra- sacarit hoặc sacarit cao hơn của galacto-oligosacarit. Hợp chất galactobioza có thể bao gồm 4-beta-galactobioza và 6-beta-galactobioza. Hợp chất alolactoza có thể bao gồm 6-galactosyl-glucoza. Hợp chất beta

galactosyllactoza có thể bao gồm 3'-galactosyllactoza, 4'-galactosyllactoza, 6'-galactosyllactoza, 4-beta-di-galactosyllactoza, 4-beta-tri-galactosyllactoza, 4-beta-tetra-galactosyllactoza, và chất tương tự.

Cụ thể, galacto-oligosacarit được sử dụng trong sáng chế bao gồm: galactobioza và lactoza, là disacarit; và galacto-oligosacarit, như tri- sacarit hoặc sacarit cao hơn bao gồm galactosyllactoza.

Hợp chất galacto-oligosacarit có thể có tổng hàm lượng disacarit nằm trong khoảng từ 17 đến 25%, tổng hàm lượng trisacarit nằm trong khoảng từ 26 đến 36%, và tổng hàm lượng tetrasacarit nằm trong khoảng từ 16 đến 30%, tính theo lượng chất khô, và hàm lượng galacto-oligosacarit loại trừ monosacarit glucoza và galactoza và disacarit lactoza có thể nằm trong khoảng từ 70 đến 80%, tính theo lượng chất khô.

Galacto-oligosacarit là các chất xơ hòa tan (prebiotic) không tiêu hóa được, và đã được biết là góp phần vào sức khỏe miễn dịch bằng cách kích thích sự tiêu hóa và giúp cho sự phát triển của các vi khuẩn có lợi trong ruột.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “colagen tripeptit (CTP)” là đơn vị tối thiểu của colagen gồm ba axit amin. CTP khác với các colagen thông thường và do đó dễ dàng được hấp thu vào đường ruột. Colagen tripeptit là chất có tác dụng sinh học, như làm liền vết thương và gãy xương và tăng cường dây chằng, và được sử dụng làm nguyên liệu thực phẩm.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ hiệu quả “kháng viêm” hoặc “làm giảm (giảm bớt) tình trạng viêm” để chỉ sự ức chế tình trạng viêm, và tình trạng viêm, là một trong số các đáp ứng bảo vệ của cơ thể với tác nhân kích thích, để chỉ ba loại phát triển sự tổn thương phức tạp: sự thoái hóa mô, sự rối loạn tuần hoàn và tiết dịch, và sự tăng sinh mô. Cụ thể hơn, tình trạng viêm là một phần của tính miễn dịch bẩm sinh và đáp ứng viêm là hành động bảo vệ không đặc hiệu tạo ra môi trường không thuận lợi cho các vi sinh vật có thể xâm nhập vào các mô bị tổn thương hoặc các vết thương. Trong đáp ứng viêm, các bạch cầu chịu trách nhiệm về sự đáp ứng miễn dịch trong cụm giai đoạn đầu để biểu hiện các xytokin. Do đó, mức độ biểu hiện của các xytokin trong tế bào

là chỉ số của sự hoạt hóa đáp ứng viêm. Ví dụ về các xytokin liên quan đến sự hoạt hóa đáp ứng viêm bao gồm IL-6, IL-12, TNF-alpha, và chất tương tự. Các xytokin cũng là dấu ấn miễn dịch liên quan đến đáp ứng viêm.

Intolokin-6 (IL-6) là xytokin kích thích đáp ứng viêm và đáp ứng miễn dịch ở nhiều bệnh, như bệnh tiểu đường, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh lupút ban đỏ toàn thân (sLE), bệnh đa u tủy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh Behcet, và bệnh viêm đa khớp dạng thấp. IL-12 là intolokin được sản sinh tự nhiên bởi các tế bào, như các tế bào đuôi gai, đại thực bào, và bạch cầu trung tính, đáp ứng với sự kích thích của kháng nguyên, và là xytokin có tác dụng trong nhiều bệnh nhiễm khuẩn. Yếu tố hoại tử khối u-alpha (TNF-alpha) là xytokin có tác dụng trong đáp ứng viêm toàn thân, và đóng vai trò trung tâm trong sự hoạt hóa đáp ứng viêm bao gồm cả đáp ứng viêm cấp tính.

Đã biết rằng sự kích thích lặp lại của bức xạ tử ngoại tạo ra các gốc oxy có khả năng phản ứng (ROS) và kích thích sự sản sinh các xytokin tiền viêm để hoạt hóa các hệ thống truyền tín hiệu khác nhau, nhờ đó làm gia tăng mức độ đáp ứng viêm.

Theo một phương án của sáng chế, galacto-oligosacarit của sáng chế có hiệu quả ức chế sự tiết ra các xytokin gây viêm rất tốt, chẳng hạn như IL-6, IL-12, và TNF-alpha và do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm thực phẩm để cải thiện chức năng miễn dịch và làm giảm tình trạng viêm, và ngăn ngừa các đáp ứng viêm quá mức hoặc làm chậm sự phục hồi do đáp ứng viêm quá mức gây ra và kích thích sự phục hồi sau khi bị tổn thương hoặc mắc bệnh. Cụ thể, sự cải thiện các đáp ứng miễn dịch và làm giảm tình trạng viêm có nghĩa là sự cải thiện chức năng miễn dịch của da và làm giảm tình trạng viêm da, nhưng không chỉ giới hạn ở các tác dụng này.

Ví dụ về bệnh về da có liên quan với tình trạng viêm bao gồm bệnh viêm da dị ứng, bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh viêm da tiết bã nhờn, bệnh vẩy nến, bệnh ban đỏ do bức xạ, hóa chất, bỏng, hoặc yếu tố tương tự gây ra, bỏng axit, bỏng tia tử ngoại, bệnh da dạng bong nước, bệnh liken, chứng ngứa do dị ứng, bệnh trứng cá đỏ, bệnh pemphigut thông thường, bệnh ban đỏ đa dạng tiết dịch, bệnh ban đỏ dạng nốt, viêm quy đầu, viêm âm hộ-âm đạo, bệnh rụng tóc do viêm như rụng tóc từng vùng, u lymphô tế bào T ở da,

và bệnh tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Triệu chứng của các bệnh về da có liên quan với tình trạng viêm bao gồm ban đỏ, sần, mụn nước, sự keratin hóa quá mức, chứng ngứa và triệu chứng tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các triệu chứng này.

Các bệnh có liên quan với tình trạng viêm không chỉ giới hạn ở các bệnh về da, và ví dụ về các bệnh này bao gồm bệnh viêm miệng, bệnh viêm mạch, bệnh viêm màng trong tim, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm miệng, hoặc bệnh viêm ruột. Cụ thể, bệnh viêm ruột được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh Crohn, bệnh Behcet ở ruột, bệnh viêm ruột kết không xác định, bệnh viêm ruột non do vi khuẩn, bệnh viêm ruột non do virus, bệnh viêm ruột non do amip, bệnh loét trực tràng xuất huyết, bệnh viêm ruột kết do thiếu máu cục bộ, và bệnh viêm ruột non do vi khuẩn lao, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này. Cụ thể hơn, bệnh viêm ruột là bệnh viêm ruột kết mạn loét hoặc bệnh Crohn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để cải thiện tình trạng của da.

Sự cải thiện tình trạng của da có nghĩa là dưỡng ẩm cho da, làm dịu da, làm giảm sự kích ứng da, giảm nếp nhăn trên da, ức chế sự tổn thương da do bức xạ tử ngoại gây ra, ức chế sự lão hóa, cải thiện độ đàn hồi của da, hoặc làm giảm tình trạng viêm da.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để dưỡng ẩm cho da.

Sự dưỡng ẩm cho da được duy trì bởi độ ẩm có trong lớp sừng của biểu bì, là lớp ngoài cùng của da, và collagen có mặt trong chân bì. Độ ẩm của lớp sừng được xác định bởi lớp phủ axit, là hỗn hợp lipit được sản sinh và tiết ra từ biểu bì, và bởi yếu tố dưỡng ẩm tự nhiên (natural moisturizing factor: NMF), là thành phần tan trong nước có mặt trong lớp sừng. Lớp sừng của biểu bì khỏe mạnh chứa độ ẩm từ 15 đến 20%, và khi độ ẩm giảm xuống thấp hơn 10%, da trở nên khô và mất đi độ bóng và độ đàn hồi của nó, dẫn đến làm tăng nếp nhăn.

Theo sáng chế, collagen còn được gọi là sợi collagen, và là thành phần chính của khuôn nền ngoại bào chiếm từ 85 đến 90% chân bì. Collagen là protein được sản sinh ở dạng procollagen nhờ tác dụng của các nguyên bào sợi. Procollagen mới tổng hợp được tiết vào khoảng ngoại bào của tế bào da thông qua phản ứng enzym, để nhờ đó tạo ra các vi sợi có cấu trúc chuỗi xoắn bộ ba, và các vi sợi này gắn kết với proteoglycan nhỏ giàu leuxin để tạo thành các sợi. Quá trình này được gọi là quá trình tạo sợi. Do đó, các sợi được tạo ra tập hợp lại để tạo thành các sợi collagen để tạo ra khả năng liên kết và độ đàn hồi của da. Collagen typ I chiếm phần lớn trong lượng collagen của da. Các chức năng chủ yếu của collagen là để tạo ra độ săn chắc cơ học cho da, tạo sức đề kháng cho các mô liên kết và khả năng liên kết của các mô, hỗ trợ sự bám dính của tế bào, tạo ra sự phân chia và biệt hóa của tế bào, và chức năng tương tự.

Theo một phương án của sáng chế, hỗn hợp của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế có tác dụng cải thiện hàm lượng của collagen trong chân bì khi được sử dụng. Như được thể hiện trong phương án cụ thể của sáng chế, theo kết quả đánh giá sự thay đổi về khả năng giữ nước trước và sau khi chiếu tia tử ngoại, tất cả các nhóm được điều trị bằng GOS/CTP với tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 3:1 đến 1:3 đều có sự cải thiện về hàm lượng collagen so với nhóm NOR, và có hiệu quả hiệp đồng về hàm lượng collagen so với các nhóm điều trị bằng GOS và CTP một mình.

Theo phương án khác của sáng chế, hỗn hợp của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế có tác dụng duy trì khả năng duy trì độ ẩm cao và làm giảm sự mất nước qua biểu bì khi được sử dụng. Giá trị của sự mất nước qua biểu bì (TEWL) để chỉ lượng độ ẩm bay hơi khỏi da, và giá trị này càng cao, chức năng dưỡng ẩm cho da càng thấp, điều này cho thấy rằng tác dụng của hàng rào đặc trưng cho da đã bị suy giảm.

Theo một phương án của sáng chế, galacto-oligosacarit và collagen tripeptit có mặt với tỷ lệ trọng lượng bằng 1-10:1-10. Cụ thể hơn, tỷ lệ trọng lượng có thể bằng 1-10:1-10, 1:1-10, 1-10:1, 1-5:1-5, 1:1-5, 1-5:1, 1-3:1-3, 1:1-3, 1-3:1, 1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 10:1, 5:1, 3:1, hoặc 2:1, nhưng không chỉ giới hạn ở các tỷ lệ này. Tỷ lệ trọng lượng của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit có mặt làm thành phần hoạt tính trong chế phẩm

của sáng chế là giống nhau, bất kể việc sử dụng chế phẩm thực phẩm chức năng của sáng chế.

Như được thể hiện trong phương án cụ thể của sáng chế, theo kết quả đánh giá sự thay đổi về khả năng giữ nước trước và sau khi chiếu tia tử ngoại, nhóm sử dụng GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 có sự gia tăng đáng kể về khả năng giữ nước; tất cả các nhóm sử dụng mẫu đều có sự giảm đáng kể về mức độ mất nước qua biểu bì; và tất cả các nhóm điều trị bằng GOS/CTP theo tỷ lệ nằm trong khoảng từ 3:1 đến 1:3 đều có hiệu quả hiệp đồng trong việc làm giảm sự mất nước qua biểu bì so với các nhóm điều trị bằng GOS và CTP một mình.

Hyaluronan, là chất có mặt trong da, được tạo ra trong các nguyên bào sợi và tế bào keratin và có thể chứa lượng ẩm đáng kể do sự có mặt của nhiều polysacarit làm thành phần của mucopolysacarit. Chu kỳ của hyaluronan là từ 2 đến 4,5 ngày, và kết hợp với nước có trọng lượng gấp 1000 lần của chính nó để kiểm soát chức năng của hàng rào bảo vệ da và hydrat hóa khuôn nền ngoại bào, nhờ đó duy trì sự cân bằng nội mô của nước trong mô. Hyaluronan có mặt không chỉ trong chân bì mà còn có mặt trong khoảng trống tế bào của biểu bì, cụ thể là lớp gai, nhưng không có mặt trong lớp sừng và lớp hạt.

Hyaluronidaza (HYAL) là enzym thủy phân của hyaluronan, yếu tố dưỡng ẩm cho da.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kết quả xác định mức độ biểu hiện gen của hyaluronidaza HYAL, mức độ biểu hiện của HYAL được tăng lên đáng kể ở nhóm đối chứng tiếp xúc với bức xạ tử ngoại và có xu hướng giảm đi ở tất cả các nhóm sử dụng chế phẩm. Đặc biệt là đối với mức độ biểu hiện của HAYAL, tất cả các nhóm được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp chứa GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1, 1:1, và 1:3 có hiệu quả hiệp đồng về sự giảm hàm lượng hyaluronidaza so với các nhóm sử dụng GOS và CTP.

Do đó, hỗn hợp của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế có hiệu quả dưỡng ẩm da rất tốt, và do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm thực phẩm để dưỡng ẩm cho da.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-

oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để làm dịu da hoặc làm giảm sự kích ứng da.

Theo sáng chế, sự làm dịu da để chỉ việc mang lại cảm giác mát mẻ cho da và có nghĩa là tác dụng làm dịu hiện tượng ban đỏ/mẩn đỏ của da.

Theo sáng chế, tác dụng làm giảm sự kích ứng da để chỉ tác dụng làm giảm mức độ đáp ứng của da với sự kích thích bên trong và bên ngoài tác dụng lên da, ví dụ, tác dụng làm giảm (mức độ viêm hoặc ban đỏ/mẩn đỏ) với sự kích thích tác dụng lên da do bức xạ tử ngoại.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, việc sử dụng galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế có tác dụng làm giảm đáng kể sự biểu hiện của IL-6, IL-12, và TNF-alpha, là các xytokin làm dấu ấn miễn dịch có liên quan đến tình trạng viêm, với sự kích thích của tia tử ngoại. Ngoài ra, theo kết quả đánh giá chỉ số ban đỏ, đặc biệt là nhóm điều trị bằng GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 có tác dụng làm giảm mức độ ban đỏ rất tốt.

Do đó, galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế có thể được sử dụng theo cách có lợi làm nguyên liệu của chế phẩm thực phẩm để làm dịu da hoặc làm giảm sự kích ứng da.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để làm giảm nếp nhăn trên da.

Sự tiếp xúc của da với bức xạ tử ngoại gây ra sự thay đổi về các đặc tính vật lý và sinh hóa bên trong mô da, do đó gây ra sự tăng sinh của tế bào biểu mô, chứng tăng sắc tố mô, sự tổn thương ADN thông qua sự tạo ra quá mức của các gốc oxy có khả năng phản ứng, sự hoạt hóa bất thường của các enzym và protein khác nhau, và các hiện tượng tương tự. Sự thay đổi bên trong mô da làm suy giảm chức năng của hàng rào bảo vệ da trong việc điều chỉnh sự hấp thu các chất ngoại sinh vào da và sự bay hơi nước, làm tăng độ dày của da, và làm tổn thương cấu trúc của lớp chân bì, do đó, cuối cùng là tạo ra các nếp nhăn.

Theo sáng chế, tác dụng “làm giảm nếp nhăn” để chỉ tác dụng ngăn ngừa hoặc ức

chế sự tạo ra các nếp nhăn trong da hoặc giảm bớt các nếp nhăn đã tạo ra.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, việc sử dụng hỗn hợp của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế có xu hướng làm giảm đáng kể các chỉ số của kiểu nếp nhăn (diện tích nếp nhăn và độ sâu nếp nhăn tối đa) so với nhóm đối chứng. Đối với các chế phẩm, các nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ từ 1:3 đến 1:1 có sự giảm độ sâu của nếp nhăn lớn nhất theo cách hiệp đồng, và tất cả các nhóm sử dụng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ từ 3:1 đến 1:3 đều có vùng nếp nhăn được giảm đi theo cách hiệp đồng. Do đó, các chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm thực phẩm để làm giảm nếp nhăn trên da.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để ức chế sự tổn thương da do bức xạ tử ngoại gây ra.

Phần trên đây đã mô tả rằng sự tiếp xúc của da với bức xạ tử ngoại gây tổn thương trong mô da. Tại thời điểm tiếp xúc với tia UV trong khoảng thời gian dài, quan sát được độ dày biểu bì tăng lên từ 2 đến 3 lần và sự tăng lượng tế bào gai, sự đa hình của các tế bào keratin, và hiện tượng tương tự trong lớp biểu bì trong mô da. Đối với sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng, sự tạo ra lớp sừng tăng lên để bảo vệ lớp bì của da và da trở nên dày hơn, và do đó sự tăng độ dày của da do bức xạ tử ngoại hoặc yếu tố tương tự có nghĩa là sự tổn thương da ở mức lớn.

Như được thể hiện trong phương án cụ thể của sáng chế, việc sử dụng các chế phẩm chứa galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế làm giảm đáng kể sự tăng độ dày biểu bì do bức xạ tử ngoại gây ra, và đặc biệt là các nhóm được điều trị bằng chế phẩm chứa GOS/CTP với tỷ lệ trọng lượng bằng 1:1 và 3:1 có sự giảm độ dày biểu bì đáng kể, điều này cho thấy có hiệu quả hiệp đồng, so với các nhóm điều trị bằng GOS và CTP một mình. Do đó, các chế phẩm của sáng chế ức chế hữu hiệu sự tổn thương da do bức xạ tử ngoại gây ra, và đặc biệt là có hiệu quả hiệp đồng với tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-

oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để ức chế sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng.

Do sự kích thích bởi tia tử ngoại của ánh sáng mặt trời, các gốc oxy có khả năng phản ứng (ROS) được tạo ra, và sự sản sinh ra các xytokin tiền viêm được kích thích để hoạt hóa một số hệ thống truyền tín hiệu. Ngoài ra, AP-1 được hoạt hóa để ức chế TGF- $\beta$  và TGF- $\alpha$ , nhờ đó làm giảm sự tổng hợp collagen typ I và collagen typ III, và sự hoạt hóa AP-1 và NF- $\kappa$ B làm hoạt hóa MMP, đặc biệt là MMP-1, MMP-3, và MMP-9 để kích thích sự phân rã của mô liên kết trong chân bì.

Collagen, thành phần chính trong chân bì da, là yếu tố chính trong việc duy trì độ đàn hồi và độ săn chắc của mô da và là dấu hiệu của sự bảo vệ da đối với bức xạ tử ngoại. Collagen typ I (COL1a1) chiếm từ 80 đến 85% tổng lượng collagen.

Ngoài ra, metaloproteinaza cơ chất (MMP) là các enzym collagenaza, và sự tăng hoạt tính của MMP kích thích sự phân rã của collagen. Tia tử ngoại làm gia tăng sự biểu hiện của một số MMP để làm gia tăng sự phân rã của collagen, và làm hư hại cấu trúc của lớp da, do đó cuối cùng gây ra các nếp nhăn trên da (sự lão hóa).

MMP là các enzym đại diện làm thoái biến collagen, nhưng các chất ức chế mô của metaloproteinaza (TIMP) là chất ức chế có tác dụng ức chế hoạt tính của MMP.

Theo một phương án của sáng chế, theo kết quả đánh giá hàm lượng collagen trong chân bì, tất cả các nhóm mẫu đều có sự tăng hàm lượng collagen, và hàm lượng collagen này tăng lên đáng kể theo cách hiệp đồng ở nhóm sử dụng GOS một mình hoặc nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP đối với tất cả các tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1, so với nhóm sử dụng CTP một mình, và đặc biệt là hiệu quả đáng kể nhất được thể hiện ở nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3.

Theo phương án khác của sáng chế, theo kết quả xác định mức độ biểu hiện mRNA của các collagenaza MMP trong chân bì, khi các chế phẩm chứa GOS và CTP của sáng chế được sử dụng, mức độ biểu hiện của các gen MMP2/3/9/13 được giảm đáng kể khi điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 và/hoặc 3:1.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, theo kết quả xác định mức độ biểu hiện

của các gen TIMP1 và TIMP2, là các chất ức chế collagenaza trong chân bì, khi các chế phẩm chứa GOS và CTP của sáng chế được sử dụng, mức độ biểu hiện của TIMP1 và TIMP2 tăng lên với tất cả các tỷ lệ trọng lượng của GOS/CTP nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1.

Do đó, đã xác định được rằng các chế phẩm để ức chế sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng theo sáng chế có hiệu quả hiệp đồng trong việc ức chế sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng với tỷ lệ trọng lượng của GOS/CTP nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1, cụ thể hơn là từ 1:1 đến 3:1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để cải thiện độ đàn hồi của da.

Đã biết rằng sự giảm hàm lượng protein elastin có cấu trúc dạng lưới của lớp chân bì cũng có liên quan chặt chẽ với sự giảm độ đàn hồi của da, sự giảm hàm lượng protein elastin là do sự lão hóa do tiếp xúc với ánh nắng hoặc sự lão hóa nội tại gây ra.

Theo sáng chế, elastin chiếm từ khoảng 3 đến 4% của lớp chân bì và là sợi đàn hồi ảnh hưởng đến độ đàn hồi của da. Theo sự biểu hiện của các gen elastin, protein được gọi là tropoelastin được tổng hợp, và tropoelastin này được kết hợp với các tropoelastin khác để cuối cùng tạo ra protein elastin.

Theo một phương án của sáng chế, theo kết quả đánh giá hàm lượng các sợi elastin trong chân bì, các chế phẩm chứa galacto-oligosacarit và collagen tripeptit của sáng chế làm gia tăng hàm lượng sợi elastin với tất cả các tỷ lệ trọng lượng so với nhóm đối chứng, và đặc biệt là việc sử dụng các chế phẩm chứa GOS/CTP với tỷ lệ trọng lượng bằng 1:3 và 3:1 có hiệu quả hiệp đồng về tác dụng làm tăng hàm lượng sợi elastin so với các nhóm sử dụng GOS và CTP một mình.

Đã biết rằng độ đàn hồi của da cũng có liên quan với hàm lượng collagen trong chân bì. Sự gia tăng hàm lượng collagen được xác định ở tất cả các nhóm mẫu, và hàm lượng collagen được tăng lên đáng kể theo cách hiệp đồng ở nhóm sử dụng GOS một mình hoặc các nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP với tất cả các tỷ lệ trọng lượng nằm

trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 so với nhóm sử dụng CTP một mình, và đặc biệt là hiệu quả đáng kể nhất được thể hiện ở nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3.

Do đó, hỗn hợp của galacto-oligosacarit và collagen tripeptit theo sáng chế có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm thực phẩm để cải thiện độ đàn hồi của da, cụ thể là với tỷ lệ trọng lượng của GOS/CTP nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1, và cụ thể hơn là với tỷ lệ trọng lượng của GOS/CTP bằng 1:3 hoặc 3:1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để cải thiện chức năng miễn dịch và làm giảm tình trạng viêm.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính để cải thiện chức năng miễn dịch hoặc hệ vi khuẩn đường ruột.

Theo sáng chế, tác dụng làm giảm tình trạng viêm (giảm bớt tình trạng viêm hoặc kháng viêm) là giống như tác dụng đã được mô tả đối với chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit làm thành phần hoạt tính để cải thiện chức năng miễn dịch và làm giảm tình trạng viêm.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tính miễn dịch” là hệ thống tự bảo vệ có trong cơ thể, và là quá trình trong đó các loại chất hoặc sinh vật khác nhau xâm nhập từ bên ngoài cơ thể được nhận biết là chất ngoại lai đối với chính cơ thể của sinh vật và do đó được loại bỏ và chuyển hóa. Tính miễn dịch bảo vệ cơ thể của chính sinh vật khỏi bị tổn thương do sự kích thích bên ngoài hoặc sự xâm nhập của các vi sinh vật gây bệnh, nhưng giống như đáp ứng viêm hoặc yếu tố tương tự, tính miễn dịch cũng có thể làm tổn thương các mô của chính sinh vật này. Sự cải thiện chức năng miễn dịch là tác dụng điều hòa sự thay đổi về chức năng miễn dịch để phục hồi chức năng miễn dịch trở lại trạng thái bình thường hoặc làm giảm mức độ thay đổi, và được chia thành sự giảm đáp ứng miễn dịch quá mức hoặc sự tăng cường chức năng miễn dịch. Sự giảm đáp ứng miễn dịch quá mức để chỉ sự ức chế đáp ứng miễn dịch gia tăng không mong muốn, như đáp ứng dị ứng do phản ứng bất lợi với chất ngoại lai hoặc sự đáp ứng với kháng nguyên bản thân hoặc kháng nguyên

bản thân được cải biến. Sự cải thiện chức năng miễn dịch được chia thành sự tăng cường chức năng miễn dịch nhằm mục đích làm gia tăng khả năng bảo vệ sinh học và sự giảm đáp ứng miễn dịch không mong muốn nhằm mục đích điều biến và cải thiện chức năng miễn dịch.

Theo phương án của sáng chế, sự cải thiện chức năng miễn dịch là sự làm giảm đáp ứng miễn dịch quá mức. Sự làm giảm đáp ứng miễn dịch quá mức bao gồm sự làm giảm tình trạng thải bỏ mô ghép cơ quan và bệnh dị ứng, sự làm giảm mức độ viêm hoặc các bệnh viêm, và sự làm giảm các bệnh tự miễn.

Theo sáng chế, tình trạng thải bỏ mô ghép cơ quan, cụ thể là tình trạng thải bỏ mô ghép cấp tính hoặc mạn tính xuất hiện sau khi cấy ghép tim, phổi, tổ hợp tim và phổi, gan, thận, tụy, da, ruột, hoặc giác mạc, và bệnh mô ghép chống túc chủ sau khi ghép tủy xương, đặc biệt là tình trạng thải ghép qua trung gian tế bào T sau khi cấy ghép.

Theo sáng chế, bệnh dị ứng, bệnh tự miễn, tình trạng viêm, hoặc bệnh viêm, có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh dị ứng da, bệnh dị ứng mũi, bệnh dị ứng phế quản, bệnh dị ứng thức ăn, bệnh nhiễm khuẩn huyết, bệnh xơ cứng động mạch, bệnh vi khuẩn huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân, hội chứng rối loạn chức năng đa cơ quan, chứng loãng xương, bệnh viêm nha chu, bệnh lupút ban đỏ toàn thân, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp mạn tính tuổi thiếu niên, bệnh lý khớp cột sống, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh xơ cứng toàn thân, rối loạn viêm cơ vô căn, hội chứng Sjogren, bệnh viêm mạch toàn thân, bệnh saccoit, bệnh thiếu máu tan huyết tự miễn, bệnh giảm lượng tiểu cầu tự miễn, bệnh viêm tuyến giáp, bệnh tiểu đường, bệnh thận qua trung gian miễn dịch, bệnh mất myelin trong hệ thần kinh trung ương hoặc hệ thần kinh ngoại vi, bệnh đa dây thần kinh mất myelin vô căn, hội chứng Guillain-Barre, bệnh đa dây thần kinh mất myelin do viêm mạn tính, bệnh ở gan-ống gan, bệnh viêm gan hoạt động mãn tính tự miễn hoặc do nhiễm khuẩn, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm gan dạng u hạt, bệnh viêm đường mật xơ hóa, bão xytokin, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh viêm ruột kết mạn loét, bệnh Crohn, hội chứng ruột kích thích, bệnh ruột kích thích do gluten, bệnh Whipple, bệnh da qua trung gian tự miễn hoặc

miễn dịch, bệnh da bong nước dạng ban đỏ đa dạng, bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh vẩy nến, bệnh dị ứng, bệnh hen, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm da dị ứng, chứng ngứa, bệnh nhạy cảm với thực phẩm, bệnh trứng cá, bệnh mày đay, bệnh miễn dịch ở phổi, bệnh viêm phổi có tăng bạch cầu ưa eosin, bệnh xơ hóa phổi tự phát, và bệnh viêm phổi quá mẫn.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chứng ngứa” để chỉ tình trạng ngứa bất kỳ, và bao gồm cảm giác khó chịu khiến cho muốn gãi hoặc chà xát da. Chứng ngứa này có thể được chia sơ bộ thành chứng ngứa do các bệnh về da và chứng ngứa do các bệnh nội khoa gây ra. Chứng ngứa do các bệnh về da bao gồm chứng ngứa do bệnh viêm da dị ứng, bệnh mày đay, bệnh vẩy nến, bệnh pemphigut, bệnh da khô, bệnh liken giản đơn mãn tính, bệnh sần cục, bệnh liken, và bệnh tương tự. Chứng ngứa do các bệnh nội khoa gây ra bao gồm chứng ngứa do bệnh tuyến giáp gây ra, chứng ngứa do tính bất thường của hormon gây ra như bệnh tiểu đường, chứng ngứa do thận hoặc tình trạng ure-huyết do bệnh suy thận mạn tính và thẩm tách máu gây ra, chứng ngứa tân sinh do bệnh bạch cầu hoặc u lymphô gây ra, chứng ngứa do ứ mật, chứng ngứa do bệnh mô ghép chống túc chủ gây ra, chứng ngứa do bệnh thiếu máu và bệnh chuyển hóa gây ra, chứng ngứa do hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải gây ra, và bệnh tương tự.

Ví dụ về các dấu ấn sinh học để xác định tính chức năng liên quan đến sự làm giảm đáp ứng miễn dịch bao gồm globulin miễn dịch (IgE), prostaglandin, leukotrien, histamin, NO, iNOS, COX2, các xytokin (TNF, IL, IFN), và chất tương tự.

Chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit và collagen tripeptit làm thành phần hoạt tính của sáng chế có hiệu quả rất tốt trong việc làm giảm sự biểu hiện của các xytokin gây viêm IL-6, IL-12, và TNF-alpha. IL-6 là xytokin đã được biết là có liên quan đến chứng ngứa của da, điều này cho thấy rằng chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng để phòng ngứa, làm giảm, hoặc điều trị chứng ngứa. IL-12 đã được biết là làm gia tăng các loại đáp ứng viêm da khác nhau, như bệnh viêm da dị ứng và bệnh viêm da tiếp xúc dị ứng. TNF-alpha được gọi là xytokin gây ra tình trạng viêm trong bệnh viêm đa khớp dạng thấp cũng như các bệnh về da, như bệnh viêm da dị ứng và bệnh vẩy nến.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, tất cả các hỗn hợp GOS và CTP với tỷ lệ trọng lượng của GOS và CTP bằng 1:3, 1:1, và 3:1 đều có hiệu quả hiệp đồng về tác dụng làm giảm sự tiết ra xytokin gây viêm, so với các nhóm sử dụng GOS và CTP một mình. Do đó, các chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm để cải thiện chức năng miễn dịch hoặc làm giảm tình trạng viêm (kháng viêm).

Ngoài ra, theo một phương án của sáng chế, sự cải thiện các chức năng miễn dịch bao gồm sự cải thiện các chức năng miễn dịch ở ruột. Sự cải thiện các chức năng miễn dịch ở ruột đạt được bằng cách ngăn chặn các vi khuẩn đường ruột có hại và làm gia tăng các vi khuẩn đường ruột có lợi.

Theo phương án khác của sáng chế, sự cải thiện hệ vi khuẩn đường ruột để chỉ sự giảm tỷ lệ của vi khuẩn ngành *Firmicutes*/vi khuẩn ngành *Bacteroidetes* trong ruột.

Theo phương án khác của sáng chế, sự cải thiện hệ vi khuẩn đường ruột là sự gia tăng các chủng thuộc giống *Bifidobacterium*.

Như được chứng minh trong phương án làm ví dụ của sáng chế, GOS hoặc hỗn hợp của GOS và CTP theo sáng chế làm giảm tỷ lệ của vi khuẩn ngành *Firmicutes*/vi khuẩn ngành *Bacteroidetes* trong ruột và làm gia tăng các chủng thuộc giống *Bifidobacterium* trong số các vi khuẩn axit lactic trong ruột, và do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm để cải thiện hệ vi khuẩn đường ruột.

Theo một phương án của sáng chế, sự cải thiện hệ vi khuẩn đường ruột được chứng minh bởi sự gia tăng lượng axit béo mạch ngắn. Nhờ quá trình lên men của các chất xơ thực phẩm trong ruột bởi các vi khuẩn đường ruột, axit béo mạch ngắn, chủ yếu là axit axetic, axit propionic, và axit butyric, được tạo ra, và các axit béo mạch ngắn này đã được biết là được hấp thu nhanh chóng vào niêm mạc ruột và được sử dụng làm nguồn năng lượng chính cho các tế bào niêm mạc ruột kết (Thompson DB, 2000).

Như được chứng minh trong phương án làm ví dụ của sáng chế, GOS hoặc hỗn hợp của GOS và CTP theo sáng chế làm gia tăng tổng lượng axit béo mạch ngắn và các axit béo mạch ngắn riêng biệt (axit axetic, axit butyric, axit valeric, v.v.) trong ruột, và dựa vào sự tăng lượng vi khuẩn axit lactic trong ruột và sự giảm vi khuẩn có hại trong

ruột, các chức năng miễn dịch của ruột và hệ vi khuẩn đường ruột được cải thiện.

Theo sáng chế, chế phẩm thực phẩm có thể được sử dụng làm các loại chất phụ gia thực phẩm khác nhau hoặc thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe. Thực phẩm có thể được sản xuất ở dạng bột, hạt, viên nén, viên nang, dạng uống, hoặc dạng tương tự, và cụ thể, ví dụ về thực phẩm có thể là đồ uống, thịt, sôcôla, thực phẩm, bánh kẹo, pizza, mì ăn liền, các loại mì khác, gôm, kem, đồ uống có cồn, các vitamin tổng hợp, và các thực phẩm bổ sung có lợi cho sức khỏe.

Hàm lượng hỗn hợp của GOS và CTP theo sáng chế có mặt trong chế phẩm thực phẩm có thể được điều chỉnh khi thích hợp theo dạng của thực phẩm, mục đích sử dụng mong muốn của chúng, hoặc yếu tố tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở các yếu tố này. Ví dụ, hàm lượng của GOS và CTP có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 30% trọng lượng hoặc từ 0,01 đến 20% trọng lượng của tổng trọng lượng thực phẩm, và chế phẩm đồ uống có lợi cho sức khỏe có thể có hàm lượng của GOS và CTP nằm trong khoảng từ 0,001 đến 15g, từ 0,02 đến 10g, hoặc từ 0,3 đến 1g, so với 100ml chế phẩm, nhưng không chỉ giới hạn ở các tỷ lệ này.

Chế phẩm chứa hỗn hợp của GOS và CTP theo sáng chế, khi được tạo ra dưới dạng chế phẩm thực phẩm, có thể chứa các thành phần thường được bổ sung trong khi sản xuất thực phẩm, ngoài hỗn hợp của GOS và CTP làm thành phần hoạt tính. Ví dụ về các thành phần được bổ sung bao gồm các protein, hydrat cacbon, chất béo, chất dinh dưỡng, đồ gia vị, và các chất tạo hương vị. Ví dụ về các hydrat cacbon là: các sacarit phổ biến, như monosacarit (ví dụ, glucoza và fructoza), các disacarit (ví dụ, maltoza, sucroza, và oligosacarit), và các polysacarit (ví dụ, dextrin và xyclodextrin); và các rượu đường, như xylitol, sorbitol, và erythritol. Ví dụ về các chất tạo hương vị có thể bao gồm các chất tạo hương vị tự nhiên (thaumatin, và chất chiết từ cây cỏ ngọt (ví dụ, rebaudiosit A, glyxyrhizin, v.v..)) và các chất tạo hương vị tổng hợp (sacarin, aspartame, v.v.). Ví dụ, chế phẩm thực phẩm của sáng chế, khi được sản xuất dưới dạng đồ uống, có thể chứa axit xitric, xi-rô ngô có hàm lượng fructoza cao, đường, glucoza, axit axetic, axit malic, nước ép trái cây, chất chiết từ cây đỗ trọng (*Eucommia ulmoides*), chất chiết từ cây táo ta, chất

chiết từ cây cam thảo, và chất tương tự, ngoài chất chiết của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm mỹ phẩm chứa i) galacto-oligosacarit (GOS) hoặc ii) galacto-oligosacarit và collagen tripeptit (CTP) để cải thiện tình trạng của da.

Như được chứng minh trong các phương án làm ví dụ đã mô tả trên đây, galacto-oligosacarit (GOS) i) hoặc galacto-oligosacarit và collagen tripeptit (CTP) ii) làm thành phần hoạt tính của sáng chế làm giảm đáng kể sự biểu hiện của các xytokin liên quan đến đáp ứng viêm và làm giảm sự mất nước qua biểu bì, chỉ số ban đỏ, hoặc yếu tố tương tự. Do đó, chế phẩm của sáng chế có hiệu quả rất tốt trong việc tăng cường chức năng của hàng rào bảo vệ da, bảo vệ da khỏi bị kích thích, và làm giảm sự kích ứng da.

Sự cải thiện tình trạng của da của sáng chế là như được xác định trong các chế phẩm đã mô tả trên đây.

Theo phương án của sáng chế, chế phẩm của sáng chế có thể chứa không chỉ galacto-oligosacarit (GOS) i) hoặc galacto-oligosacarit và collagen tripeptit (CTP) ii) làm thành phần hoạt tính của sáng chế, mà còn chứa các thành phần thường được sử dụng trong chế phẩm mỹ phẩm, ví dụ, các chất mang, và chất phụ trợ thông thường, như chất chống oxy hóa, chất ổn định, chất hòa tan, vitamin, chất màu và chất tạo hương vị.

Để làm các chất mang, nước tinh khiết, các rượu một lần (etanol hoặc rượu propylic), các rượu polyhydric (glyxerol, 1,3-butylen glycol, hoặc propylen glycol), các axit béo cao (axit palmitic hoặc axit linolenic), các dầu (dầu mầm lúa mì, dầu cây hoa trà, dầu jojoba, dầu oliu, squalen, dầu hướng dương, dầu hạt macca, dầu cây lê tàu, lexitin được bổ sung nước đậu tương hoặc glyxerit của axit béo), và chất tương tự có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này. Nếu cần, chất hoạt động bề mặt, chất ổn định, chất chống oxy hóa, chất hấp thụ tia tử ngoại, chất kháng viêm, và chất phụ trợ có thể được thêm vào.

Để làm chất hoạt động bề mặt, polyoxyetylen, dầu thầu dầu hydro hóa, polyoxyetylen, oleyl ete, polyoxyetylen của axit monooleic, polyoxyetylen, glyxeryl monostearat, sorbitan của axit monostearic, polyoxyetylen axit monooleic, sorbitan, este

của axit béo và sucroza, hexaglycerin axit monolauric, lanolin được khử bằng polyoxyetylen, POE, axit glyxeryl pyroglutamic, axit isostearic, dieste, N-axetyl glutamin, isostearyl este, và chất tương tự có thể được sử dụng.

Để làm chất ổn định, hinokithiol, triclosan, muối của axit clohexidin gluconic, phenoxy etanol, resorxin, isopropylmetylphenol, azulen, axit salixylic, kẽm pyritaon, và chất tương tự có thể được sử dụng.

Để làm chất chống oxy hóa, chất bất kỳ trong số các chất butylhydroxyanisol, axit galic, propyl galat, và axit erythorbic có thể được sử dụng.

Để làm chất hấp thụ tia tử ngoại, chất bất kỳ từ các hợp chất benzophenon như dihydroxybenzophenon, melanin, etyl axit para-aminobenzoic, este 2-ethylhexyl của axit para-dimetyl amino benzoic, xynoxit, este 2-ethylhexyl của axit para-metoxi ximamic, 2-(2-hydroxy-5-metylphenyl)benzotriazol, axit urocanic, các vi hạt oxit kim loại, và chất tương tự có thể được sử dụng.

Để làm chất kháng viêm, dikali glyxyrhizinat, alantoin, hoặc chất tương tự có thể được sử dụng, và để làm chất phụ trợ, cồn ốt, 1-menthol, hoặc chất tương tự có thể được sử dụng.

Theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm mỹ phẩm của sáng chế có thể được bào chế ở dạng được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch, thuốc mỡ để sử dụng ngoài da, gel, kem, thuốc bột, nước cân bằng dưỡng da, nước cân bằng làm mềm da, gói, sản phẩm làm mềm, nước xúc dạng sữa, kem nền trang điểm, tinh dầu, ampun, ampun dưỡng tóc, sản phẩm điều trị da đầu, sản phẩm làm cân bằng cho tóc, sản phẩm dưỡng tóc, sản phẩm điều trị cho tóc, nước xúc tóc, dầu gội đầu, dầu xả, dầu gội đầu dưỡng tóc, gel bôi tóc, sáp vuốt tóc, keo xịt tóc, thuốc nhuộm tóc, xà phòng, dung dịch tẩy rửa, sản phẩm tắm, kem chống nắng, dầu chống nắng, huyền phù, nhũ tương, bột nhão, gel, nước xúc, bột, xà phòng, sản phẩm làm sạch chứa chất hoạt động bề mặt, dầu, phấn nền, phấn nền dạng nhũ, phấn nền dạng sáp, miếng dán, và dạng xịt, nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng này.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp cải thiện tình trạng của da,

phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chế phẩm chứa i) galacto-oligosacarit (GOS), hoặc ii) galacto-oligosacarit và collagen tripeptit (CTP).

Sự cải thiện tình trạng của da là dưỡng ẩm da, làm dịu da, làm giảm sự kích ứng da, giảm nếp nhăn trên da, ức chế sự tổn thương da do bức xạ tử ngoại gây ra, ức chế sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng, cải thiện độ đàn hồi của da, hoặc kháng viêm, nhưng không chỉ giới hạn ở các tác dụng này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “việc sử dụng” hoặc “sử dụng” để chỉ việc cho đối tượng (nghĩa là cá nhân) mắc bệnh đường hô hấp sử dụng trực tiếp lượng có hiệu quả điều trị của chế phẩm theo sáng chế, nhờ đó tạo ra chính lượng của chế phẩm này trong cơ thể của đối tượng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” là động vật có vú bao gồm người, chuột, chuột nhắt, chuột lang, chó, mèo, ngựa, bò, lợn, khỉ, hắc tinh tinh, khỉ mồm chó, khỉ Rhesus, và động vật tương tự. Cụ thể nhất, đối tượng của sáng chế là người.

Phương pháp cải thiện tình trạng của da theo sáng chế bao gồm bước sử dụng chế phẩm thực phẩm có các mục đích khác nhau theo khía cạnh của sáng chế, và do đó phần mô tả các nội dung trùng lặp giữa chúng được bỏ qua để tránh sự rườm rà quá mức của bản mô tả này.

#### Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm thực phẩm chức năng chứa galacto-oligosacarit (GOS) hoặc galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính. Các chế phẩm của sáng chế có hiệu quả rất tốt liên quan với các mục đích bao gồm ức chế sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng, làm giảm nếp nhăn trên da, cải thiện độ đàn hồi của da, chống oxy hóa, kháng viêm, hoặc dưỡng ẩm cho da, và do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi làm các chế phẩm thực phẩm chức năng cho các mục đích đã nêu trên đây.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thêm cùng với các phương án làm ví dụ. Các phương án làm ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế cụ thể hơn, và do đó, theo mục đích của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Trong toàn bộ bản mô tả này, ký hiệu “%” được sử dụng để thể hiện nồng độ của chất cụ thể, trừ khi được chỉ rõ cụ thể theo cách khác, để chỉ tỷ lệ % (theo trọng lượng) đối với chất rắn/chất rắn, tỷ lệ % (trọng lượng/thể tích) đối với chất rắn/chất lỏng, và tỷ lệ % (theo thể tích) đối với chất lỏng/chất lỏng.

### Nguyên liệu và chất phản ứng

Galacto-oligosacarit (GOS) và collagen-tripeptit (CTP) được sử dụng được công ty Neo Crema Co., Ltd tặng. Galacto-oligosacarit được cung cấp gồm 0,5% glucoza, 1,8% galactoza, 21,7% lactoza, 20,4% disacarit trong các thành phần galacto-oligosacarit, 30,6% trisacarit trong các thành phần galacto-oligosacarit, và 25,0% tetra-sacarit hoặc sacarit cao hơn trong các thành phần galacto-oligosacarit. GOS và CTP được sử dụng theo sáng chế được hòa tan một mình hoặc dưới dạng hỗn hợp với tỷ lệ khác nhau trong nước cất trước khi sử dụng.

### Động vật

Tổng cộng có bảy nhóm thử nghiệm (sáu con/nhóm) được xác định là nhóm đối chứng bình thường (bình thường, không chiếu tia UVB), nhóm đối chứng âm (đối chứng, có chiếu tia UVB), nhóm điều trị bằng GOS một mình (GOS 200 mg/kg, có chiếu tia UVB) và nhóm điều trị bằng CTP một mình (CTP 200 mg/kg, có chiếu tia UVB), nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 (GOS/CTP 50:150 mg/kg, có chiếu tia UVB), nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 (100:100 mg/kg, có chiếu tia UVB), và nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1 (GOS/CTP 150:50 mg/kg, có chiếu tia UVB).

Các động vật thử nghiệm, chuột đực SKH-1 không có lông (SkH: HR-1), được mua từ công ty Orient Bio, và nuôi trong lồng. Các con chuột được duy trì ở nhiệt độ

22±2°C với độ ẩm tương đối là 50±10% theo chu kỳ ngày/đêm 12 giờ. Các con chuột được cho ăn thực phẩm và nước uống tùy ý.

Tất cả các thử nghiệm đã được Ủy ban sử dụng và chăm sóc động vật thể chế của Đại học Hàn Quốc phê chuẩn, và được tiến hành theo Hướng dẫn về chăm sóc và sử dụng động vật phòng thí nghiệm (NRC).

Chuột được để cho thích nghi với môi trường trong một tuần, và sau đó gây ra sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng ở chuột của sáu nhóm, ngoại trừ nhóm đối chứng bình thường (NOR) bằng cách cho da lưng của chúng tiếp xúc với bức xạ tử ngoại ba lần một tuần trong 8 tuần thông qua thiết bị chiếu bức xạ tử ngoại (BLX-E254, Vilber Lourmat, Pháp) được trang bị đèn tử ngoại-UVB (T-8M; Vilber Lourmat, Pháp) (Hong et al., 2015). Đối với liều dùng của bức xạ tử ngoại, liều dùng bức xạ bên trong thiết bị bức xạ tử ngoại được xác định bằng thiết bị đo ánh sáng UV (UV-340; Lutron, Đài Loan và được điều chỉnh, và sau đó, liều dùng của UVB được kiểm soát như được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

| Tuần          | 1     | 2     | 3     | 4~8   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| Liều dùng UVB | 1 MED | 2 MED | 3 MED | 4 MED |

\*1 MED = 75 mJ/cm<sup>2</sup>

Trong 8 tuần kể từ ngày bắt đầu chiếu tia UV, nhóm đối chứng bình thường (NOR) và nhóm đối chứng âm (CON) chỉ được cho sử dụng nước uống qua đường miệng, và các nhóm điều trị bằng mẫu được cho sử dụng mẫu trộn với nước uống qua đường miệng theo nồng độ sau khi được cân trọng lượng. Sau khi kết thúc 8 tuần chiếu ánh sáng tử ngoại và sử dụng GOS và CPT một mình hoặc mẫu hỗn hợp, mỗi con chuột bị giết.

Ví dụ 1: lượng sử dụng nước uống và thực phẩm

Để đánh giá hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế đối với mức độ hấp thu thực phẩm và nước uống của chuột, các tác giả sáng chế đã xác định lượng sử dụng thực phẩm và nước uống mỗi tuần một lần trong khi chiếu ánh sáng tử ngoại vào chuột và cho chuột sử dụng các mẫu.

Fig.1A thể hiện lượng sử dụng thực phẩm của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.1B thể hiện lượng sử dụng nước uống của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Như được thể hiện trên Fig.1A, nhóm sử dụng GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1 có lượng sử dụng thực phẩm là 19,14 g/ngày, lượng này có xu hướng tăng lên so với 16,62 g/ngày, là lượng sử dụng thực phẩm trung bình của tất cả các nhóm thử nghiệm, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Như được thể hiện trên Fig.1B, lượng sử dụng nước tăng lên ở các nhóm sử dụng mẫu có chiếu UVB, ngoại trừ nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1, so với nhóm NOR, và trong số các nhóm này, lượng sử dụng nước của nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 là 18,36 ml/ngày, điều này cho thấy giá trị cao đáng kể ( $p < 0,05$ ).

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng giữ nước, sự mất nước qua biểu bì (TEWL), và giá trị ban đỏ

Để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm của sáng chế đối với tình trạng của da, các tác giả sáng chế đã xác định khả năng giữ nước, sự mất nước qua biểu bì (TEWL), và ban đỏ của da lưng chuột, được chiếu ánh sáng tử ngoại, bằng cách sử dụng thiết bị Multi Probe Adapter® MPA 6 (Courage und Khazaka, Đức). Phép đo da được thực hiện trên tất cả các nhóm trước khi bắt đầu chiếu tia tử ngoại, và phép đo da được thực hiện mỗi tuần từ thời điểm 4 tuần sau khi chiếu tia tử ngoại để khẳng định sự khác biệt đáng kể về các kết quả của phép đo da giữa nhóm NOR và nhóm CON. Đối với các kết quả của phép đo da, sự so sánh giữa kết quả của phép đo lần cuối vào ngày trước khi bị giết và kết quả của phép đo đối với da ban đầu trước khi chiếu tia tử ngoại và kết quả của phép đo lần cuối được thể hiện trên các biểu đồ.

Khả năng giữ nước của da

Fig.2A thể hiện khả năng giữ nước của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.2B thể hiện sự thay đổi về khả năng giữ nước của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Như được thể hiện trên Fig.2A, khả năng giữ nước bị giảm đáng kể khoảng 1,61

lần ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm bình thường (NOR), và khả năng giữ nước tăng lên ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu so với nhóm CON. Đặc biệt là khả năng giữ nước được tăng lên đáng kể ở nhóm sử dụng GOS và nhóm sử dụng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 ( $p<0,05$ ).

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.2B, theo kết quả đánh giá sự thay đổi về khả năng giữ nước trước và sau khi chiếu tia tử ngoại, xác định được sự giảm đáng kể ở nhóm sử dụng CON so với nhóm sử dụng NOR. Sự thay đổi về khả năng giữ nước được tăng lên đáng kể ở nhóm chỉ điều trị bằng CTP và nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1, và đặc biệt là nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 có sự thay đổi về khả năng giữ nước ở mức độ tương tự với khả năng giữ nước của nhóm NOR ( $p<0,05$ ).

#### Sự mất nước qua biểu bì

Fig.3A thể hiện sự mất nước qua biểu bì của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Fig.3B thể hiện sự thay đổi về sự mất nước qua biểu bì của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Như được thể hiện trên Fig.3A, sự mất nước qua biểu bì tăng lên đáng kể khoảng 3,99 lần ở nhóm đối chứng (CON) so với nhóm bình thường (NOR) ( $p<0,05$ ). Tất cả các nhóm sử dụng mẫu đều có sự giảm đáng kể về mức độ mất nước qua biểu bì so với nhóm CON, và đặc biệt là nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 có sự thay đổi về mức độ mất nước qua biểu bì ở mức độ tương tự với mức độ mất nước qua biểu bì của nhóm NOR ( $p<0,05$ ).

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.3B, kết quả đánh giá sự thay đổi về mức độ mất nước qua biểu bì trước và sau khi chiếu tia tử ngoại, tất cả các nhóm có chiếu tia UVB, ngoại trừ nhóm NOR, đều có xu hướng tăng lên, và tất cả các nhóm sử dụng mẫu đều có sự giảm đáng kể so với nhóm CON ( $p<0,05$ ).

#### Giá trị ban đỏ

Như được thể hiện trên Fig.4A, giá trị ban đỏ được tăng lên đáng kể khoảng 1,60 lần ở nhóm CON so với nhóm NOR ( $p<0,05$ ), và giá trị ban đỏ trong các nhóm sử dụng mẫu không có thay đổi đáng kể so với nhóm CON.

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.4B, kết quả đánh giá sự thay đổi về giá trị ban đo trước và sau khi chiếu tia tử ngoại, giá trị ban đo được tăng lên đáng kể ở tất cả nhóm có chiếu UVB, ngoại trừ NOR ( $p < 0,05$ ). Trong số các giá trị này, sự thay đổi về giá trị ban đo có xu hướng giảm đi ở các nhóm sử dụng GOS và CTP một mình và nhóm sử dụng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 so với nhóm CON, nhưng không có sự khác biệt đáng kể.

Từ các kết quả trên đây, đã xác định được rằng tất cả các đặc tính về khả năng giữ nước, sự mất nước qua biểu bì, và giá trị ban đo đều có tác dụng tích cực khi sử dụng GOS/CTP với tỷ lệ trộn 1:1 và 3:1 so với khi sử dụng COS và CTP một mình. Do đó, có thể thấy rằng chế phẩm chứa hỗn hợp của GOS và CTP theo sáng chế có thể phòng ngừa sự mất nước qua da và sự tổn thương hàng rào bảo vệ da, do ánh sáng tử ngoại gây ra, và có thể trợ giúp chức năng bình thường của hàng rào bảo vệ da.

### Ví dụ 3: Trọng lượng của cơ quan

Để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm theo sáng chế đối với trọng lượng của cơ quan, các tác giả sáng chế đã thu hoạch các cơ quan (gan, tim, thận, lách) để xác định trọng lượng của chúng để đánh giá độc tính và trạng thái bình thường hoặc trạng thái bất thường sau khi sử dụng các mẫu GOS và CTP. Khi kết thúc thử nghiệm, các cơ quan tương ứng được thu hoạch, và trọng lượng (tính theo mg) của gan, tim, thận, và lách thu hoạch được được tính toán khi tính đến trọng lượng cơ thể (tính theo g) của chuột trong mỗi nhóm thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

| mg/g trọng lượng cơ thể | Gan       | Tim       | Thận      | Lách      |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| NOR                     | 5,59±0,18 | 0,50±0,03 | 2,08±0,12 | 0,27±0,02 |
| CON                     | 5,86±0,13 | 0,60±0,05 | 1,97±0,11 | 0,34±0,02 |
| GOS                     | 5,49±0,31 | 0,50±0,01 | 1,93±0,09 | 0,31±0,03 |
| CTP                     | 4,94±0,16 | 0,48±0,01 | 1,91±0,06 | 0,14±0,01 |

|     |           |           |           |           |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1:3 | 5,27±0,33 | 0,56±0,01 | 2,08±0,10 | 0,12±0,01 |
| 1:1 | 5,14±0,10 | 0,50±0,02 | 1,92±0,07 | 0,12±0,01 |
| 3:1 | 4,37±0,25 | 0,46±0,03 | 1,76±0,10 | 0,11±0,01 |

Như được thể hiện trong Bảng 2 trên đây, trọng lượng của thận và lách không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm thử nghiệm, và trọng lượng của gan và tim có sự khác biệt đáng kể nhất định giữa các nhóm, nhưng không có sự khác biệt tương đối so với nhóm NOR.

Ví dụ 4: Quan sát da bằng mắt thường và phân tích các bản sao của da

Để đánh giá hiệu quả làm giảm nếp nhăn của các chế phẩm theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã chụp ảnh da lưng của chuột, và phân tích diện tích, số lượng, độ dài, độ sâu, và dấu hiệu tương tự của các nếp nhăn bằng cách sử dụng các bản sao thu được bằng thiết bị Visioline (VL650; CK electronic GmbH, Đức) để phân tích các mẫu nếp nhăn. Kết quả được thể hiện trên các hình vẽ Fig.5 và Fig.6A và Fig.6B.

Kết quả phân tích các dấu hiệu chỉ báo của các mẫu nếp nhăn thông qua các hình vẽ Fig.6A và Fig.6B, nhóm đối chứng âm (CON) có sự gia tăng đáng kể về diện tích và độ sâu của nếp nhăn so với nhóm đối chứng bình thường (NOR) ( $p<0,05$ ). Việc sử dụng các chế phẩm của sáng chế có xu hướng giảm đáng kể về các dấu hiệu chỉ báo của mẫu nếp nhăn so với nhóm CON, và đặc biệt là giữa các chế phẩm, nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 có sự giảm đáng kể về diện tích và độ sâu nếp nhăn lớn nhất ( $p<0,05$ ).

Do đó, đã xác định được rằng việc sử dụng GOS và chế phẩm chứa hỗn hợp của GOS và CTP theo sáng chế có hiệu quả ức chế đối với sự tạo nếp nhăn do UVB, và đặc biệt là việc sử dụng hỗn hợp của GOS và CTP với tỷ lệ 1:3 có hiệu quả đáng kể đối với sự giảm vết nhăn.

Từ các kết quả trên đây, đã xác định được rằng các nếp nhăn trên da do bức xạ tử ngoại tạo ra được giảm đi ngay cả khi sử dụng GOS và CTP một mình, nhưng việc sử dụng GOS/CTP với tỷ lệ 1:3 có hiệu quả làm giảm đáng kể nhất đối với vết nhăn do sự

lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng tạo ra.

#### Ví dụ 5: Phân tích mô bệnh học của da – độ dày biểu bì và phép đo collagen

Để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm theo sáng chế đối với độ dày biểu bì và mức độ biểu hiện của collagen, sau các thử nghiệm chiếu tia tử ngoại và sử dụng chế phẩm, các tác giả sáng chế đã thu thập da lưng của tất cả các con chuột và cho da lưng này vào formalin 10%, và sau đó tiến hành nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E), nhờ đó sự thay đổi về mô bệnh học có thể được xác định và tiến hành nhuộm hoá mô miễn dịch (IHC) nhờ đó collagen có mặt trong chân bì có thể được xác định. Các mô đã nhuộm màu được chụp ảnh bằng kính hiển vi, được chụp ảnh, và sau đó được phân tích.

Như được thể hiện trên Fig.7 và Fig.8, các kết quả nhuộm bằng thuốc nhuộm H&E đã cho thấy rằng độ dày biểu bì được tăng lên đáng kể ở nhóm chiếu UVB so với nhóm đối chứng bình thường (NOR) ( $p<0,05$ ). Cũng đã xác định được rằng độ dày biểu bì được giảm đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu so với nhóm CON, và đặc biệt là các nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 và 3:1 có xu hướng làm giảm đáng kể về độ dày biểu bì so với các nhóm chỉ điều trị bằng một chất ( $p<0,05$ ).

Trong thí nghiệm này, theo kết quả quan sát mô bệnh học của da, độ dày biểu bì được tăng lên khoảng 4 lần ở nhóm chiếu UV so với nhóm đối chứng, và độ dày này có xu hướng giảm đi ở các nhóm điều trị bằng hỗn hợp các chất so với các nhóm chỉ điều trị bằng GOS và CTP (Fig.7 và Fig.8).

Hơn nữa, kết quả nhuộm bằng phương pháp IHC đối với collagen, tỷ lệ của collagen trong chân bì bị giảm đáng kể ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm bình thường (NOR) ( $p<0,05$ , Fig.7). Tỷ lệ của collagen trong chân bì được tăng lên đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu so với nhóm CON, và đặc biệt là tỷ lệ của collagen trong chân bì được tăng lên đáng kể nhất ở nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 ( $p<0,05$ ).

#### Ví dụ 6: Phép đo elastin

Elastin, thành phần của chân bì da, chất đàn hồi làm ảnh hưởng đến độ đàn hồi của

mô da, và khi da bị lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng, elastin bị giảm đi về số lượng và đường kính, dẫn đến sự giảm độ đàn hồi của da. Để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm của sáng chế đối với độ đàn hồi của da, các tác giả sáng chế đã chiết khoảng 10mg mô da của mỗi nhóm thử nghiệm, và sau đó lượng elastin trong mô da được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được cung cấp từ thử nghiệm Fastin Elastin (F2000; Biocolor, Vương Quốc Anh).

Như được thể hiện trên Fig.11, hàm lượng elastin có xu hướng tăng lên ở tất cả các nhóm được cho sử dụng chế phẩm của sáng chế, so với nhóm CON, và đặc biệt là được tăng lên đáng kể khi điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1 so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ).

Từ các kết quả trên đây, đã xác định được rằng việc sử dụng qua đường miệng không chỉ chế phẩm chỉ chứa GOS mà cả chế phẩm chứa cả GOS và CTP, đặc biệt là chế phẩm chứa GOS/CTP với tỷ lệ trộn bằng 3:1 làm gia tăng hàm lượng elastin bị giảm do tia UV, và do đó hiệu quả tăng cường độ đàn hồi có thể được cho là do sự cải thiện cấu trúc dạng lưới của lớp chân bì da.

Ví dụ 7: Phân tích mức độ biểu hiện của gen liên quan đến da bằng cách sử dụng phương pháp qRT-PCR

Để đánh giá hiệu quả của các chế phẩm theo sáng chế đối với sự biểu hiện của các gen liên quan đến tình trạng của da, các tác giả sáng chế đã xác định mức độ biểu hiện của collagen typ I, các cơ chất metaloproteinaza (MMP) 2/3/9, TIMP1/2, hyaluronidaza (HYAL), và NF-K so với GAPDH.

Cụ thể, khoảng 100mg mô da được thu gom từ mỗi con chuột của các nhóm thử nghiệm được cho sử dụng các chế phẩm của sáng chế, và ARN toàn phần được phân lập bằng cách sử dụng chất phản ứng TRIzol. ARN phân lập được được bổ sung đoạn môi Oligo-(dT) 50 $\mu$ M và hỗn hợp dNTP 10mM, sau đó tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 65°C trong 5 phút, và tiếp đó chất đệm RT 5X, DTT 0,1M, RNaseOUT, SuperScript III, và MgCl<sub>2</sub> 25mM được bổ sung kèm theo khuấy, sau đó tiến hành phản ứng trong điều kiện ở nhiệt độ 50°C trong 50 phút và ở nhiệt độ 85°C trong 5 phút. RNaza H được thêm vào và

ủ hỗn hợp ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút, nhờ đó tổng hợp cADN từ mARN. Để thực hiện phản ứng PCR, 1µl cADN tổng hợp được trộn lẫn với các đoạn môi, hỗn hợp nước cái để biểu hiện gen màu xanh lá cây SYBR, và nước DEPC, sau đó tiến hành phản ứng qPCR. Các đoạn môi của mỗi gen đích được thể hiện trên Fig.3. Mức độ biểu hiện của mỗi gen đích được thể hiện theo mức độ biểu hiện tương đối so với nhóm NOR.

Bảng 3

| Gen đích | Phân loại | Trình tự của đoạn môi PCR (từ đầu 5' đến đầu 3') | SEQ ID NO |
|----------|-----------|--------------------------------------------------|-----------|
| MMP2     | F         | CAA GGA TGG ACT CCT GGC ACA T                    | 1         |
|          | R         | TAC TCG CCA TCA GCG TTC CCA T                    | 2         |
| MMP3     | F         | TTC TGG GCT ATA CGA GGG CA                       | 3         |
|          | R         | CTT CTT CAC GGT TGC AGG GA                       | 4         |
| MMP9     | F         | GCT GAC TAC GAT AAG GAC GGC A                    | 5         |
|          | R         | TAG TGG TGC AGG CAG AGT AGG A                    | 6         |
| TIMP1    | F         | TCT TGG TTC CCT GGC GTA CTC T                    | 7         |
|          | R         | GTG AGT GTC ACT CTC CAG TTT GC                   | 8         |
| TIMP2    | F         | AGC CAA AGC AGT GAG CGA GAA G                    | 9         |
|          | R         | GCC GTG TAG ATA AAC TCG ATG TC                   | 10        |
| COL1a1   | F         | CCT CAG GGT ATT GCT GGA CAA C                    | 11        |
|          | R         | CAG AAG GAC CTT GTT TGC CAG G                    | 12        |
| HYAL     | F         | AAG TAC CAA GGA ATC ATG CC                       | 13        |
|          | R         | CTC AGG ATA ACT TGG ATG GC                       | 14        |
| NF-Kb    | F         | TTG TGC CAA GAG TGA TGA CG                       | 15        |
|          | R         | CTG AAA TCC CAT GTC CTG CT                       | 16        |
| GAPDH    | F         | CAT CAC TGC CAC CCA GAA GAC TG                   | 17        |
|          | R         | ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AG                   | 18        |

### Metaloproteinaza (MMP)

Theo kết quả xác định mức độ biểu hiện gen của collagenaza MMP 2, mức độ biểu hiện của MMP 2 được tăng lên khoảng 1,21 lần ở nhóm CON so với nhóm NOR và có xu hướng giảm đi ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu (Fig.12). Đặc biệt là mức độ biểu hiện được giảm đáng kể ở các nhóm sử dụng GOS và CTP một mình và nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1 so với nhóm CON ( $p<0,05$ ).

Theo kết quả xác định mức độ biểu hiện gen của MMP 3, mức độ biểu hiện gen của MMP 3 có xu hướng giảm đi ở nhóm sử dụng GOS một mình và nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1 so với nhóm CON, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (Fig.13).

Theo kết quả xác định mức độ biểu hiện gen của MMP 9 để quan sát dấu hiệu chỉ báo của khả năng thoái biến khuôn nền ngoại bào của mô da, mức độ biểu hiện gen của MMP 9 được tăng lên đáng kể khoảng 6,31 lần ở nhóm CON so với nhóm NOR, và được giảm đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu so với nhóm CON ( $p<0,05$ , Fig.14). Trong số các nhóm sử dụng mẫu, các nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP có sự giảm mức độ biểu hiện so với các nhóm điều trị bằng GOS và CTP một mình, và đặc biệt là việc điều trị bằng hỗn hợp theo tỷ lệ 3:1 có sự giảm đáng kể so với nhóm CON cho thấy mức độ tương tự với mức độ này ở nhóm NOR ( $p<0,05$ ).

Mức độ biểu hiện gen của MMP 13 tăng lên đáng kể khoảng 5,42 lần ở nhóm CON so với nhóm NOR, và được giảm đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu so với nhóm CON ( $p<0,05$ , Fig.15). Đặc biệt là việc điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 và 3:1 có sự giảm đáng kể so với nhóm CON cho thấy mức độ tương tự so với mức độ này ở nhóm NOR ( $p<0,05$ ).

Từ các kết quả trên đây, đã xác định được rằng sự biểu hiện của MMP do sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng gây ra được giảm đi khi điều trị bằng hỗn hợp GOS và CTP chứ không phải điều trị bằng GOS và CTP một mình, và đặc biệt là sự biểu hiện của MMP-13, đóng vai trò quan trọng trong sự tạo ra nếp nhăn ở thời điểm sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng, được giảm đáng kể ở nhóm điều trị bằng GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1.

### Chất ức chế mô của metaloproteinaza (TIMP)

Kết quả xác định mức độ biểu hiện gen TIMP 1, mức độ biểu hiện của TIMP 1 được tăng lên đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng mẫu so với nhóm CON ( $p < 0,05$ , Fig.16). Đặc biệt là mức độ biểu hiện của TIMP 1 được tăng lên đáng kể ở nhóm sử dụng GOS và CTP một mình và nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 so với nhóm CON ( $p < 0,05$ , Fig.16).

Mức độ biểu hiện của TIMP 2 tăng lên ở các nhóm điều trị bằng mẫu so với nhóm CON, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (Fig.17).

Từ kết quả trên đây có thể thấy rằng chế phẩm chứa GOS và chế phẩm chứa GOS và CTP của sáng chế kích thích sự biểu hiện của TIMP 1, đặc biệt là làm giảm hoạt tính của MMP và sự phân rã của các protein khuôn nền ngoại bào, và do đó ngăn chặn sự tạo ra nếp nhăn do sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng gây ra.

### Colagen typ I (COL1a1)

Như được thể hiện trên Fig.18, kết quả xác định mức độ biểu hiện gen của COL1a1, nhóm CON không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện của COL1a1 so với nhóm NOR, và mức độ biểu hiện của COL1A1 có xu hướng tăng lên ở nhóm được điều trị bằng các chế phẩm của sáng chế. Đặc biệt là việc điều trị bằng chế phẩm chứa GOS/CTP với tỷ lệ 1:3 có sự gia tăng đáng kể về mức độ biểu hiện của collagen typ I khoảng 1,22 lần so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ).

Trong số các protein của khuôn nền ngoại bào trong mô liên kết của da, collagen typ I là phong phú nhất, và ngoài elastin, fibronectin, integrin, fibrillin, proteoglycan, và chất tương tự có mặt. Procollagen mới tổng hợp được tiết vào khoảng ngoại bào của tế bào da thông qua phản ứng enzym, để nhờ đó tạo ra các vi sợi với cấu trúc chuỗi xoắn bộ ba, và các vi sợi tạo thành các sợi collagen để có độ liên kết và độ đàn hồi của da

Sự giảm các sợi collagen trong lớp da do sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng hoặc sự lão hóa nội tại gây ra sự lõm của mô dẫn đến các nếp nhăn, sự chảy xệ của da, và sự mất độ đàn hồi.

Từ các kết quả trên, rõ ràng là việc điều trị bằng chế phẩm GOS và GOS và CTP

của sáng chế làm gia tăng mức độ biểu hiện gen của collagen typ I, điều này cho thấy rằng các chế phẩm của sáng chế có hiệu quả trong việc làm giảm nếp nhăn và tăng cường độ đàn hồi.

#### Hyaluronidaza (HYAL)

Fig.19 thể hiện mức độ biểu hiện mRNA của hyaluronidaza của mô da của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Theo kết quả xác định mức độ biểu hiện gen của gen hyaluronidaza HYAL, mức độ biểu hiện được tăng lên đáng kể khoảng 1,30 lần ở nhóm CON so với nhóm NOR, và có xu hướng giảm đi ở tất cả các nhóm sử dụng chế phẩm (Fig.19). Đặc biệt là việc điều trị bằng chế phẩm chứa GOS/CTP được trộn với tỷ lệ 1:3 có sự giảm đáng kể về mức độ biểu hiện của HYAL khoảng 0,61 lần so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ).

Ví dụ 8: Phân tích xytokin liên quan đến tình trạng viêm bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA

Để đánh giá hiệu quả cải thiện chức năng miễn dịch hoặc kháng viêm của các chế phẩm theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã chiết mô da để xác định hàm lượng của các xytokin gây viêm IL-6, IL-12, và TNF- $\alpha$  bằng cách sử dụng kit ELISA (BD Bioscience, San Jose, CA) đối với mỗi nhóm thử nghiệm. Nồng độ protein được phân tích từ các chất chiết mô bằng phương pháp BCA và các xytokin liên quan đến tình trạng viêm được thể hiện dưới dạng hàm lượng trong mỗi mg protein.

Như được thể hiện trên Fig.20, nồng độ intolokin-6 (IL-6) tăng lên đáng kể ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm bình thường (NOR), và được giảm đi ở nhóm điều trị bằng hỗn hợp GOS/CTP được trộn theo tỷ lệ 1:3 so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ).

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.21, theo kết quả xác định nồng độ intolokin-12 (IL-12), nồng độ IL-12 tăng lên đáng kể ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm đối chứng dương (NOR), và được giảm đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng chế phẩm so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ). Xác định được hiệu quả hiệp đồng về sự giảm nồng độ tiết ra IL-12 ở tất cả các chế phẩm hỗn hợp, và đặc biệt là nhóm điều trị bằng hỗn hợp

GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 có mức giảm nồng độ IL-12 lớn nhất.

Như được thể hiện trên Fig.22, theo kết quả xác định TNF- $\alpha$ , nồng độ TNF- $\alpha$  tăng lên đáng kể ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm đối chứng bình thường (NOR) ( $p<0,05$ ). Từ các kết quả trên đây, cũng đã xác định được rằng nồng độ TNF- $\alpha$  được giảm đáng kể ở tất cả các nhóm sử dụng chế phẩm so với nhóm đối chứng âm (CON), và xác định được hiệu quả hiệp đồng về sự giảm nồng độ tiết ra TNF- $\alpha$  ở tất cả các chế phẩm hỗn hợp. Đặc biệt là đã xác định hiệu quả đáng kể ở nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP ( $p<0,05$ ).

Từ các kết quả trên đây, đã xác định được rằng sự giảm nồng độ các xytokin tiền viêm IL-6, IL-12, và TNF- $\alpha$  ở tất cả các nhóm sử dụng chế phẩm, và đặc biệt là đã xác định được hiệu quả hiệp đồng về sự giảm nồng độ xytokin khi GOS/CTP được bổ sung vào hỗn hợp. Do đó, chế phẩm chứa GOS và chế phẩm chứa GOS và CTP của sáng chế làm giảm mức độ đáp ứng viêm của da, và do đó có thể được sử dụng theo cách có lợi làm chế phẩm để cải thiện chức năng miễn dịch hoặc kháng viêm.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm để kháng viêm có hiệu quả hiệp đồng với tất cả các tỷ lệ của GOS và CTP nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1.

Ví dụ 9: Phân tích axit béo mạch ngắn (SCFA) bằng cách sử dụng phương pháp GC

Manh tràng của chuột được thu hoạch và chiết bằng metanol, và sau đó chất chiết được phân tích về SCFA bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký khí (Agilent Technologies, CA, Mỹ) được trang bị cột GC (DB-FFAP 123-3253, 50m $\times$ 0,32mm $\times$ 0,50 $\mu$ M). Nhiệt độ cột được thiết lập để duy trì ở mức 100°C trong 1 phút, tăng đến nhiệt độ 180°C với tốc độ 8°C/phút, sau đó tăng nhiệt độ đến 200°C với tốc độ 20°C/phút, và tiếp đó dừng ở nhiệt độ 200°C trong 5 phút. Hàm lượng SCFA trong manh tràng được phân tích thông qua các chất chuẩn gồm axit axetic, axit propionic, và axit butyric.

Kết quả được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.23 đến Fig.27.

Theo kết quả phân tích hiệu quả của các mẫu GOS và CTP đối với sự tạo ra axit béo mạch ngắn bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký khí, hàm lượng axit axetic bị

giảm đáng kể ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm đối chứng bình thường (NOR) (Fig.23). Tuy nhiên, hàm lượng axit axetic được tăng lên đáng kể ở nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 so với nhóm CON ( $p<0,05$ ).

Hàm lượng axit propionic giảm đi ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm đối chứng bình thường (NOR), nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm. (Fig.24). Hàm lượng axit propionic có xu hướng tăng lên ở các nhóm sử dụng GOS và CTP một mình so với nhóm CON, nhưng không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Hàm lượng axit butyric giảm đi ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm đối chứng bình thường (NOR) (Fig.25). Hàm lượng axit butyric tăng lên ở các nhóm không phải nhóm điều trị bằng hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 3:1, và đặc biệt là được tăng lên đáng kể ở nhóm điều trị bằng GOS và CTP một mình.

Hàm lượng axit valeric có xu hướng giảm đi ở nhóm đối chứng âm (CON) so với nhóm đối chứng bình thường (NOR) (Fig.26), và trong số các nhóm sử dụng mẫu, nhóm điều trị bằng CTP một mình có sự tăng lên đáng kể về hàm lượng axit valeric so với nhóm CON ( $p<0,05$ ).

Theo kết quả phân tích hàm lượng axit béo mạch ngắn, nhóm đối chứng âm (CON) có hàm lượng thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng bình thường (NOR), và nhóm điều trị bằng GOS có hàm lượng cao hơn đáng kể so với nhóm CON ( $p<0,05$ ), và nhóm điều trị bằng CTP một mình và hỗn hợp của GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 có xu hướng tăng lên (Fig.27).

Đã biết rằng sự lên men của các chất xơ thực phẩm trong ruột bởi các vi khuẩn đường ruột sản sinh ra axit béo mạch ngắn, chủ yếu là axit axetic, axit propionic, và axit butyric, và các axit béo mạch ngắn này được hấp thu nhanh chóng vào niêm mạc ruột và được sử dụng làm nguồn năng lượng chính cho các tế bào niêm mạc ruột kết (Thompson DB, 2000).

Theo kết quả của nghiên cứu này, lượng axit béo mạch ngắn bị giảm đáng kể do sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng, và do đó mối tương quan giữa vi khuẩn ở da và vi khuẩn ở ruột được xác định, và để khắc phục sự giảm này, lượng axit béo mạch ngắn

được tăng lên khi sử dụng GOS và CTP, và do đó các mối tương quan của chúng với hiệu quả cải thiện môi trường ở ruột và hiệu quả bảo vệ da được xác định. Thông qua nghiên cứu trong tương lai, sự thay đổi về hệ vi khuẩn đường ruột cần được phân tích để đánh giá mối tương quan giữa vi khuẩn ở da và vi khuẩn ở ruột và hiệu quả của việc sử dụng GOS và CTP đối với sự thay đổi môi trường ở ruột.

Ví dụ 10: Phân tích sự thay đổi của hệ vi khuẩn đường ruột

Manh tràng của chuột được thu hoạch, và được chiết bằng cách sử dụng kit chiết ADN i-genome clinic. Thư viện 16S rARN được tạo cấu trúc theo quy trình của Amplicon 16S V3~V4 Illumina (Illumina, San Diego, CA, Mỹ). Vùng V3-V4 của 16S rARN được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza thứ nhất (PCR-1) bằng cách sử dụng chất chiết ADN, và sản phẩm PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng các hạt XP Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, CA, Mỹ), và các amplicon đã rửa được định lượng. Sản phẩm PCR được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR thứ hai (PCR-II) với trình tự thích ứng chỉ số kép Illumina, và thư viện amplicon cuối được giải trình tự bằng cách sử dụng kit 600 chu trình, v3 và hóa học giới hạn 301 cặp bazơ. Phép phân tích số liệu trình tự được thực hiện bằng phần mềm QIIME 2, và sau đó việc lọc chất lượng được thực hiện. Các homopolyme được loại bỏ ra khỏi QIIME pipeline, và tập hợp trình tự làm đại diện được chọn lọc bằng cách sử dụng UCLUST ở mức độ tính tương đồng bằng 97,0%, và sự phân cụm được thực hiện. Các đơn vị phân loại hữu hiệu (operational taxonomic unit: OTU) của trình tự được phân tích, và phép phân tích tính đa dạng alpha bao gồm chỉ số Shannon, Richness, và chỉ số công cụ ước tính mức độ phù hợp dựa trên mức độ phong phú (Abundance-based Coverage Estimator: ACE). Đối với tính đa dạng beta trong và giữa các nhóm, khoảng cách đo UniFrac được phân tích, và các kết quả này được thể hiện bằng phương pháp phân tích tọa độ chính (principal coordinate analysis: PCoA). Đối với các biến số trong nhóm có cùng thành phần của hỗn hợp hệ vi khuẩn đường ruột (OTU), sự tương quan giữa các phương pháp được xác định bằng cách sử dụng hệ số tương quan Pearson. Kiểm định Kruskal-Wallis được thực hiện để phân tích tính đa dạng của hệ vi khuẩn đường ruột và sự khác biệt về mức độ phong

phú tương đối, và sự khác biệt về tính đa dạng beta được phân tích bằng kiểm định ANOSIM và phân tích phương sai đa biến hoán vị (PERMANOVA).

Bảng 4

Phân tích hệ vi sinh vật (Tóm tắt về tính đa dạng alpha)

| Tên mẫu         | OTU | ACE    | CHAO   | Jackknife |
|-----------------|-----|--------|--------|-----------|
| NOR 1           | 595 | 683,32 | 667,23 | 705,13    |
| NOR 2           | 658 | 706,74 | 699,64 | 737       |
| NOR 3           | 712 | 773,93 | 759,5  | 807       |
| CON 1           | 592 | 653,31 | 642,7  | 682       |
| CON 2           | 742 | 827,06 | 804,16 | 854       |
| CON 3           | 727 | 806,72 | 802,37 | 838,69    |
| GOS1            | 624 | 695,04 | 684,6  | 726       |
| GOS2            | 613 | 681,21 | 670,99 | 708       |
| GOS3            | 677 | 747,72 | 745,24 | 778,55    |
| CTP1            | 611 | 688,92 | 677,25 | 717       |
| CTP2            | 665 | 723,52 | 722,55 | 752       |
| CTP3            | 733 | 821,20 | 816,38 | 852,19    |
| GOS/CTP 1:3 (1) | 606 | 679,37 | 678,14 | 710,12    |
| GOS/CTP 1:3 (2) | 723 | 776,36 | 759,4  | 804       |
| GOS/CTP 1:3 (3) | 570 | 655,82 | 693,68 | 805,62    |
| GOS/CTP 1:1 (1) | 608 | 691,31 | 680,27 | 714,72    |
| GOS/CTP 1:1 (2) | 663 | 732,80 | 729,23 | 757,65    |
| GOS/CTP 1:1 (3) | 688 | 780,67 | 790,06 | 833,56    |
| GOS/CTP 3:1 (1) | 610 | 702,50 | 704,25 | 730,08    |
| GOS/CTP 3:1 (2) | 640 | 700,14 | 697,55 | 727       |
| GOS/CTP 3:1 (3) | 675 | 741,76 | 744,72 | 777,07    |

NOR: nhóm bình thường; CON: nhóm đối chứng UVB. Các số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn (n=6) và các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác biệt đáng kể với  $p < 0,05$  theo kiểm định Tukey.

Bảng 5

| Tên mẫu            | NPShannon | Shannon | Simpson | Tính đa dạng của sự<br>phát sinh giống loài | Tỷ lệ bao phủ<br>thư viện tốt (%) |
|--------------------|-----------|---------|---------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| NOR 1              | 4,03      | 4,01    | 0,06    | 803                                         | 99,71                             |
| NOR 2              | 4,15      | 4,15    | 0,05    | 927                                         | 99,89                             |
| NOR 3              | 4,04      | 4,02    | 0,09    | 920                                         | 99,83                             |
| CON 1              | 4,51      | 4,49    | 0,03    | 794                                         | 99,75                             |
| CON 2              | 4,32      | 4,31    | 0,05    | 930                                         | 99,81                             |
| CON 3              | 4,26      | 4,25    | 0,06    | 928                                         | 99,82                             |
| GOS1               | 4,39      | 4,37    | 0,04    | 827                                         | 99,71                             |
| GOS2               | 3,66      | 3,65    | 0,09    | 872                                         | 99,86                             |
| GOS3               | 3,91      | 3,9     | 0,08    | 911                                         | 99,86                             |
| CTP1               | 4,26      | 4,25    | 0,06    | 856                                         | 99,71                             |
| CTP2               | 4,2       | 4,19    | 0,05    | 931                                         | 99,89                             |
| CTP3               | 4,42      | 4,41    | 0,04    | 968                                         | 99,81                             |
| GOS/CTP<br>1:3 (1) | 4,55      | 4,53    | 0,03    | 821                                         | 99,72                             |
| GOS/CTP<br>1:3 (2) | 4,71      | 4,7     | 0,02    | 989                                         | 99,89                             |
| GOS/CTP<br>1:3 (3) | 3,36      | 3,35    | 0,1     | 788                                         | 99,78                             |
| GOS/CTP<br>1:1 (1) | 4,64      | 4,62    | 0,03    | 825                                         | 99,71                             |
| GOS/CTP<br>1:1 (2) | 4,49      | 4,49    | 0,04    | 959                                         | 99,88                             |
| GOS/CTP<br>1:1 (3) | 4,65      | 4,64    | 0,03    | 937                                         | 99,81                             |
| GOS/CTP            | 4,08      | 4,06    | 0,07    | 833                                         | 99,71                             |

|                    |      |      |      |     |       |
|--------------------|------|------|------|-----|-------|
| 3:1 (1)            |      |      |      |     |       |
| GOS/CTP<br>3:1 (2) | 4,07 | 4,06 | 0,06 | 885 | 99,87 |
| GOS/CTP<br>3:1 (3) | 3,69 | 3,68 | 0,1  | 905 | 99,83 |

NOR: nhóm bình thường; CON: nhóm đối chứng UVB. Các số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn ( $n=6$ ) và các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác biệt đáng kể với  $p<0,05$  theo kiểm định Tukey.

Bảng 4 và Bảng 5 thể hiện phần tóm tắt chung của tính đa dạng alpha trong phép phân tích quần thể của 21 mẫu. Giá trị trung bình của các giá trị thử nghiệm tương ứng được phát hiện là: OTU 653,90, ACE 727,12, CHAO 722,38, Jackknife 762,73, NPS Shannon 4,21, Shannon 4,20, Simpson 0,06, tính đa dạng của sự phát sinh giống loài 886,14, và tỷ lệ bao phủ thư viện tốt (%) 99,80.

#### So sánh quần thể vi khuẩn ở cấp độ giống

Theo kết quả phân tích quần thể vi khuẩn ở cấp độ giống, 470 cấp phân loại được phát hiện và phân loại theo 50 cấp phân loại đại diện. Các chế phẩm của quần thể vi khuẩn trong các mẫu chất phân tích được liệt kê theo thứ tự xuất hiện như sau.

Akkermansia, PAC000661\_g, Eubacterium\_g23, PAC000664\_g, PAC000198\_g, Sporobacter, Bacteroides, Lactobacillus, Pseudoflavonifractor, Eubacterium\_g17, PAC002367\_g, Parabacteroides, Oscillibacter, Ruminococcus.

Trong số 20 cấp phân loại ở cấp độ giống trên cùng, giống Akkermansia tương ứng với ngành *Verrucomicrobia* được phát hiện với tỷ lệ lớn hơn hoặc bằng 10% trong 10 mẫu (N1, CTP1, CTP2, CTP3, GOS/CTP 1:3 (1), (3), GOS/CTP 1:1 (1), (2), GOS/CTP 3:1 (1), (3)) và được phát hiện với tỷ lệ 22,77% trong mẫu GOS/CTP 1:3 (3). Tuy nhiên, giống *Akkermansia* được phát hiện với tỷ lệ nhỏ hơn hoặc bằng 0,2% trong tất cả các mẫu CON, có giá trị nhỏ nhất trong số các mẫu.

Giống *Bacteroides* được phát hiện với tỷ lệ lớn hơn hoặc bằng 10% trong bảy mẫu (N2, GOS1, 2, CTP3, GOS/CTP 1:3 (3), GOS/CTP 3:1 (1), (3)). Giống như giống

*Akkermansia*, giống *Bacteroides* được phát hiện với tỷ lệ 28,73% trong mẫu GOS/CTP 1:3 (3), có giá trị cao nhất, và được phát hiện với tỷ lệ 3,11% trong mẫu CON1, có giá trị thấp nhất.

So sánh mối quan hệ giữa các mẫu

Thử nghiệm PCoA

Để phân tích mối liên hệ của GOS và CTP với hệ vi sinh vật chức năng có lợi cho sức khỏe ở da và ruột, phép phân tích tọa độ chính (PCoA: thành phần chính) được thực hiện bằng cách sử dụng số liệu khoảng cách Unifrac đối với kết quả của quần thể ở cấp độ giống. Quần thể gồm 21 mẫu nằm rải rác và không tạo thành nhóm cụ thể.

Phân tích UPGMA

Theo kết quả phân tích theo cụm UPGMA, các mẫu có thành phần quần thể tương tự và các mẫu có thành phần quần thể khác nhau được xác định trong mỗi nhóm (Fig.28). Theo cách tương đối, thành phần quần thể là tương tự giữa các nhóm NOR, CON, và GOS, đặc biệt là giữa các nhóm NOR và GOS, và tương tự giữa nhóm CTP và nhóm hỗn hợp GOS/CTP.

Sự thay đổi về hệ vi khuẩn đường ruột

Sự thay đổi về ngành *Bacteroidetes* và *Firmicutes*

Sự thay đổi về ngành *Bacteroidetes* và *Firmicutes* bằng cách sử dụng hỗn hợp GOS/CTP qua đường miệng được xác định tương ứng (các hình vẽ từ Fig.29 đến Fig.31). Hệ vi khuẩn đường ruột của người bao gồm 50 ngành khác nhau hoặc nhiều hơn và trên 1000 loài vi khuẩn khác nhau hoặc nhiều hơn. Trong số này, có năm ngành chiếm ưu thế là: *Firmicutes* mà vi khuẩn *Lactobacillus* thuộc về, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* mà vi khuẩn *Bifidobacterium* thuộc về, *Proteobacteria*, và *Verrucomicrobia*. Trong số này, hai ngành là *Bacteroidetes* và *Firmicutes*, chiếm ưu thế và chiếm trên 80% của hệ vi khuẩn đường ruột bình thường. Mặc dù có tính đa dạng của các loài vi khuẩn như vậy, chỉ 18 loài chính có mặt trong tất cả các đối tượng. Ngoài ra, tỷ lệ của hai ngành chiếm ưu thế thay đổi giữa các đối tượng, và quan sát được tỷ lệ của *Firmicutes*:*Bacteroidetes* bị thay

đổi ở các bệnh nhân mắc bệnh, và do đó được cho là có liên quan đến sự phát triển của bệnh.

Tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes* được sử dụng làm dấu hiệu chỉ báo của tính đa dạng tăng và giảm của hệ vi khuẩn đường ruột. Các bệnh nhân bị hội chứng ruột kích thích có sự giảm về tính đa dạng của hệ vi khuẩn đường ruột và lượng vi khuẩn *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* giảm, và có xu hướng về tỷ lệ của *Firmicutes:Bacteroidetes* tăng lên (Kim et al., 2013; Hong and Rhee, 2014; Tojo et al., 2014; và Dupont, 2014).

Khi chỉ GOS và CTP hoặc các hỗn hợp của GOS/CTP được sử dụng qua đường miệng cho mô hình sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng, *Firmicutes* giảm đi và tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes* cũng có xu hướng giảm đi ở nhóm sử dụng GOS. Tỷ lệ F/B có xu hướng tăng lên ở nhóm sử dụng CTP, với sự khác biệt không đáng kể so với nhóm CON, và tỷ lệ F/B giảm đi khi tăng nồng độ GOS trong hỗn hợp GOS/CTP. Từ các kết quả này, rõ ràng là việc sử dụng GOS có liên quan đến sự cải thiện môi trường trong ruột.

#### Sự thay đổi về vi khuẩn axit lactic

Sự thay đổi về vi khuẩn axit lactic giữa các vi khuẩn trong ruột theo nhóm sử dụng GOS/CTP được xác định, và vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* được xác định là các chủng chính trong số tất cả các vi khuẩn axit lactic. Vi khuẩn *Bifidobacterium* có xu hướng tăng lên ở nhóm sử dụng GOS. Việc sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:3 dẫn đến sự tăng đáng kể về vi khuẩn *Bifidobacterium* so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ). Đối với sự thay đổi về các loài *Lactobacillus* thuộc về vi khuẩn axit lactic, không có sự khác biệt đáng kể trong mỗi nhóm. Sự thay đổi về các loài *Lactococcus* có xu hướng tăng lên khi sử dụng GOS, và có xu hướng giảm thêm trong nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP, loại trừ nhóm sử dụng theo tỷ lệ 1:1, so với nhóm CON, nhưng không có sự khác biệt đáng kể.

#### Sự thay đổi về hệ vi khuẩn đường ruột của người

Kết quả xác định sự thay đổi về các vi khuẩn đại diện quan sát được ở ruột của

người được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.38 đến Fig.46.

Sự thay đổi về các vi khuẩn thuộc về ngành và họ ở ruột của người được xác định. *Proteobacteria*, là vi khuẩn thuộc về ngành, quan sát được ở mức thấp trong ruột của người khỏe mạnh và có xu hướng tăng lên khi sử dụng hỗn hợp GOS/CTP, và đặc biệt là có sự gia tăng đáng kể ở nhóm sử dụng theo tỷ lệ 1:3 so với nhóm CON ( $p < 0,05$ ). Vi khuẩn đường ruột *Christensenellaceae* được phát hiện chủ yếu ở các cặp sinh đôi mảnh dẻ. Mặc dù đã có báo cáo rằng các con chuột thậm chí không tăng cân sau khi ăn chế độ ăn có hàm lượng chất béo cao, giàu chất dinh dưỡng khi vi khuẩn đường ruột *Christensenellaceae* được tiêm vào chuột, nhưng lượng vi khuẩn *Christensenellaceae* có xu hướng giảm đi ở các nhóm điều trị so với nhóm đối chứng bình thường (NOR). Tính đa dạng của hệ vi khuẩn đường ruột đã được biết là giảm đi ở người già (O'Toole and Claesson, 2010). Nghĩa là đã biết rằng *Bifidobacteriaceae* giảm đi và *Enterobacteriaceae* tăng lên (Woodmansey, 2007; và Claesson et al., 2011).

Các nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP của sáng chế, đặc biệt là nhóm sử dụng với tỷ lệ 1:3 và 3:1 có xu hướng giảm về vi khuẩn *Enterobacteriaceae*.

Các hình vẽ từ Fig.36 đến Fig.40 thể hiện sự phân bố của các ngành và họ của các vi sinh vật đường ruột trong hệ vi sinh vật đường ruột của mỗi nhóm thử nghiệm theo sáng chế.

Nói chung, vi khuẩn *Proteobacteria* là thấp, nhưng vi khuẩn *Bacteriodes*, *Prevotella*, và *Ruminococcus* dồi dào và do đó được cho là các vi sinh vật đường ruột có lợi cho sức khỏe (Kim et al., 2013; và Tojo et al., 2014). Các giống *Bacteroides*, *Prevotella*, và *Xylanibacter* thuộc về ngành *Bacteroidetes*, và có thể làm thoái biến các loại phức chất glycan khác nhau. *Ruminococcus* thường có xu hướng tăng lên khi sử dụng sử dụng GOS và CTP, và đặc biệt là được tăng lên đáng kể ở nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP theo tỷ lệ 1:1 so với nhóm NOR ( $p < 0,05$ ).

Các đối tượng được phân loại theo các loài vi khuẩn chiếm ưu thế được phân bố trong đại tràng (enterotyp), và có thể được phân loại thành ba enterotyp: enterotyp 1 đối với vi khuẩn *Bacteroides* chiếm ưu thế, enterotyp 2 đối với vi khuẩn *Prevotella* chiếm ưu

thể, và enterotyp 3 đối với vi khuẩn *Ruminococcus* chiếm ưu thế. Các kiểu phân bố của các enterotyp phân loại đã được biết là thay đổi theo chế độ ăn, sự khác biệt về di truyền, và vùng khu trú, nhưng ý nghĩa của chúng vẫn chưa được xác định rõ ràng (Bennet et al., 2015; và Eupont, 2014).

Kết quả xác định sự thay đổi về các vi sinh vật đại diện (giống) quan sát được ở ruột của người được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.41 đến Fig.44. *Akkermansia* giảm đi ở nhóm đối chứng UV (CON) so với nhóm NOR, và tăng lên ở các nhóm điều trị bằng mẫu, có nồng độ tương tự so với nồng độ ở nhóm NOR. *Blautia* được tăng lên đáng kể ở nhóm CON, và có xu hướng giảm đi khi điều trị bằng phần lớn các mẫu. *Bacteroides* và *Clostridium* không có sự khác biệt đáng kể giữa các mẫu. Sự thay đổi về hệ vi khuẩn đường ruột được sử dụng khi sử dụng các hỗn hợp GOS/CTP, và việc sử dụng GOS có hiệu quả cải thiện thêm về tỷ lệ của *Firmicutes/Bacteroidetes*. Ngoài ra, vi khuẩn axit lactic ở ruột cũng được xác định là tăng lên ở các nhóm sử dụng hỗn hợp GOS/CTP có hiệu quả cải thiện da trong mô hình sự lão hoá do tiếp xúc với ánh nắng.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính khi được sử dụng qua đường miệng để ức chế sự tổn thương da do bức xạ tử ngoại gây ra, trong đó galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) có mặt với tỷ lệ trọng lượng bằng 1:1.

2. Chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính khi được sử dụng qua đường miệng để làm giảm nếp nhăn trên da, trong đó galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) có mặt với tỷ lệ trọng lượng bằng 1:1-3.

3. Chế phẩm thực phẩm chứa galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) làm thành phần hoạt tính khi được sử dụng qua đường miệng để dưỡng ẩm da, trong đó galacto-oligosacarit (GOS) và collagen tripeptit (CTP) có mặt với tỷ lệ trọng lượng bằng 1:1.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

|       |                                                                                                                        |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <110> | Neo Cremar Co.,Ltd                                                                                                     |    |
| <120> | CHẾ PHẨM THỰC PHẨM CHỨA GALACTO-OLIGOSACARIT VÀ COLAGEN TRIPEPTIT ĐỂ ỨC CHẾ SỰ TỒN THƯƠNG DA DO BỨC XẠ TỬ NGOẠI GÂY RA |    |
| <130> | PP200020                                                                                                               |    |
| <150> | KR 10-2020-0052861                                                                                                     |    |
| <151> | 2020-04-29                                                                                                             |    |
| <160> | 18                                                                                                                     |    |
| <170> | KoPatentIn 3.0                                                                                                         |    |
| <210> | 1                                                                                                                      |    |
| <211> | 22                                                                                                                     |    |
| <212> | ADN                                                                                                                    |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo                                                                                                      |    |
| <220> |                                                                                                                        |    |
| <223> | Đoạn mỗi xuôi MMP2                                                                                                     |    |
| <400> | 1                                                                                                                      |    |
|       | caaggatgga ctcctggcac at                                                                                               | 22 |
| <210> | 2                                                                                                                      |    |
| <211> | 22                                                                                                                     |    |
| <212> | ADN                                                                                                                    |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo                                                                                                      |    |
| <220> |                                                                                                                        |    |
| <223> | Đoạn mỗi ngược MMP2                                                                                                    |    |
| <400> | 2                                                                                                                      |    |
|       | tactcgccat cagcgttccc at                                                                                               | 22 |
| <210> | 3                                                                                                                      |    |
| <211> | 20                                                                                                                     |    |
| <212> | ADN                                                                                                                    |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo                                                                                                      |    |
| <220> |                                                                                                                        |    |
| <223> | Đoạn mỗi xuôi MMP3                                                                                                     |    |
| <400> | 3                                                                                                                      |    |
|       | ttctgggcta tacgagggca                                                                                                  | 20 |
| <210> | 4                                                                                                                      |    |
| <211> | 20                                                                                                                     |    |
| <212> | ADN                                                                                                                    |    |

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược MM3

<400> 4

cttcttcacg gttgcaggga

20

<210> 5

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi MMP9

<400> 5

gctgactacg ataaggacgg ca

22

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược MMP9

<400> 6

tagtggtgca ggcagagtag ga

22

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi TIMP1

<400> 7

tcttggttcc ctggcgtact ct

22

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược TIMP1

<400> 8

gtgagtgca ctctccagtt tgc

23

|       |                           |    |
|-------|---------------------------|----|
| <210> | 9                         |    |
| <211> | 22                        |    |
| <212> | ADN                       |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo         |    |
| <220> |                           |    |
| <223> | Đoạn mỗi xuôi TIMP2       |    |
| <400> | 9                         |    |
|       | agccaaagca gtgagcgaga ag  | 22 |
| <210> | 10                        |    |
| <211> | 23                        |    |
| <212> | ADN                       |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo         |    |
| <220> |                           |    |
| <223> | Đoạn mỗi ngược TIMP2      |    |
| <400> | 10                        |    |
|       | gccgtgtaga taaactcgat gtc | 23 |
| <210> | 11                        |    |
| <211> | 22                        |    |
| <212> | ADN                       |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo         |    |
| <220> |                           |    |
| <223> | Đoạn mỗi xuôi COL1a1      |    |
| <400> | 11                        |    |
|       | cctcagggta ttgctggaca ac  | 22 |
| <210> | 12                        |    |
| <211> | 22                        |    |
| <212> | ADN                       |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo         |    |
| <220> |                           |    |
| <223> | Đoạn mỗi ngược COL1a1     |    |
| <400> | 12                        |    |
|       | cagaaggacc ttgtttgccca gg | 22 |
| <210> | 13                        |    |
| <211> | 20                        |    |
| <212> | ADN                       |    |
| <213> | Trình tự nhân tạo         |    |
| <220> |                           |    |

<223> Đoạn mồi xuôi HYAL

<400> 13

aagtaccaag gaatcatgcc

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi ngược HYAL

<400> 14

ctcaggataa cttggatggc

20

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi xuôi NF-kappa B

<400> 15

ttgtgccaag agtcatgacg

20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi ngược NF-kappa B

<400> 16

ctgaaatccc atgtcctgct

20

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi xuôi GADPH

<400> 17

catcactgcc acccagaaga ctg

23

<210> 18

<211> 23  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo  
  
<220>  
<223> Đoạn mỗi ngược GADPH

<400> 18  
atgccagtga gcttcccgtt cag

23

FIG.1a

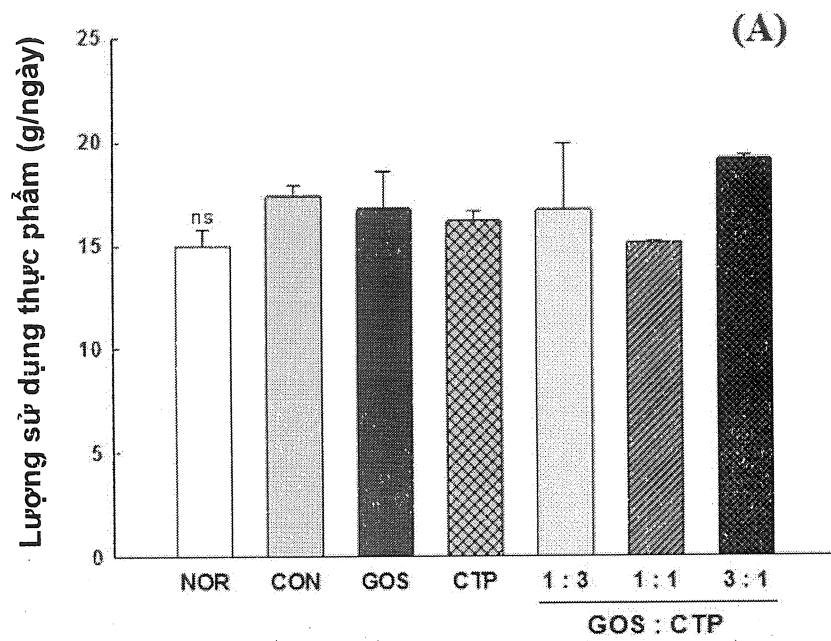


FIG.1b

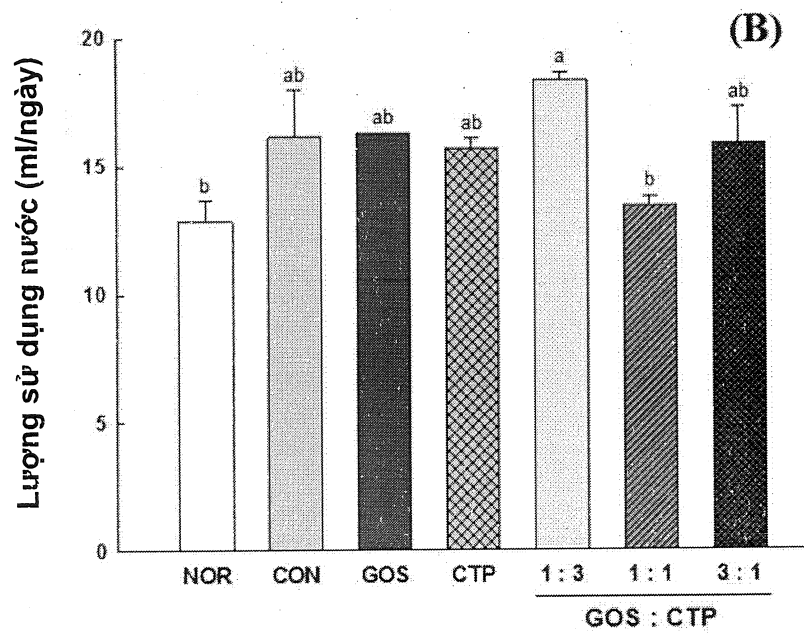


FIG.2a

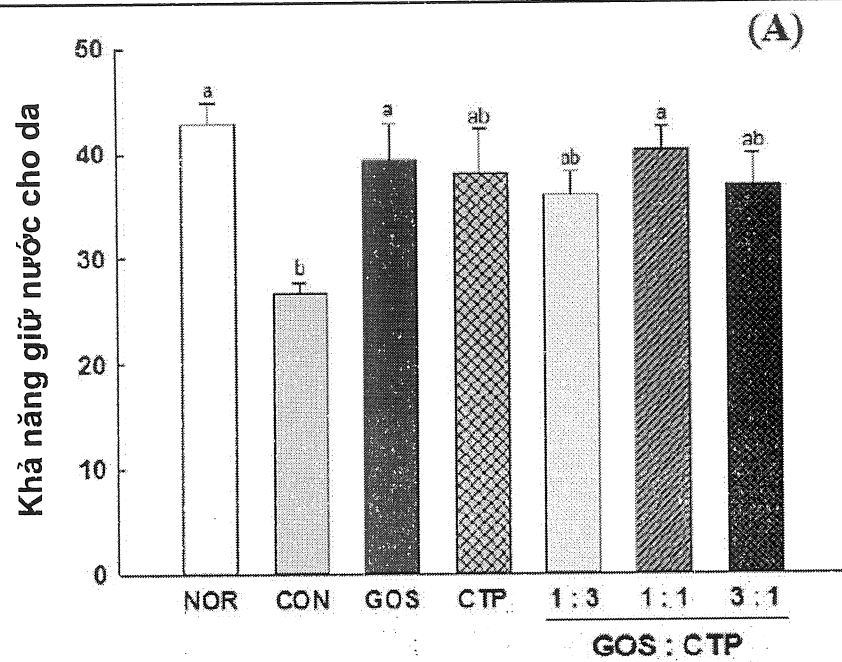
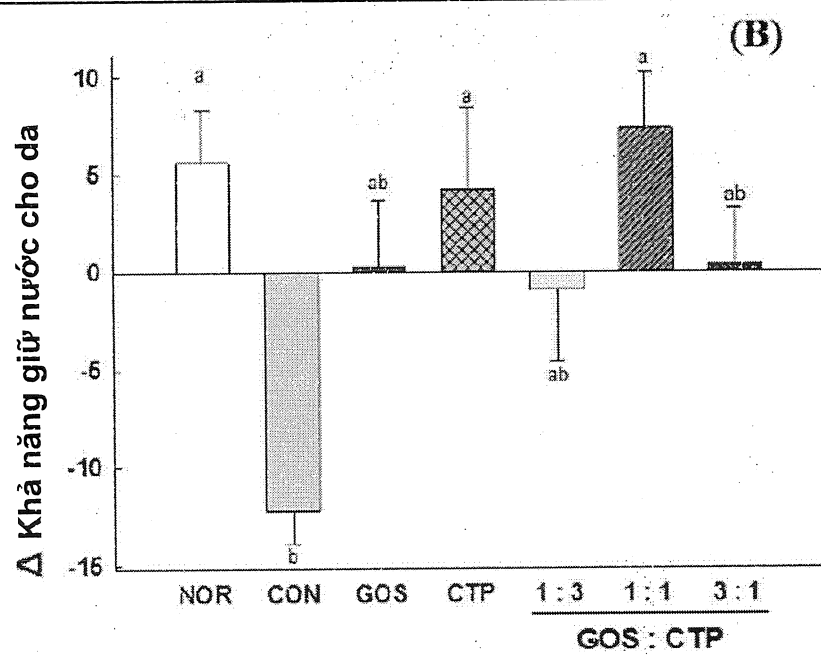


FIG.2b



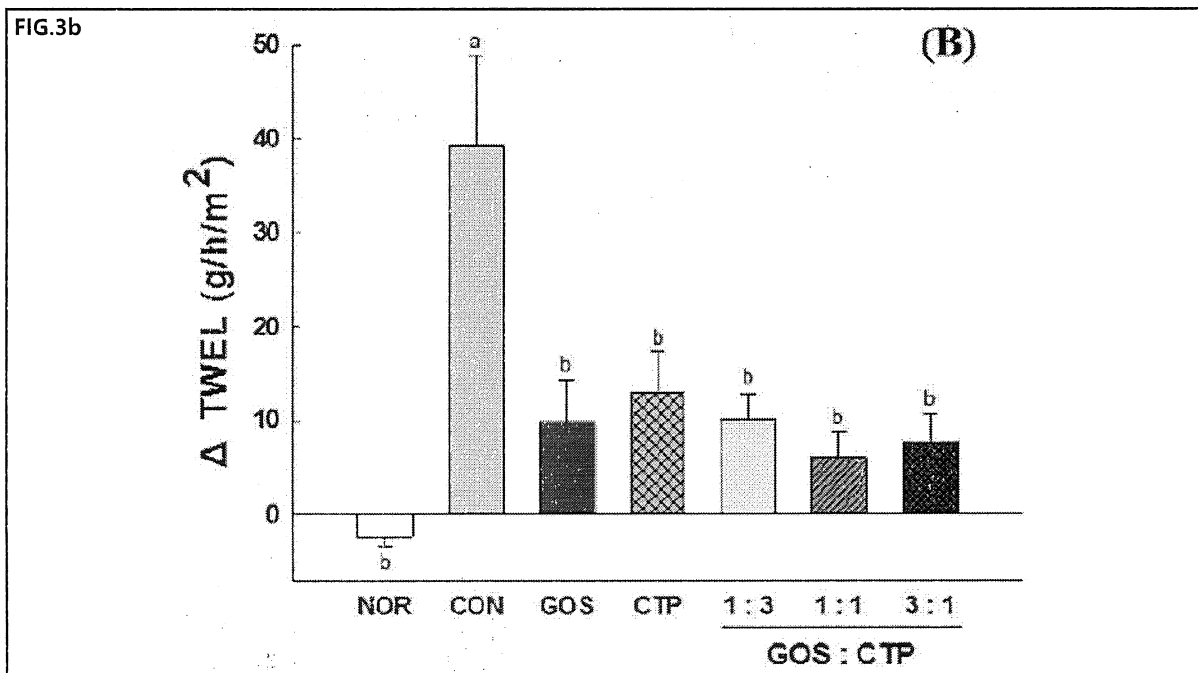
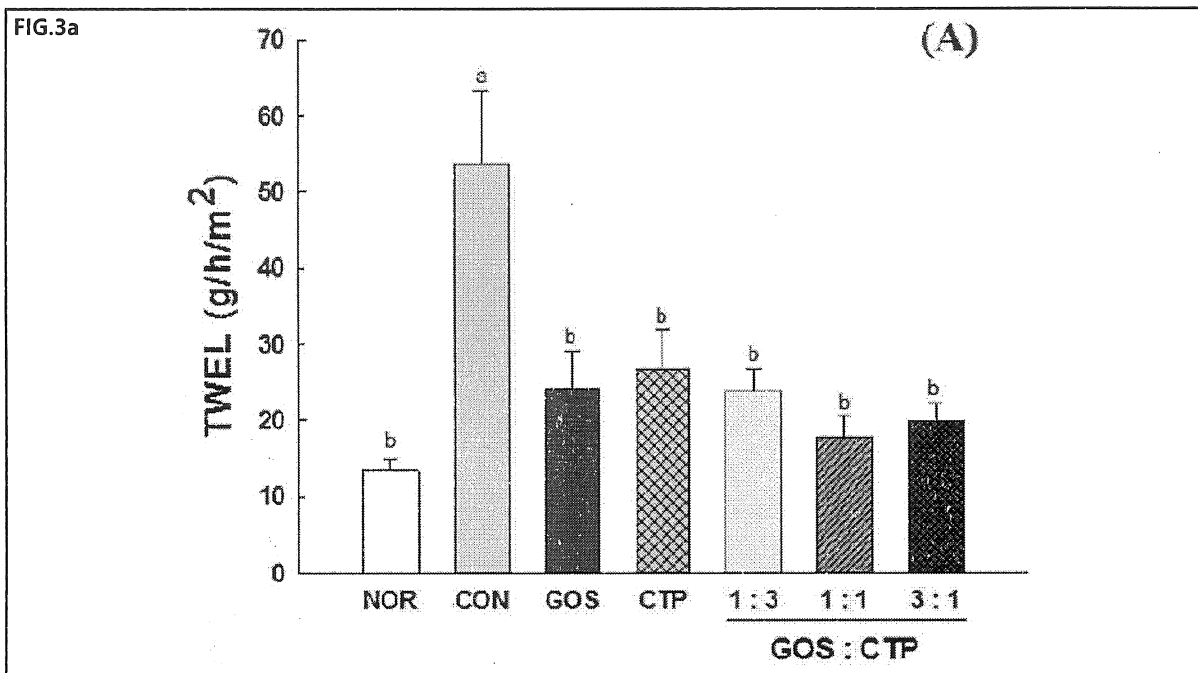


FIG.4a

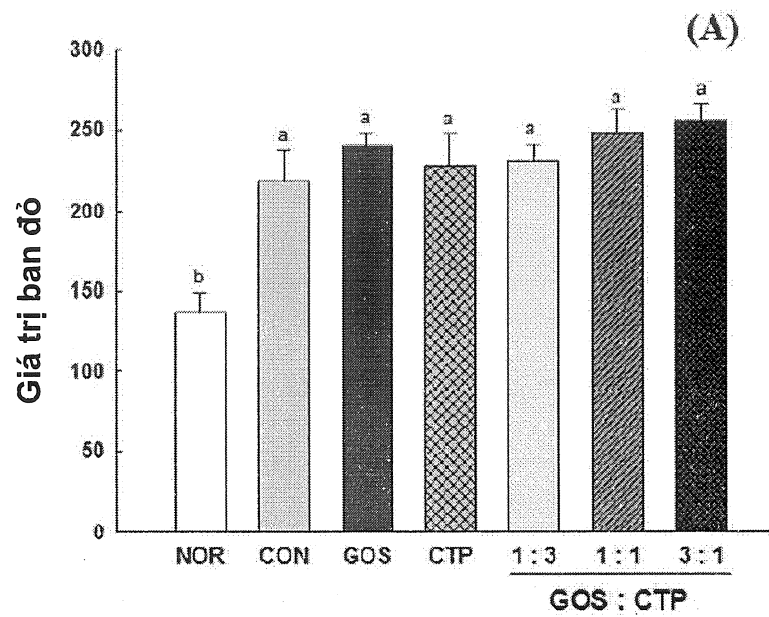


FIG.4b

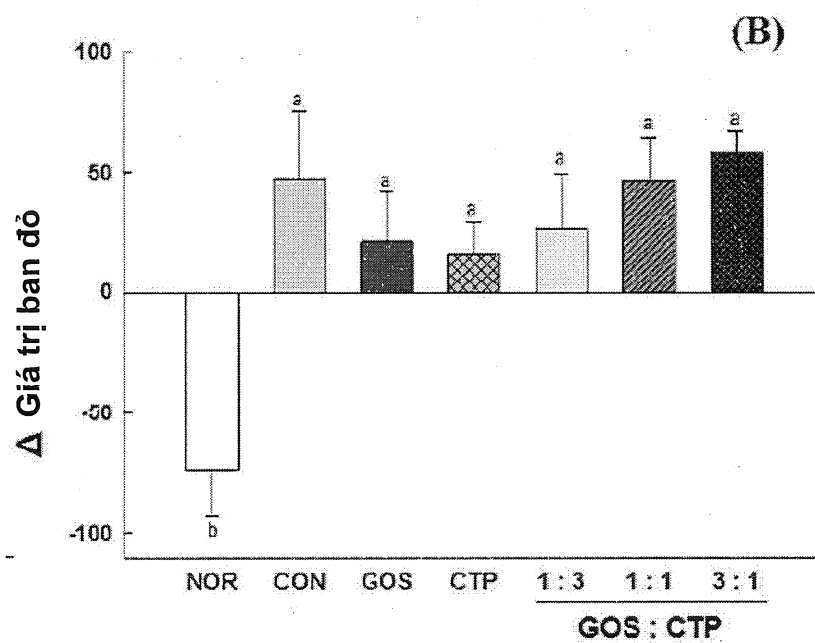


FIG.5

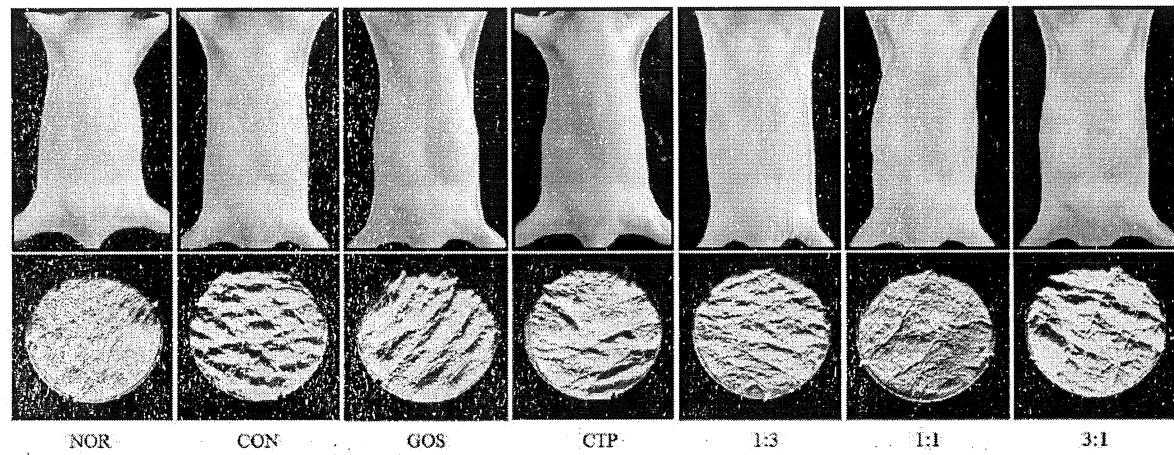
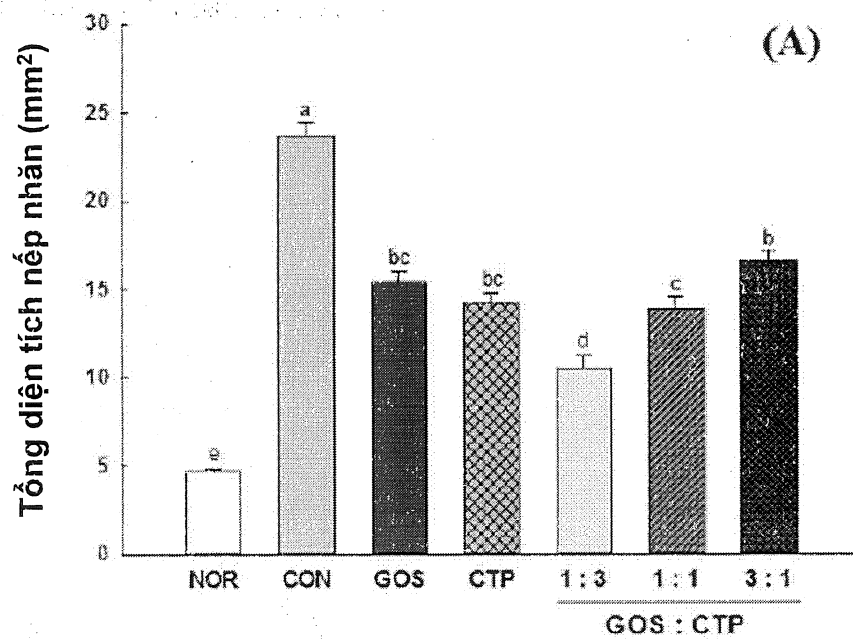


FIG.6a



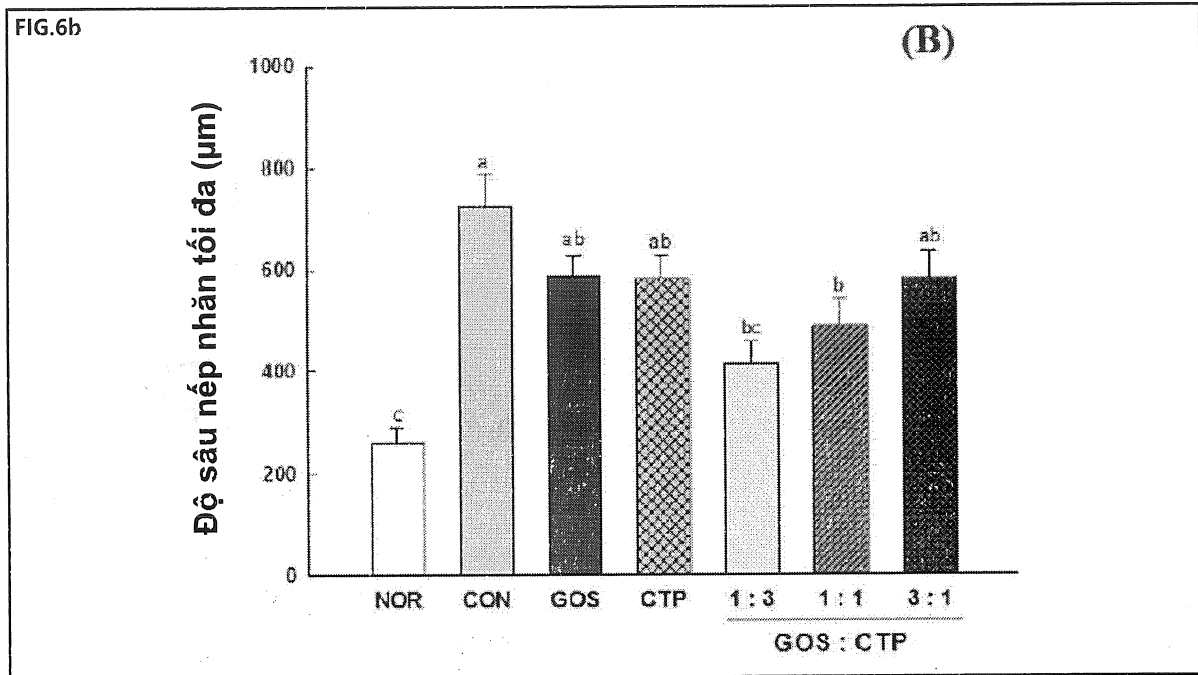
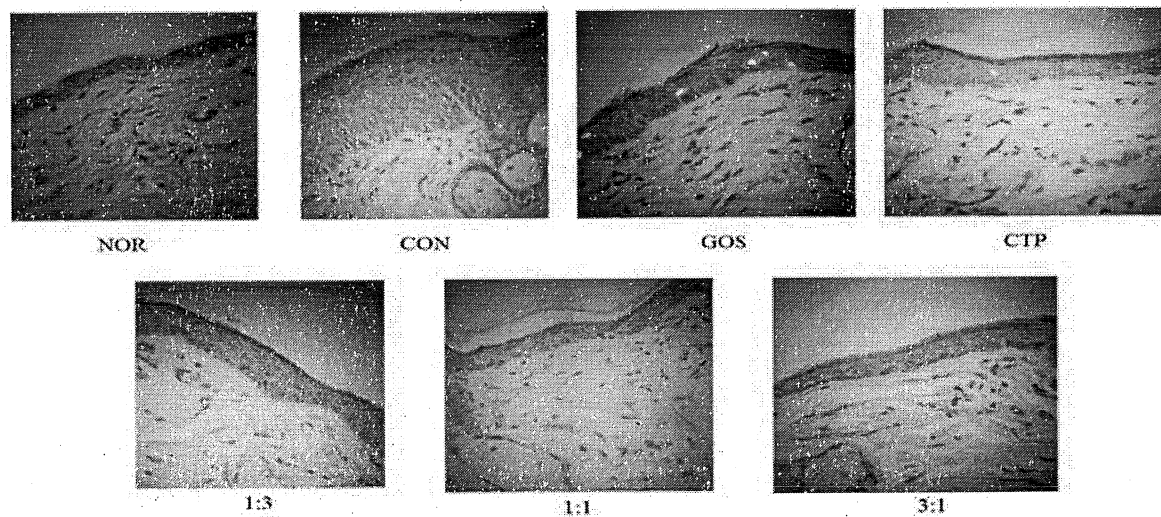
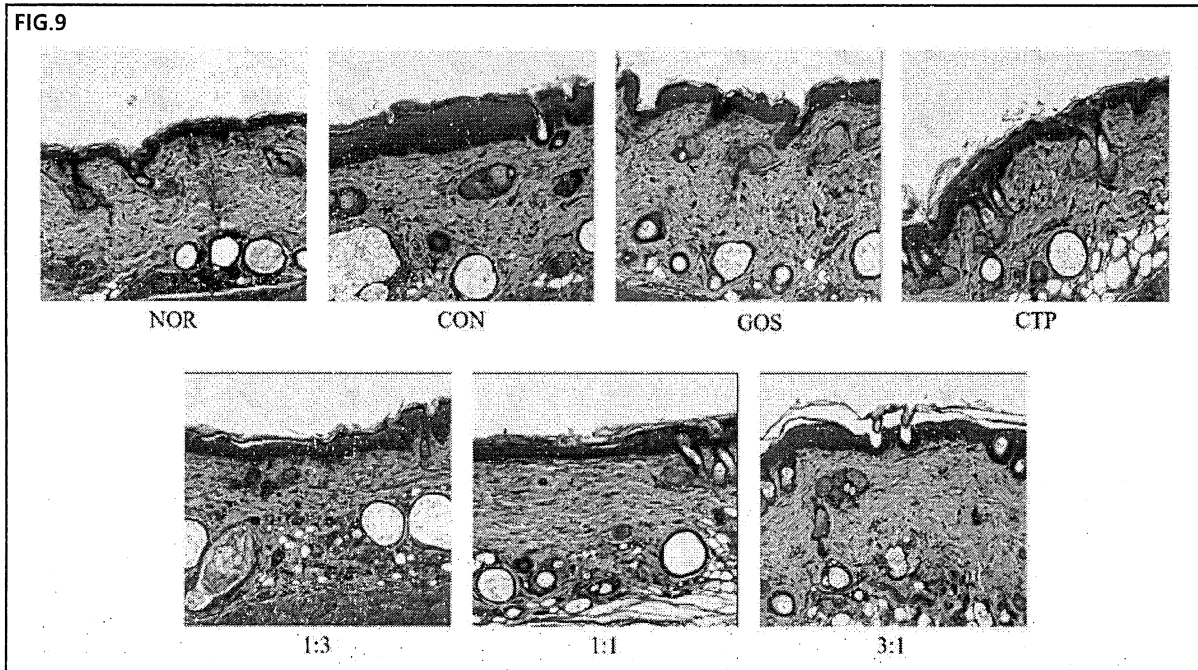
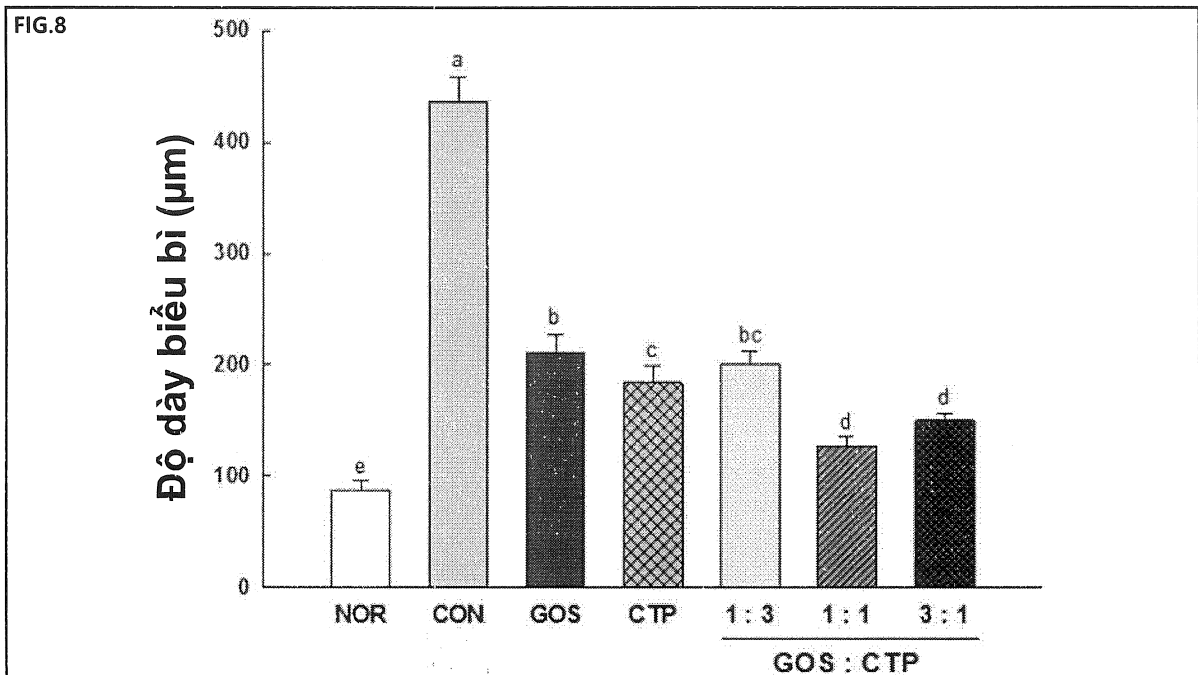


FIG.7





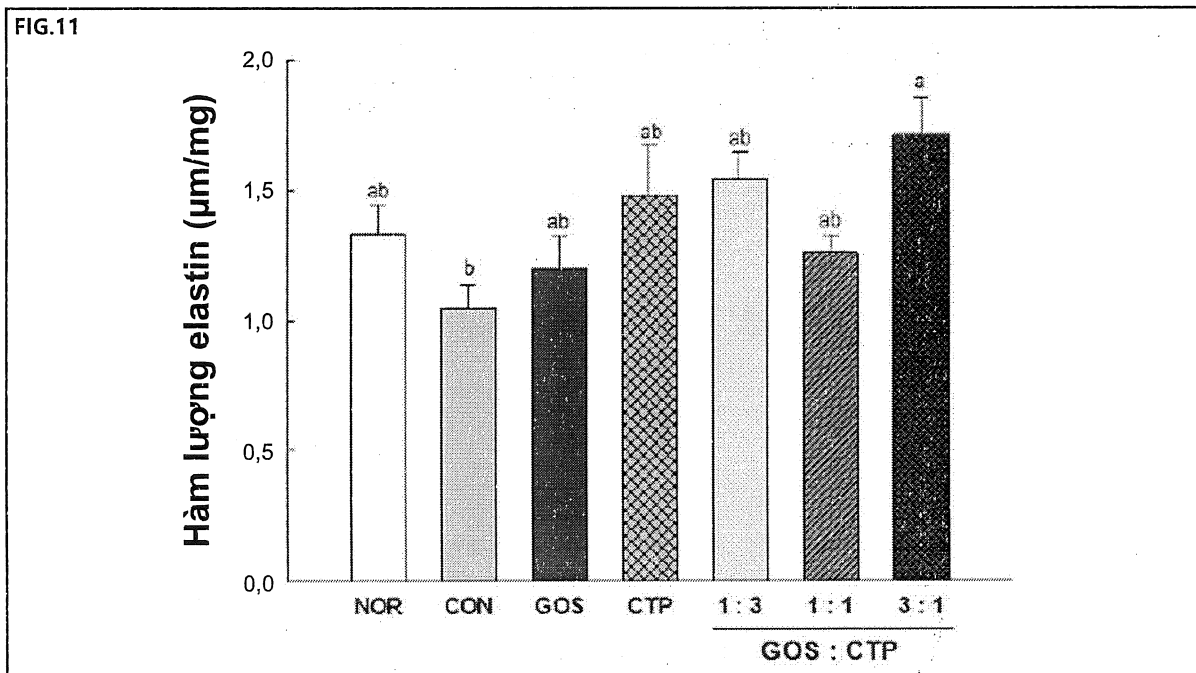
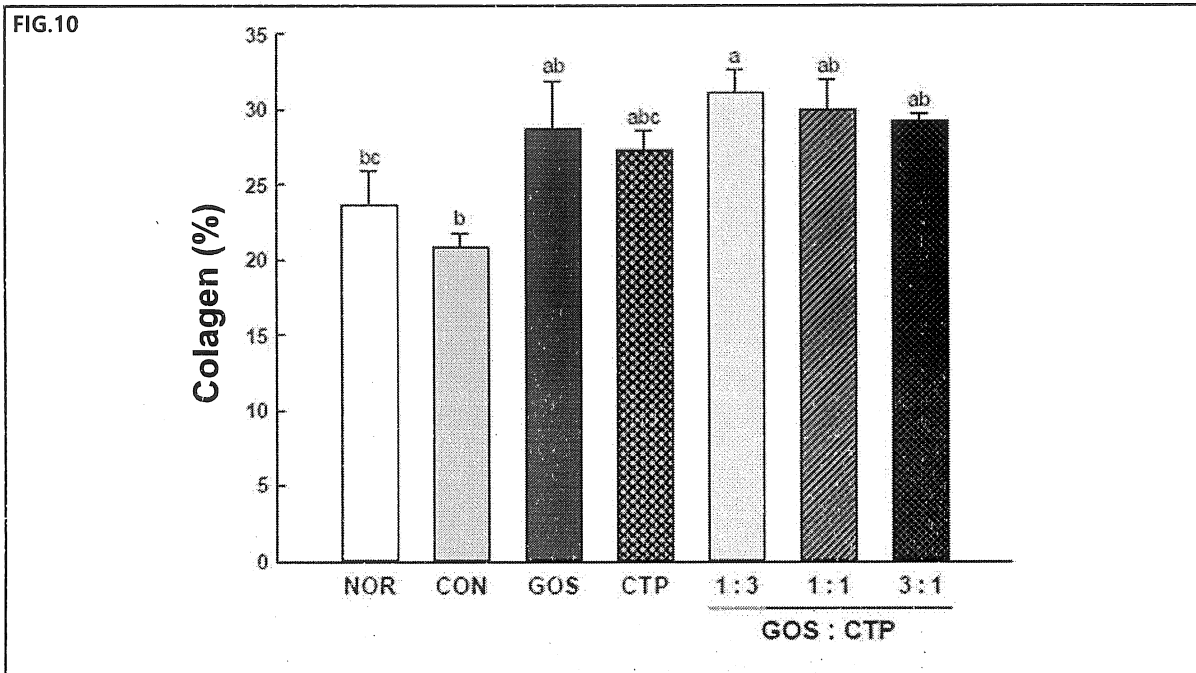


FIG.12

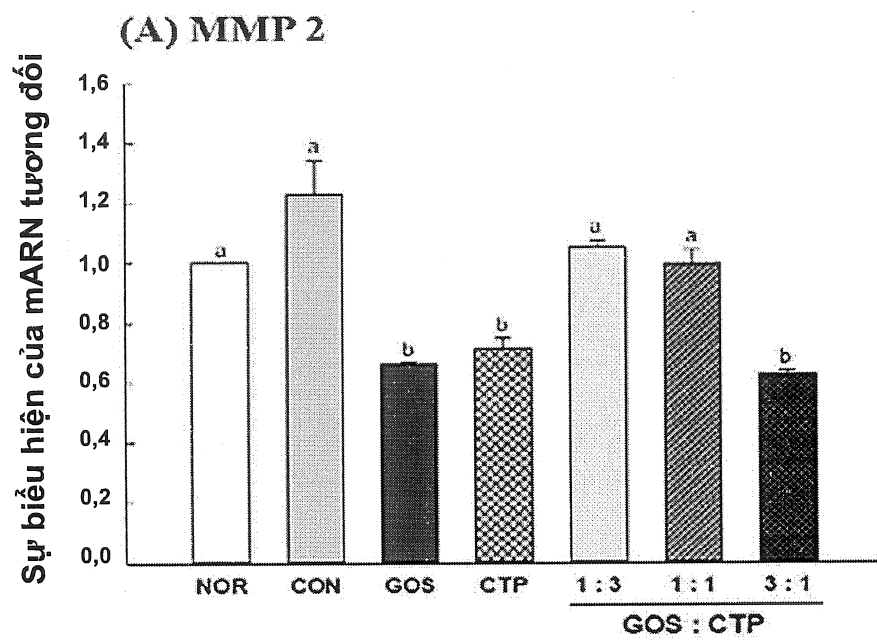


FIG.13

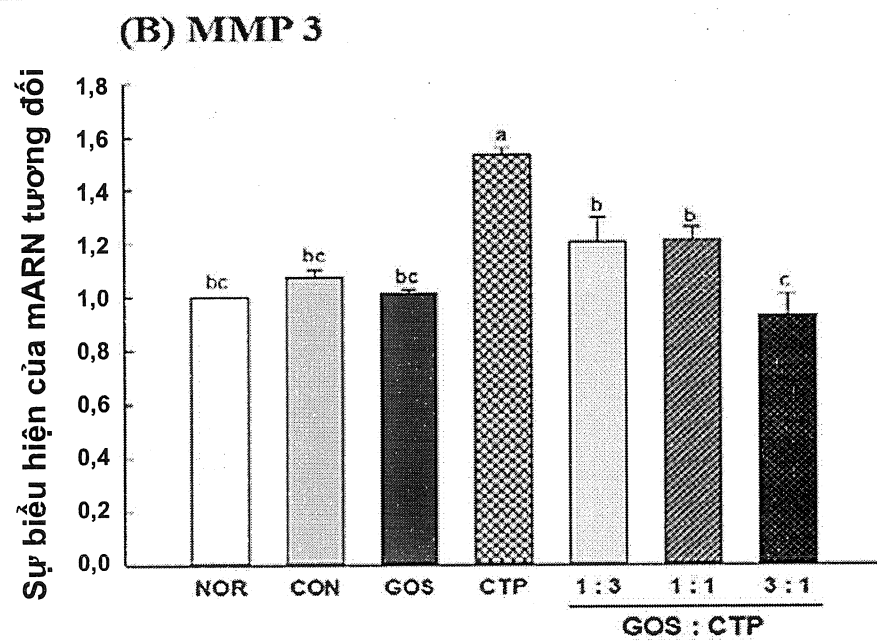


FIG.14

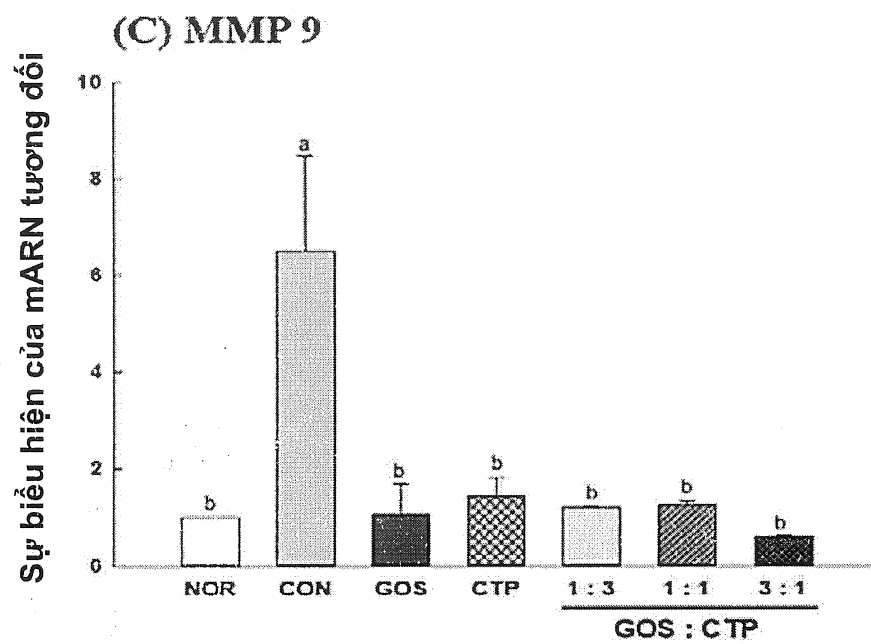


FIG.15

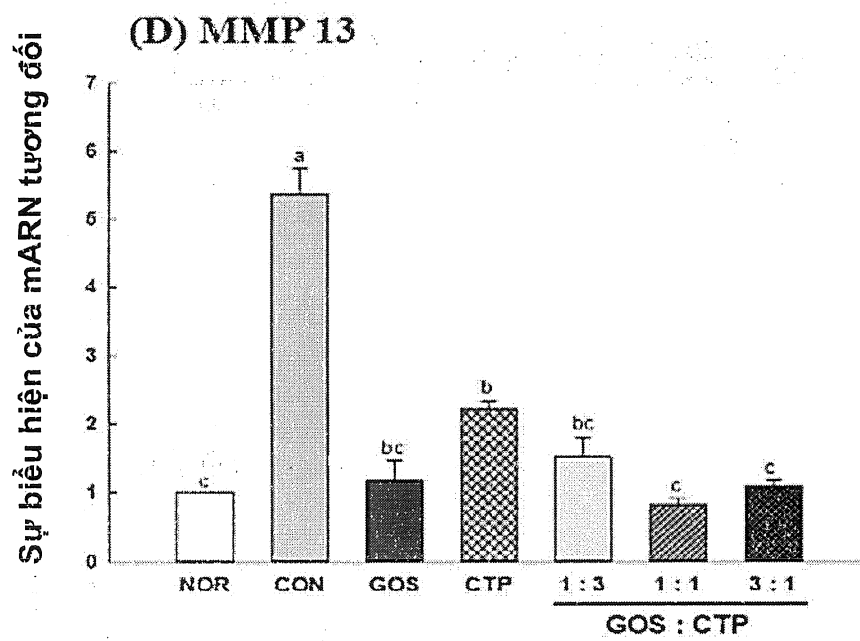


FIG.16

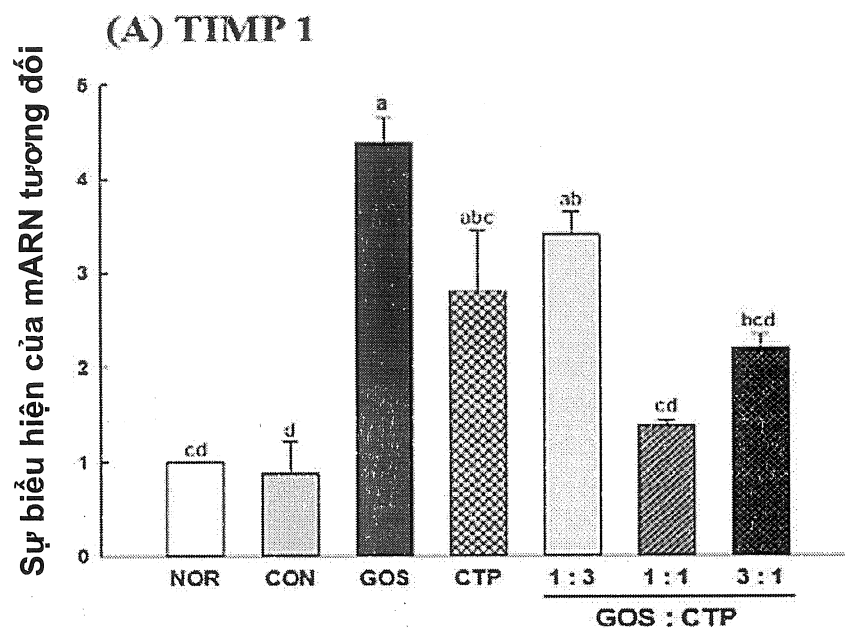
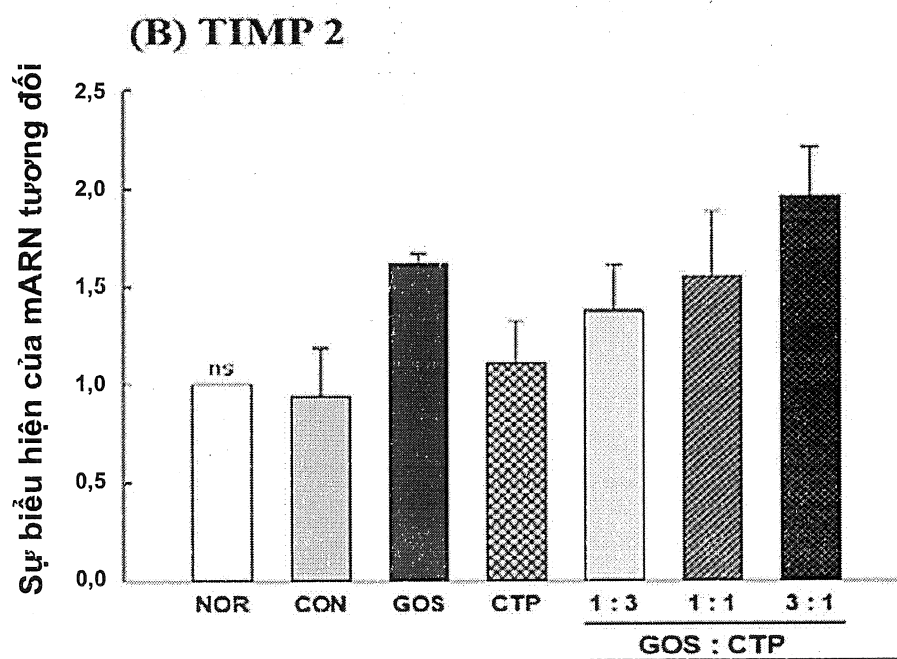
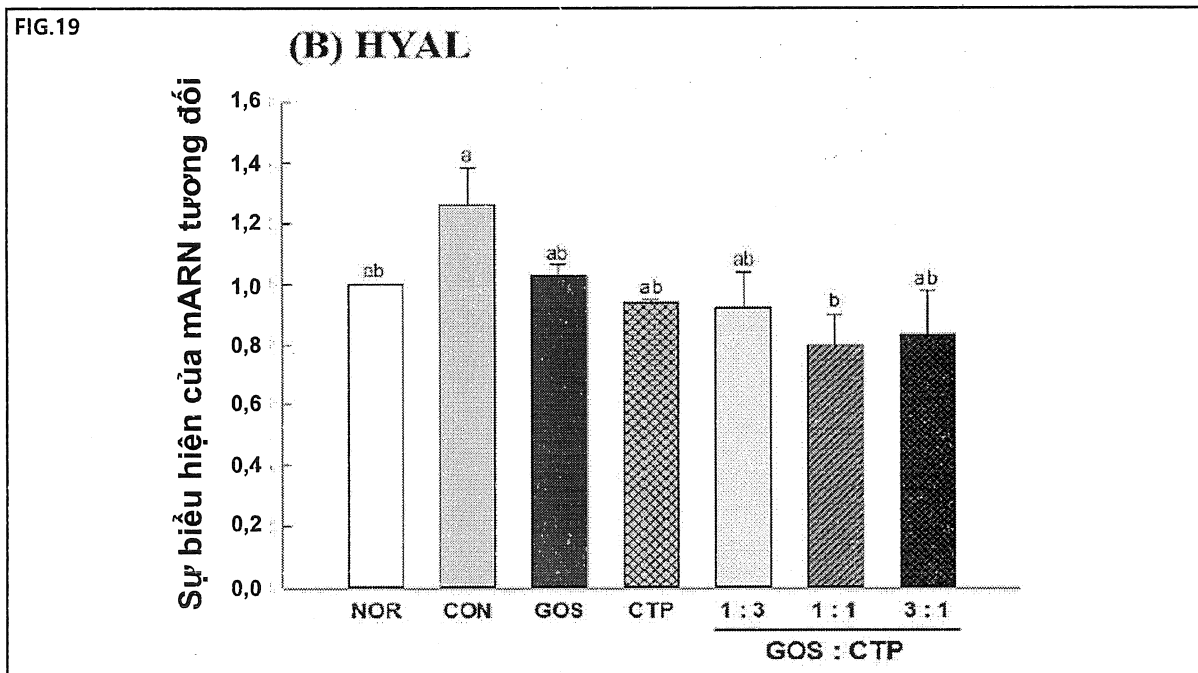
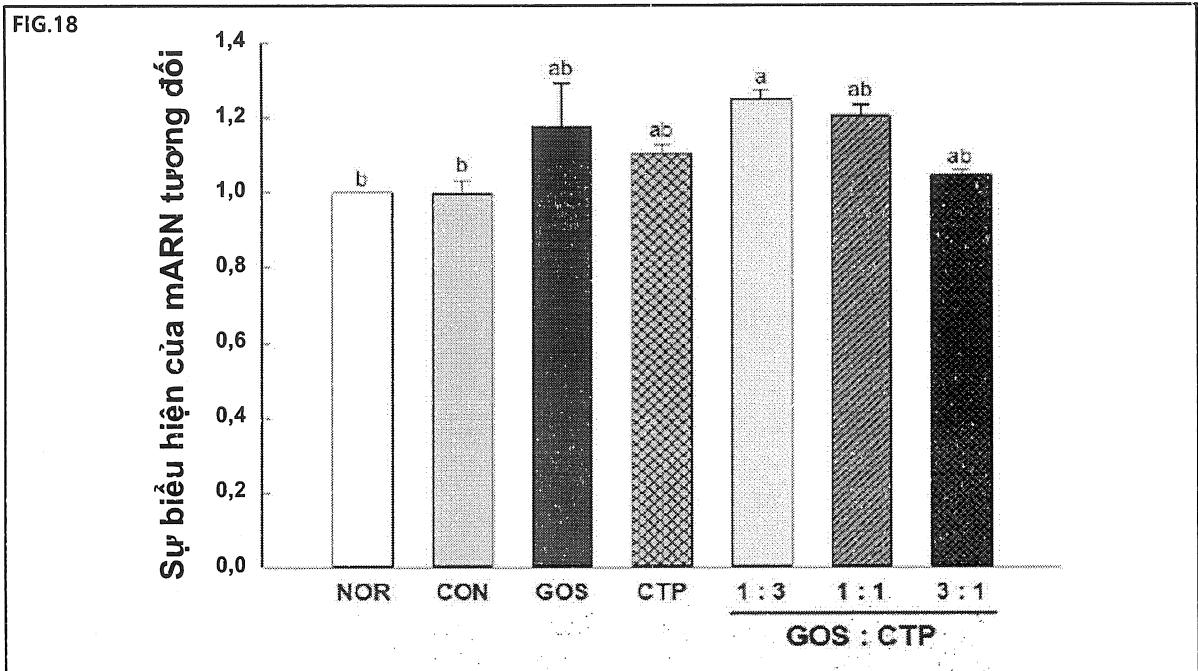
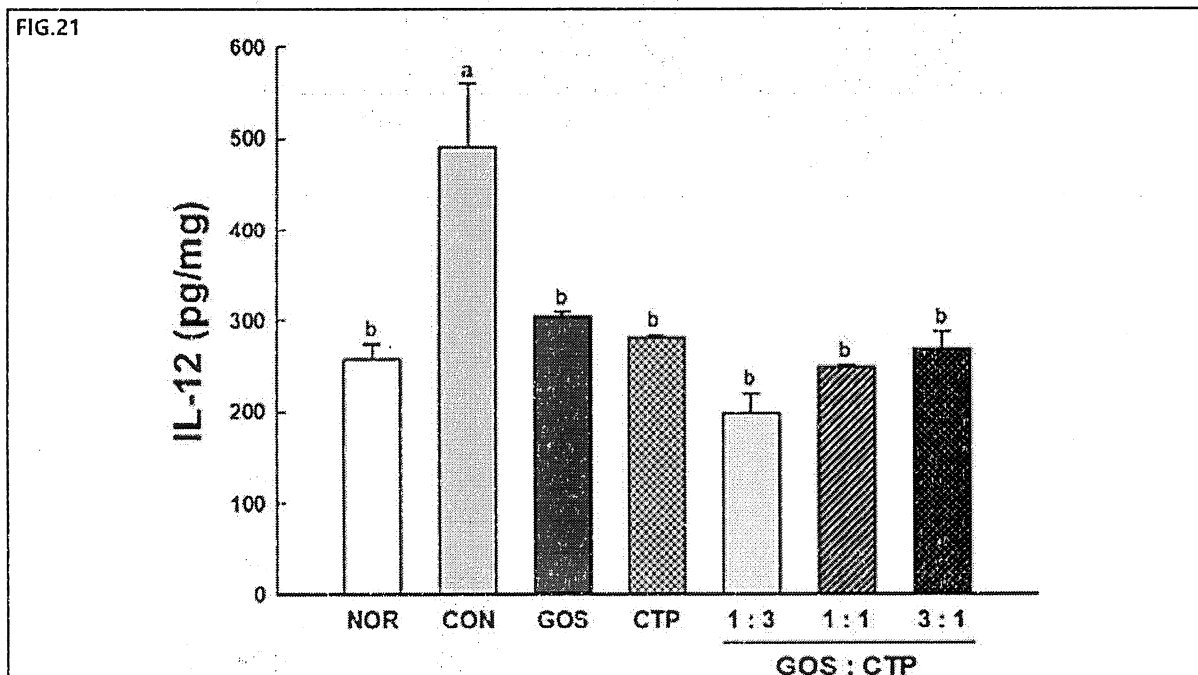
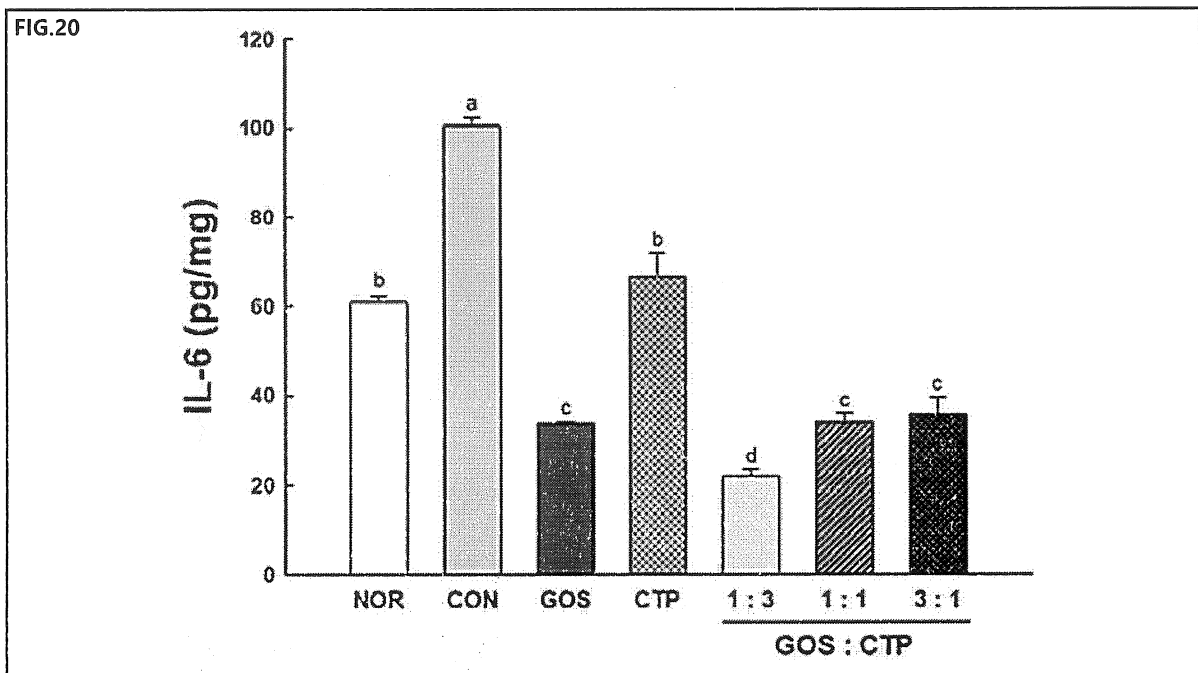


FIG.17







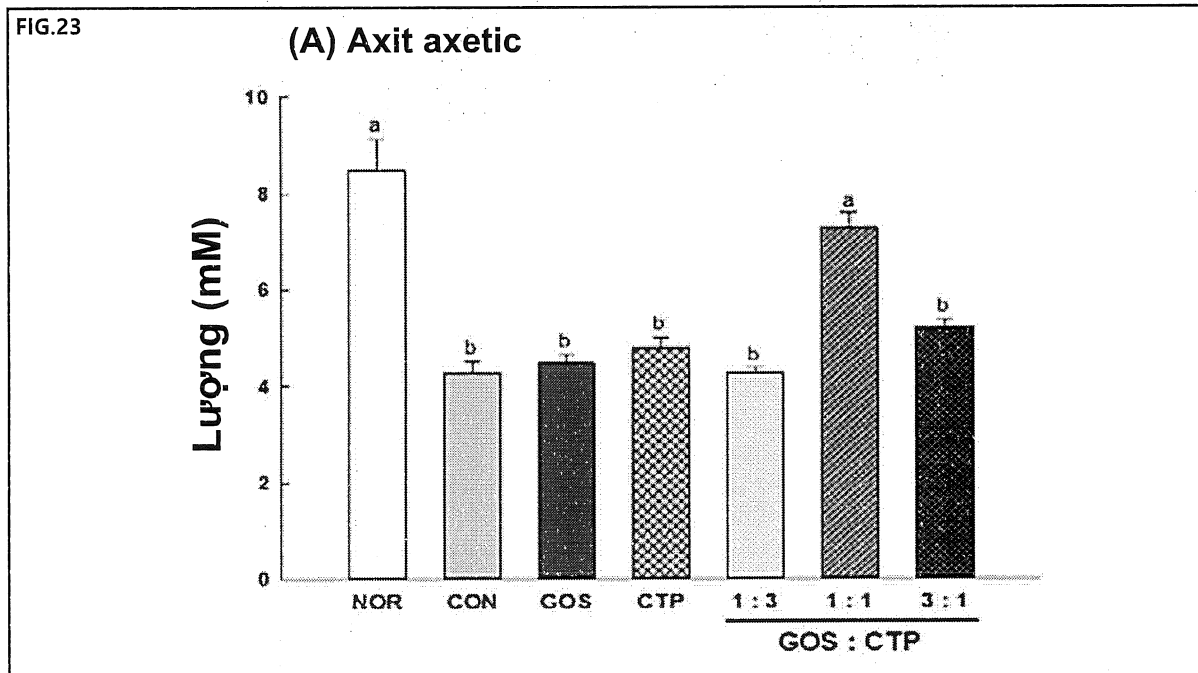
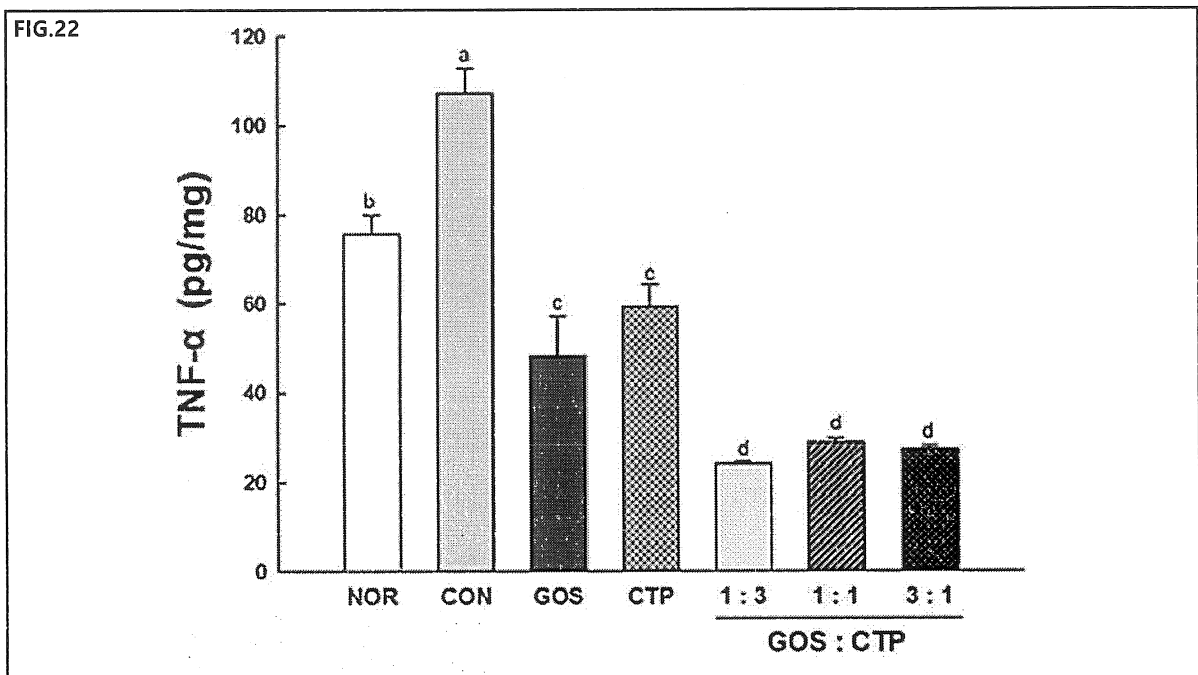


FIG.24

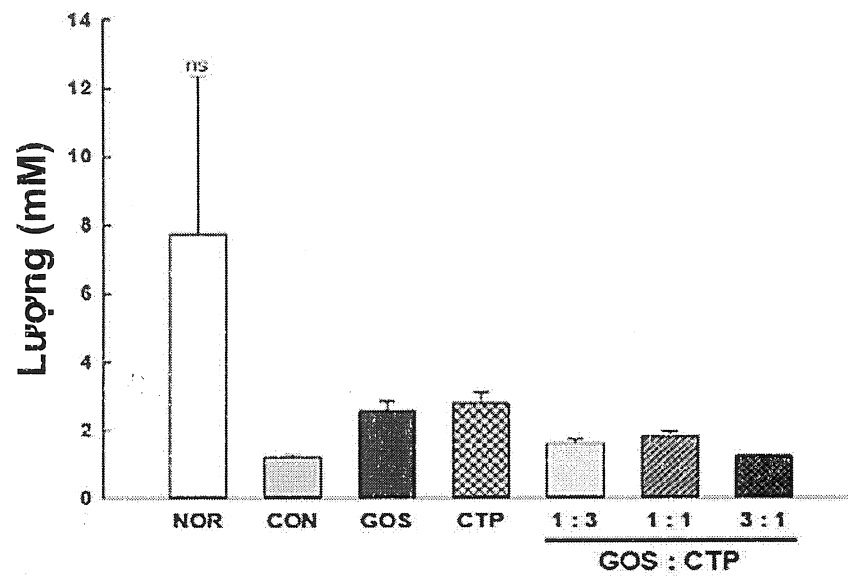
**(B) Axit propionic**

FIG.25

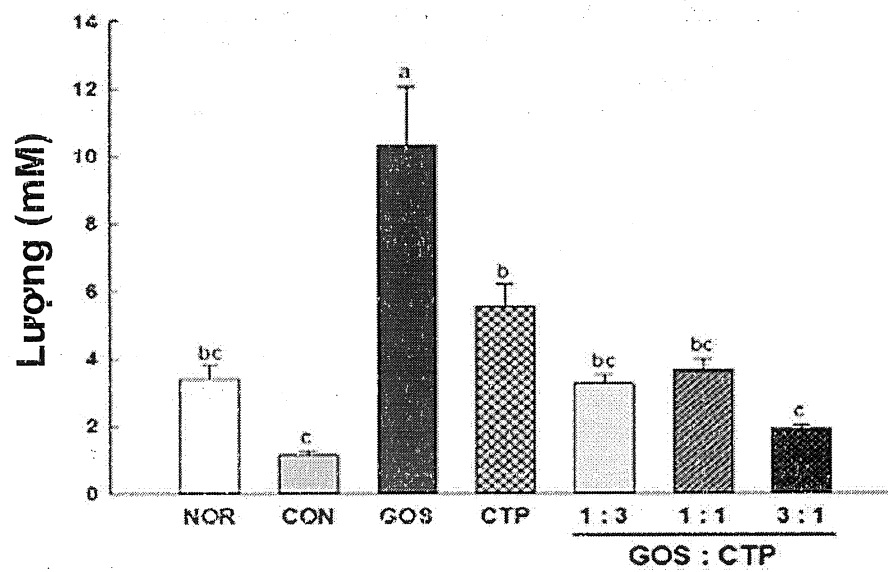
**(C) Axit butyric**

FIG.26

## (D) Axit valeric

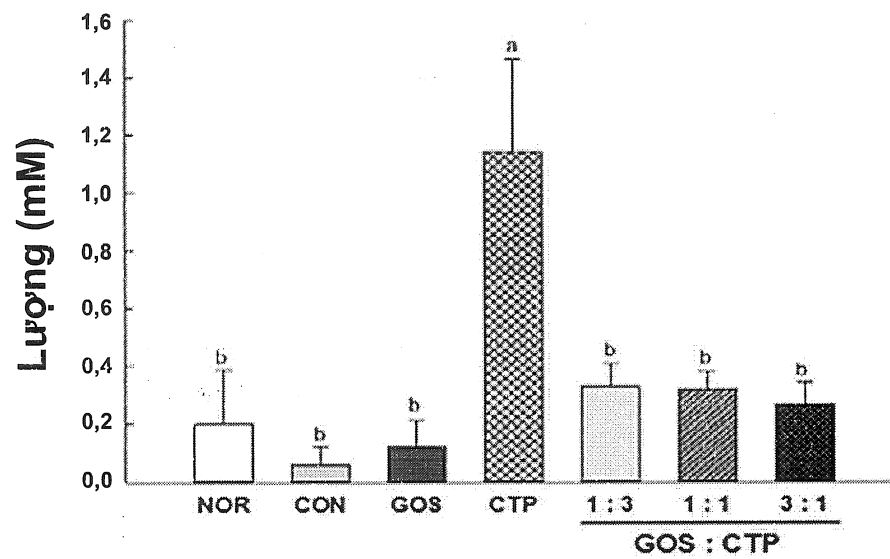


FIG.27

## (E) Tổng lượng SCFA

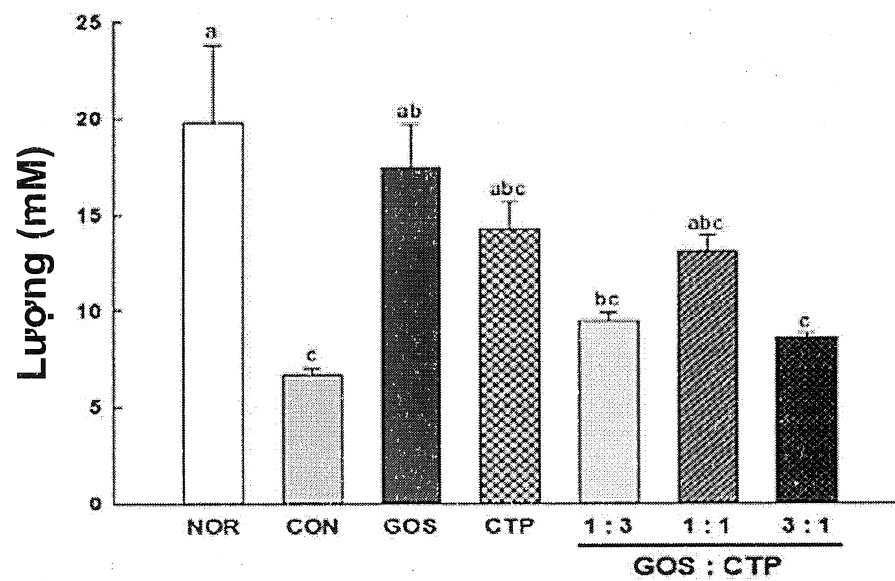


FIG.28

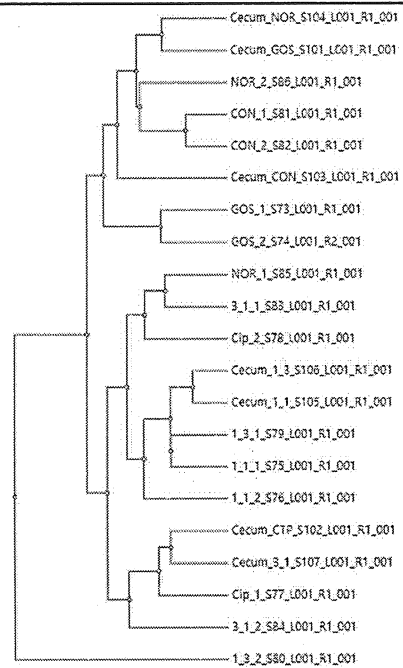
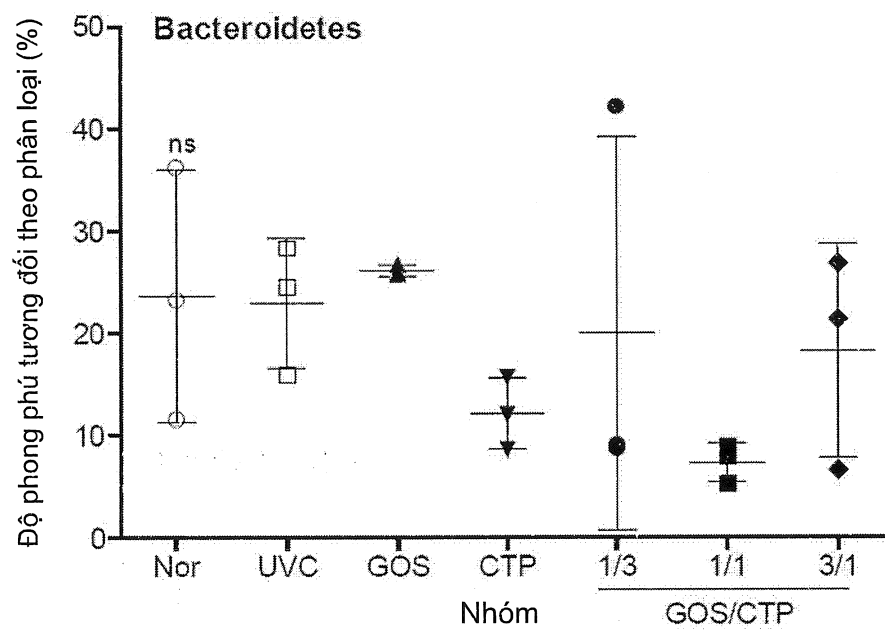
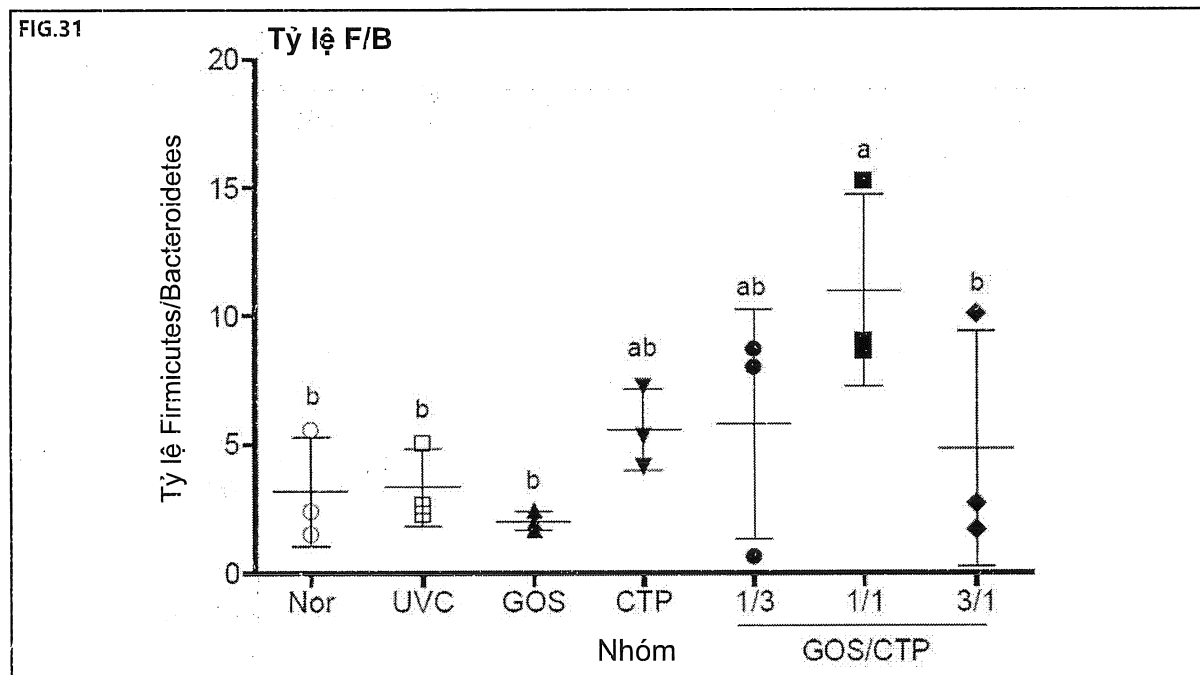
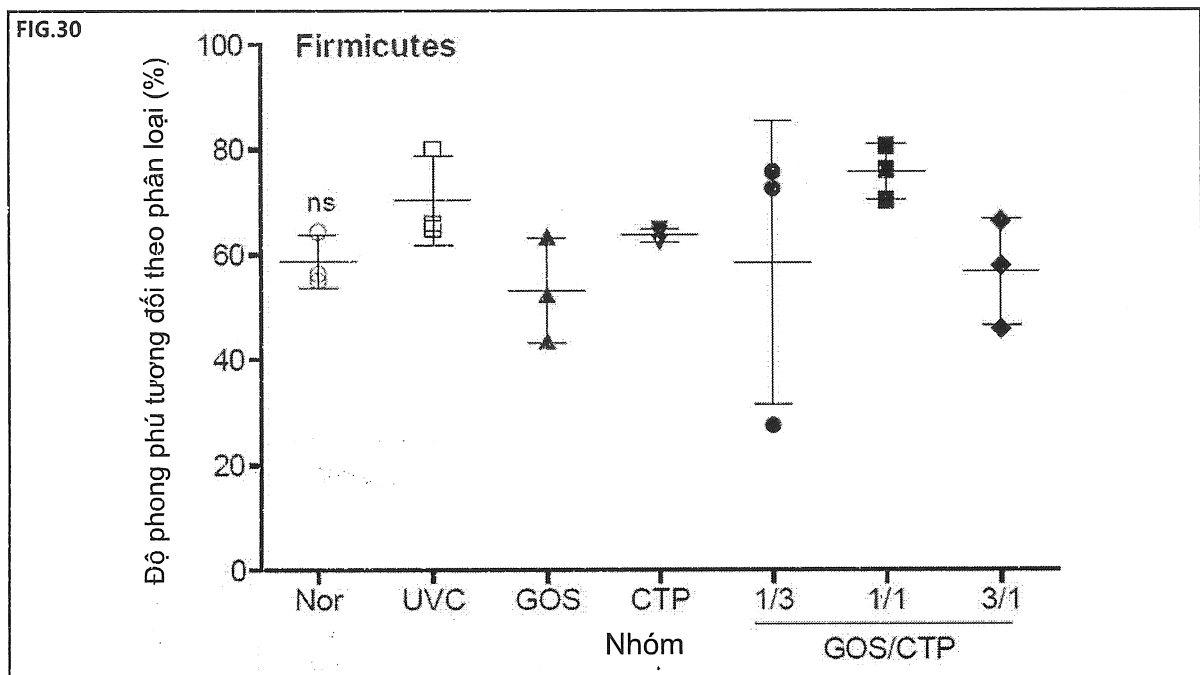
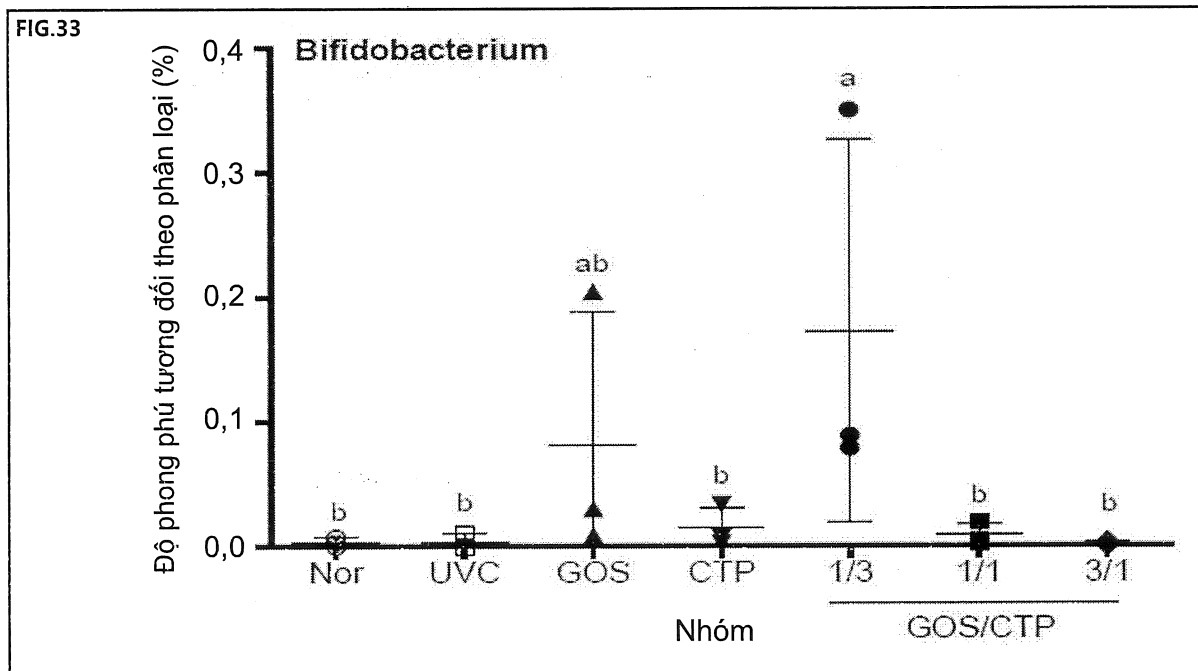
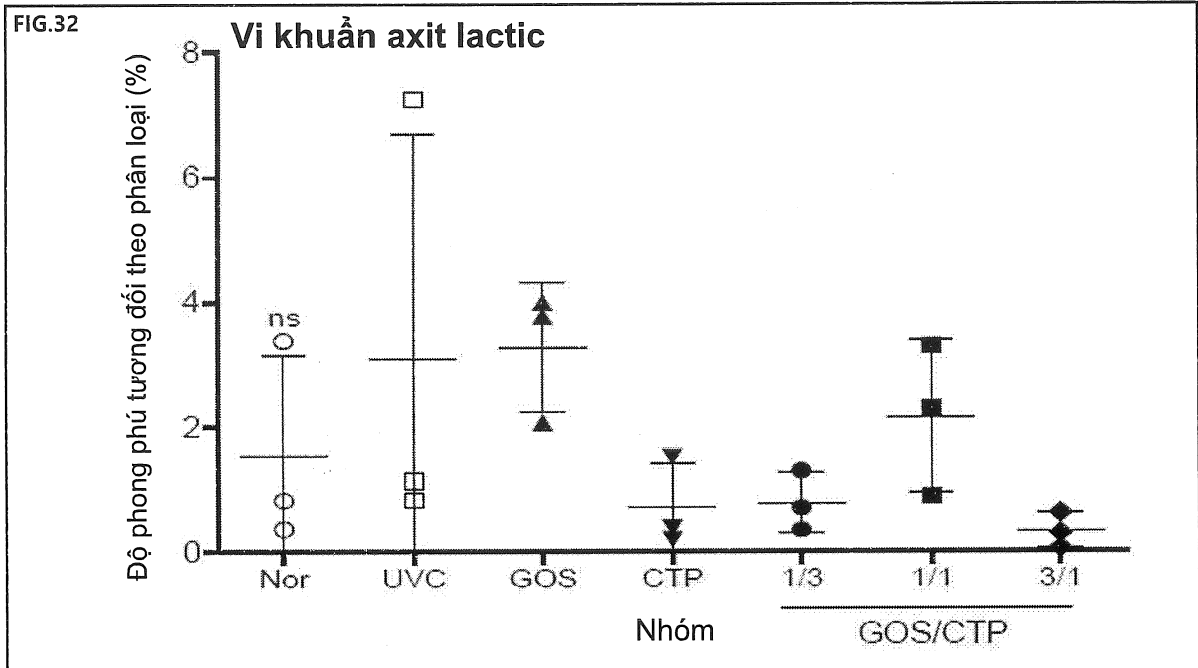
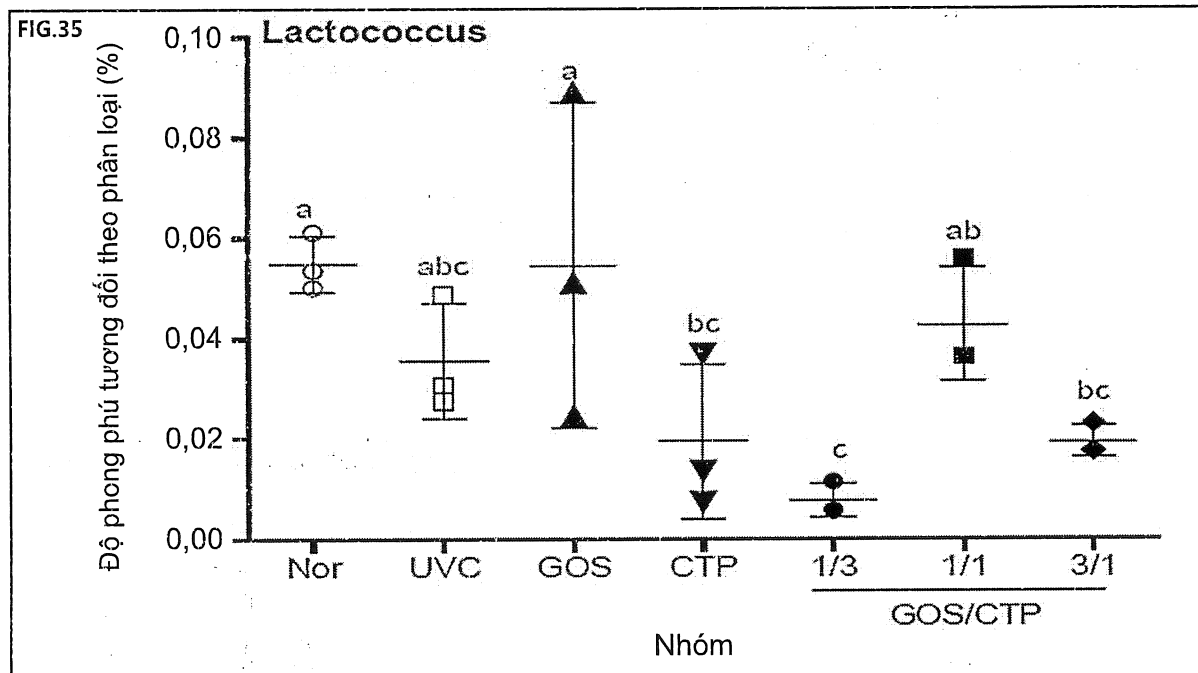
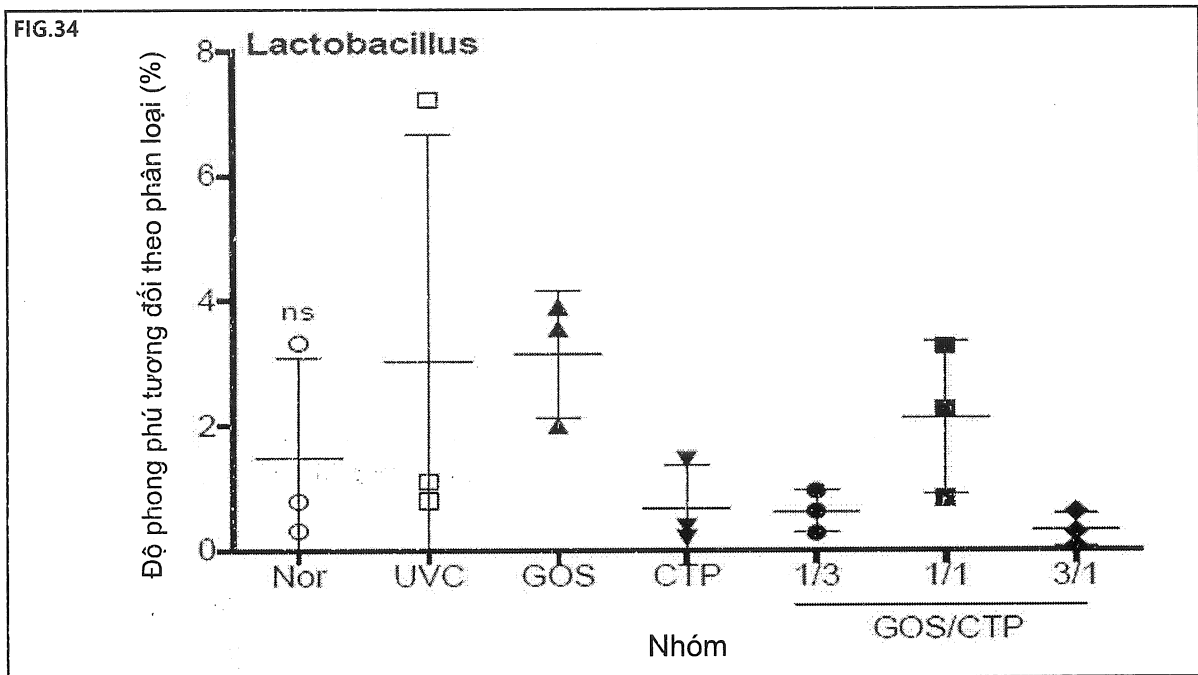


FIG.29









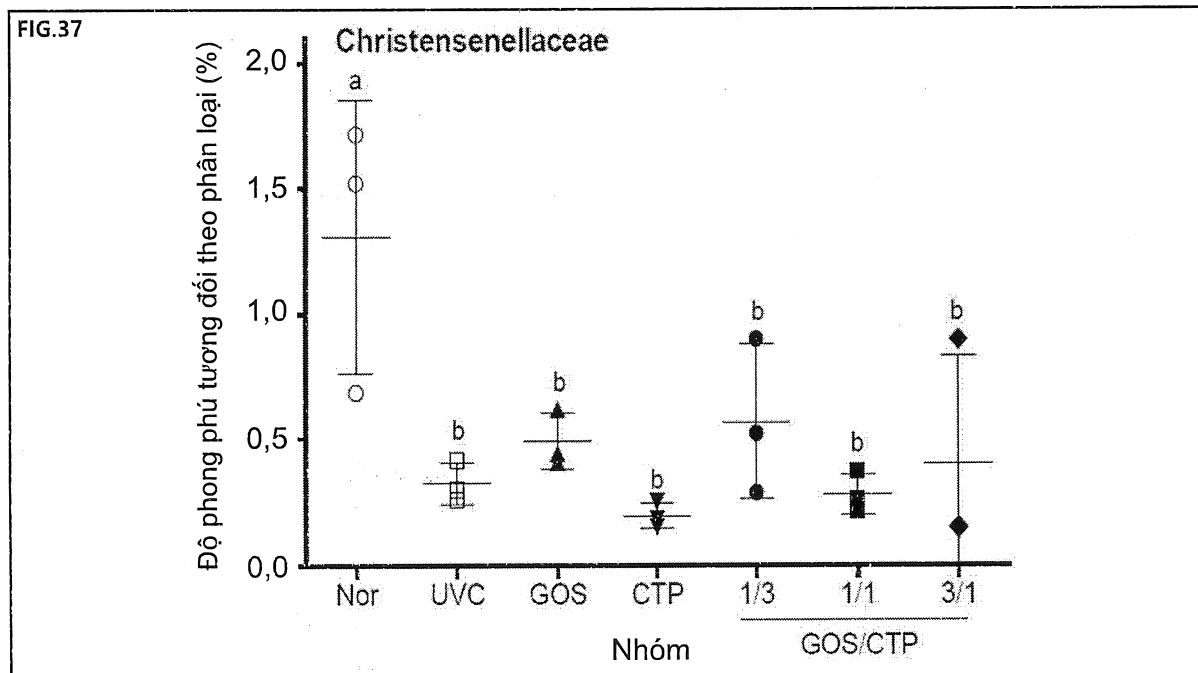
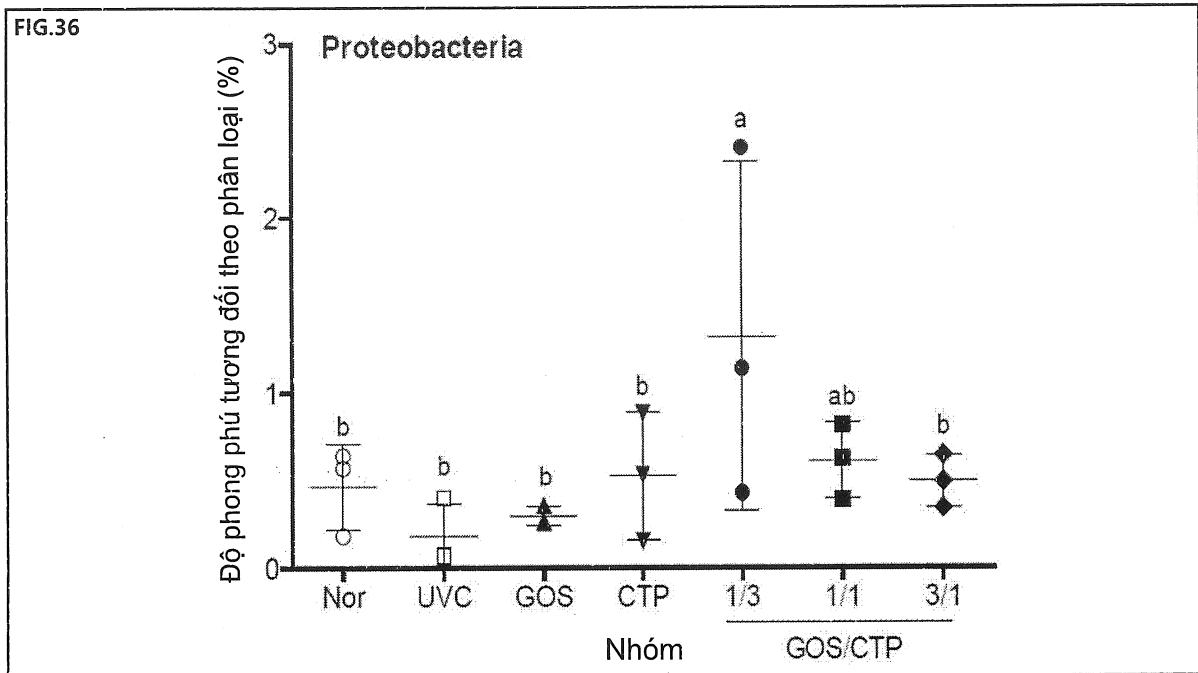


FIG.38

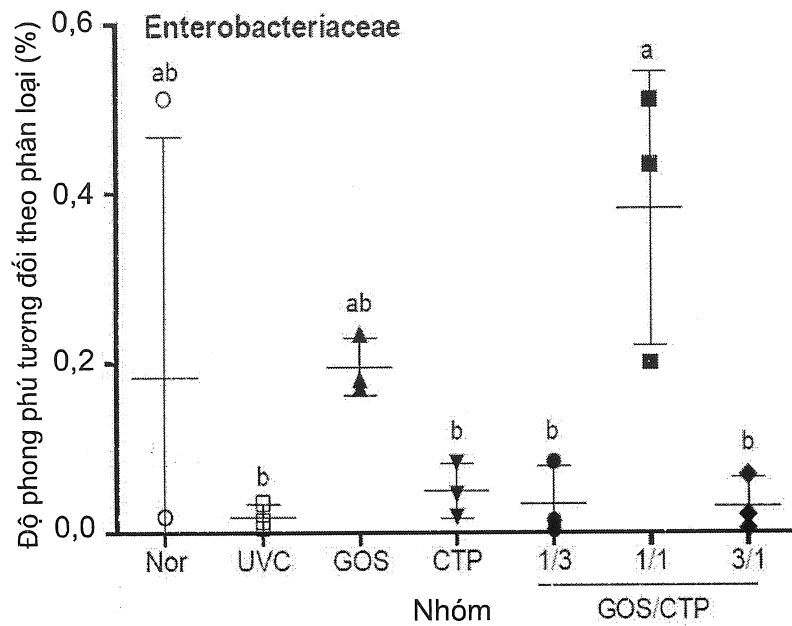


FIG.39

