



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

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt nam (VN)**

**CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11) 

**1-0019384**

(51)<sup>7</sup> **C12N 1/00, A01N 63/00, A23C 9/12**

(13) **B**

(21) 1-2010-01931

(22) 12.12.2008

(86) PCT/FR2008/001729 12.12.2008

(87) WO2009/103884 27.08.2009

(30) 0760377 26.12.2007 FR

0801342 12.03.2008 FR

(45) 25.07.2018 364

(43) 27.01.2011 274

(73) 1. LESAFFRE ET COMPAGNIE (FR)

41, rue Etienne Marcel, 75001 Paris, France

2. UNIVERSITE D'AUVERGNE CLERMONT 1 (FR)

Boulevard Francois Mitterrand F-63001 Clermont Ferrand Cedex 1, France

3. UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2 (FR)

42, rue Paul Duez F-59800 Lille, France

(72) SIMON, Jean-Luc (FR), PIGNEDE, Georges (FR), VANDEKERCKOVE, Pascal (FR), POULAIN, Daniel (FR), DESREUMAUX, Pierre (FR), DARFEUILLE - MICHAUD, Arlette (FR), SIVIGNON, Adeline (FR)

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO)

(54) **CHẾ PHẨM CHỨA TẾ BÀO NẤM MEN SACCHAROMYCES CEREVISIAE VÀ KIT CHỨA TẾ BÀO NẤM MEN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng nấm men mới, nấm men thu được từ chủng này, chế phẩm chứa ít nhất một nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và/hoặc dẫn xuất của nấm men có lợi ích đặc biệt làm phụ gia thực phẩm và/hoặc thực phẩm chứa lợi khuẩn và/hoặc thực phẩm chức năng và/hoặc dược thực phẩm và/hoặc thành phần chức năng và/hoặc thành phần có hoạt tính trong dược mỹ phẩm và/hoặc trong dược phẩm. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa tế bào nấm men nêu trên dùng trong lĩnh vực dinh dưỡng của người và/hoặc động vật hoặc dùng để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh viêm.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực dinh dưỡng và sức khỏe của người/và hoặc động vật. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chủng nấm men mới và nấm men mới thu được từ chủng này. Các nấm men này rất có lợi cho đường tiêu hóa và/hoặc được dùng để phòng ngừa và/hoặc điều trị các rối loạn của đường tiêu hóa ở người hoặc động vật.

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

Nhiều ứng dụng và lợi ích dinh dưỡng của các vi sinh vật có lợi cho đường tiêu hóa ở người đã được mô tả trong các tài liệu chuyên ngành như WO 2006/021965.

Về sau, các vi sinh vật này được gọi chung bằng thuật ngữ “men vi sinh” hay còn gọi là “lợi khuẩn”. Các thuật ngữ này chỉ các vi sinh vật sống có khả năng cải thiện sức khỏe đường ruột của vật chủ khi được dùng với lượng vừa đủ (tài liệu: FAO/WHO Expert Consultation Probiotics in food, FAO Food and nutrition paper Nr85, ISBN 92-5-105513-0).

Các lợi ích của việc dùng các vi sinh vật này qua đường miệng rất lớn, tùy thuộc vào chủng vi sinh vật được dùng, nhưng cũng phụ thuộc vào dạng dùng của chúng. Tuy cùng một loài, nhưng tác dụng quan sát được lại khác nhau và phụ thuộc vào chủng được dùng, đôi khi có lợi, đôi khi có hại hoặc đôi khi không mang lại lợi ích gì, ví dụ trong cùng loài *Escherichia coli*, có thể tìm thấy cả chủng có khả năng gây bệnh (như loại sinh độc tố trong ruột hoặc loại gây xuất huyết ruột) lẫn chủng có lợi như chủng Nissle 1917 (M. de Vrese; P.R. Marteau. *Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea*, 2007, J. Nutr., 137(3 Suppl. 2), 803S-811S). Do đó, hiện nay chưa thể dự đoán được tác dụng đối với sức khỏe con người của một chủng khi được dùng và cũng chưa thể dự đoán được cơ chế tác dụng hoặc mức độ tác động của chúng.

Một số chủng vi sinh vật nhất định, trong số đó đáng chú ý là nấm men và vi khuẩn lactic, đã được xác định là có một số tác dụng đối với đường dạ dày-ruột. Tuy nhiên, để thu được tác dụng tối ưu ở đường dạ dày-ruột thì phải dùng đồng thời vài chủng có đặc tính khác nhau (I. Goktepe; V.K. Juneja; M. AhmeADN (eds.) *Probiotics in Food Safety and Human Health* 2006, CRC Taylor & Francis, ISBN I-57444-514-6).

Ngoài ra, đã quan sát thấy một lượng lớn vi sinh vật, cụ thể là vi khuẩn lactic, có tác động tiền viêm (gây viêm). Tác động này đã được chứng minh là rất có hại và không mong muốn, ví dụ trong bệnh tự miễn hoặc thiếu hụt hoặc suy giảm miễn dịch.

Một bộ phận nấm men và/hoặc dẫn xuất của chúng cùng với lợi ích của chúng đối với đường tiêu hóa đã được bộc lộ.

Theo đó, tác dụng ức chế sự bám dính của các nguồn gây bệnh của mannoprotein có nguồn gốc từ nấm men cũng đã được bộc lộ. Tương tự, việc sử dụng thành tế bào của nấm men làm chất xơ cũng đã được bộc lộ. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* chưa được biết đến và, không phải tất cả chúng đều có lợi hoặc có tác dụng như nhau.

Ngoài ra, phụ thuộc vào chủng được dùng và các dạng dùng, các tác dụng này có thể rất khác nhau.

Tương tự, vẫn cần có các chủng vi sinh vật mới có thể tạo ra lợi ích đối với sức khỏe nhờ tác dụng phòng ngừa và/hoặc chữa khỏi một số bệnh lý hoặc một số rối loạn chức năng cụ thể, hoặc tác động có lợi đến tình trạng sức khỏe chung cả tinh thần lẫn thể chất.

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

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) số CNCM I-3856, và chủng *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* mới được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3799.

Sáng chế còn đề xuất nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thu được từ chủng được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3856, và nấm men *Saccharomyces var. boulardii* thu được từ chủng được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3799.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm chứa nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thu được từ chủng được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3856 và/hoặc nấm men *Saccharomyces var. boulardii* thu được từ chủng được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3799 và/hoặc ít nhất một dẫn xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được chọn từ chất chiết của nấm men, dẫn xuất của thành tế bào nấm men, glucan của thành tế bào nấm men, mannoprotein của thành tế bào nấm men, các phần lipid của nấm men, và các phần axit nucleic của nấm men (ARN, ADN).

Chế phẩm theo sáng chế có các ưu điểm sau:

- Có khả năng chịu được môi trường của dạ dày và sống sót khi đi qua hàng rào của dạ dày, đặc biệt khi nó ở dạng khô, nhờ đó tối ưu hóa tác dụng của nó ở đường dạ dày-ruột;
- Có tác dụng kháng viêm;
- Không tạo ra tác động gây viêm hoặc nếu có thì rất nhỏ;
- Có khả năng giảm đau cho ruột, và cuối cùng,
- Có khả năng phòng ngừa và làm giảm sự bám dính và tạo hệ khuẩn lạc của vi khuẩn gây bệnh và/hoặc vi khuẩn gây bệnh có khả năng xâm lấn vào đường dạ dày-ruột, đặc biệt là ở ruột non và ruột kết.

Chế phẩm này có nhiều đặc tính chưa từng được bộc lộ và xác định trước đó. Do đó, nó được quan tâm đặc biệt.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm nêu trên dùng để sản xuất thực phẩm bổ sung và/hoặc thực phẩm chứa vi sinh vật có lợi cho đường ruột và/hoặc thực phẩm chức năng và/hoặc thành phần dinh dưỡng và/hoặc thành phần chức năng trong dược-mỹ phẩm và/hoặc dược phẩm, dùng cho người và/hoặc động vật.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm như được xác định ở trên dùng để sản xuất thực phẩm dùng để tăng cường sức khỏe cho đường dạ dày-ruột và/hoặc cải thiện hệ vi sinh vật của đường ruột.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm như được xác định ở trên dùng để bào chế được phẩm dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn của ruột, các rối loạn chức năng của ruột hoặc các bệnh lý của dạ dày-ruột.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm như được xác định ở trên dùng để bào chế được phẩm dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh lý hoặc các rối loạn của ruột được biểu hiện bằng tình trạng tăng cảm đau.

Mục đích cuối cùng của sáng chế là đề xuất kit chứa ít nhất một nấm men và/hoặc ít nhất một dẫn xuất của nấm men như được xác định ở trên ở dạng thích hợp để dùng qua đường miệng.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1 minh họa kết quả theo dõi sự sống sót của nấm men ScPro1 trong hệ tiêu hóa nhân tạo mô phỏng ruột kết ở người theo ví dụ 2.

Fig.2 minh họa ảnh hưởng của nấm men ScPro1 đến hệ vi sinh vật trong ruột kết theo ví dụ 2.

Fig.3 và 4 minh họa sự phát triển của số lượng tế bào *Candida albicans* ở phân chuột nhất ở thử nghiệm 1 và 2 trong ví dụ 5 tương ứng với mô hình điều trị phòng ngừa (Fig.3) và điều trị (Fig.4).

Fig.5 thể hiện phần trăm bám dính dư của tế bào *Escherichia coli* AIEC LF82 vào tế bào biểu mô ruột người theo lượng nấm men ScPro1 được ủ trước; tế bào nấm men này được ủ với tế bào biểu mô ruột trong một giờ. Việc gây nhiễm tế bào này bằng chủng AIEC LF82 được tiến hành với sự có mặt của nấm men ScPro1 theo ví dụ 6.

Fig.6 thể hiện phần trăm bám dính dư của tế bào *Escherichia coli* AIEC LF82 vào tế bào biểu mô ruột người theo lượng nấm men ScPro1 được ủ trước; tế bào nấm men và tế bào *Escherichia coli* cùng được ủ với tế bào biểu mô ruột trong một giờ theo ví dụ 6.

Fig.7 thể hiện kết quả ước tính mức độ viêm ruột ở chuột nhất theo thang điểm Wallace vĩ mô sau khi dùng nấm men ScPro1 và SCB1 theo ví dụ 4.

Fig.8 thể hiện kết quả ước tính mức độ viêm tế bào biểu mô ở ruột ở chuột nhất theo thang điểm Wallace mô học sau khi dùng nấm men ScPro1 và SCB1 theo ví dụ 4.

Fig.9 thể hiện kết quả ước tính mức độ viêm ruột theo thang điểm Wallace vĩ mô sau khi dùng nấm men ScPro1 và SCB1 riêng lẻ hoặc kết hợp theo ví dụ 4.

Fig.10 thể hiện kết quả ước tính mức độ viêm tế bào biểu mô ruột ở chuột nhất theo thang điểm Ameho mô học sau khi dùng nấm men ScPro1 và SCB1s, riêng lẻ hoặc kết hợp theo ví dụ 4.

Fig.11 thể hiện mức độ biểu hiện ARN thông tin của gen mã hóa protein IL-10 tại thời điểm một giờ và ba giờ sau khi cho nấm men theo sáng chế hoặc dẫn xuất của chúng tiếp xúc với tế bào biểu mô ruột người theo ví dụ 7.

Fig.12 thể hiện mức độ biểu hiện ARN thông tin của gen mã hóa thụ thể nhân PPAR $\alpha$  tại thời điểm một giờ và ba giờ sau khi cho nấm men theo sáng chế hoặc dẫn xuất của chúng tiếp xúc với tế bào biểu mô ruột người theo ví dụ 7.

Fig.13 thể hiện kết quả điều chỉnh mức độ biểu hiện ARN thông tin của gen mã hóa protein IL-10 tại thời điểm một giờ và ba giờ sau khi cho dẫn xuất của nấm men theo sáng chế tiếp xúc với tế bào biểu mô ruột người theo ví dụ 7.

Fig.14 thể hiện mức độ biểu hiện của gen mã hóa protein IL-10 trong tế bào biểu mô ruột ở chuột nhất sau khi dùng nấm men theo sáng chế và/hoặc dẫn xuất của chúng (Ví dụ 4).

Fig.15 thể hiện mức độ biểu hiện của gen mã hóa thụ thể nhân PPAR $\alpha$  ở tế bào biểu mô ruột ở chuột nhất sau khi dùng nấm men theo sáng chế và/hoặc dẫn xuất của chúng (Ví dụ 4).

Fig.16 thể hiện lượng xytokin IL-10 được tế bào ruột tiết ra, được tính bằng pg/ml, trong sinh thiết ruột lấy từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoặc của bệnh

nhân không mắc bệnh sau khi cho tiếp xúc với nấm men theo sáng chế và dẫn xuất của chúng (Ví dụ 8).

Fig.17 thể hiện lượng xytokin TNF- $\alpha$  được tính bằng pg/ml, được tế bào ruột tiết ra, trong sinh thiết ruột lấy từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoặc của bệnh nhân không mắc bệnh sau khi cho tiếp xúc với nấm men theo sáng chế và/hoặc dẫn xuất của chúng (Ví dụ 8).

Fig.18 thể hiện kết quả của thử nghiệm xác định khả năng liên kết của pili loại 1 đối với phần mannoprotein (EL 05 và EL 06) của nấm men ScPro1.

Fig.19A và 19B lần lượt thể hiện phần trăm xâm lấn dư trung bình và phần trăm bám dính dư trung bình của chủng AIEC LF82 với tế bào T84, khi đồng thời ủ và tăng lượng nấm men (Ví dụ 6) - \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Fig.20A và 20B lần lượt thể hiện phần trăm xâm lấn dư trung bình và phần trăm bám dính dư trung bình của chủng AIEC LF82 với tế bào T84, khi đồng thời ủ và tăng lượng mannoprotein của nấm men EL05 (Ví dụ 6).

Fig.21A và 21B lần lượt thể hiện % xâm lấn dư trung bình và phần trăm bám dính dư trung bình của chủng AIEC LF82 với tế bào T84, khi đồng thời ủ và tăng lượng nấm men (Ví dụ 6) - \*  $p < 0,05$ , và \*\*  $p < 0,01$ .

Fig.22A và 22B lần lượt thể hiện phần trăm xâm lấn dư trung bình và % bám dính trung bình của chủng AIEC LF82 với tế bào T84, khi đồng thời ủ và tăng lượng mannoprotein của nấm men EL05 (Ví dụ 6) - \*  $p < 0,05$ , và \*\*  $p < 0,01$ .

Fig.23 thể hiện phần trăm bám dính dư của chủng AIEC LF82 với tế bào CHO-K1 và tế bào CHO-K1/CEACAM6, khi đồng thời ủ trước và tăng lượng nấm men ScPro1 khô dùng ngay (Ví dụ 6) - \*  $p < 0,05$ , và \*\*  $p < 0,01$ .

Fig.24 thể hiện mức độ bám dính của chủng AIEC LF82 hoặc của thể đột biến LF82- $\delta$ fimH không pili hóa vào bờ dạng bàn chải của tế bào ruột của 3 mẫu tế bào lấy từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn (Ví dụ 6).

Fig.25 thể hiện kết quả xác định ngưỡng cảm nhận đau (được tính bằng mm thủy ngân) của các loại nấm men khác nhau ở chuột nhắt khỏe mạnh (Ví dụ 9).

Fig.26 thể hiện kết quả xác định ngưỡng cảm nhận đau (được tính bằng mm thủy ngân) của các loại nấm men khác nhau ở chuột nhắt khỏe mạnh có bản năng nhạy cảm (Ví dụ 9).

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Chúng được tác giả sáng chế lưu giữ theo Hiệp ước Budapest tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia (Viện Pasteur Paris) với số CNCM I-3856 sẽ được gọi là “ScProI”.

Chúng cũng được tác giả sáng chế lưu giữ theo hiệp ước Budapest tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia (Institut Pasteur Paris) với số CNCM I-3799 sẽ được gọi là “SCBI”.

Cuối cùng, dẫn xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được lựa chọn từ chất chiết của nấm men, dẫn xuất của thành tế bào nấm men, glucan của thành tế bào nấm men, mannoprotein của thành tế bào nấm men, các phần lipid của nấm men, các phần axit nucleic của nấm men (ARN, ADN) và hỗn hợp của chúng, sẽ được gọi là “dẫn xuất”.

“Lợi khuẩn” (probiotic) là thuật ngữ dùng để chỉ các vi sinh vật sống khi được phối hợp với số lượng vừa đủ sẽ tạo ra tác dụng có lợi cho sức khỏe, giúp giảm đau và cân bằng thể chất với tinh thần, tác dụng này lớn hơn tác dụng dinh dưỡng truyền thống.

Thực phẩm dinh dưỡng hoặc dược-thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng, hoặc dược-mỹ phẩm chỉ thực phẩm chứa thành phần có tác dụng có lợi cho sức khỏe, hoặc có khả năng cải thiện các chức năng sinh lý.

Thực phẩm bổ sung chỉ thực phẩm dùng để cung cấp thêm dinh dưỡng cho chế độ ăn thông thường. Thực phẩm bổ sung là nguồn bổ sung chất dinh dưỡng hoặc các hợp chất khác có giá trị dinh dưỡng hoặc tác dụng sinh lý ở dạng cô đặc khi được sử dụng một mình hoặc dưới dạng hỗn hợp của các lượng nhỏ.

Các thực phẩm được dùng làm thực phẩm đặc biệt (DDAP) dùng để chỉ thực phẩm có mục đích dinh dưỡng cụ thể, dùng cho một nhóm người nhất định, như trẻ sơ sinh, trẻ đang chập chững đi, và vận động viên thể thao.



Chế phẩm ở dạng thực phẩm như được đề cập trong sáng chế có thể là thực phẩm bổ sung hoặc DDAP.

Các chủng được các tác giả sáng chế xác định có nhiều ưu điểm và đáng chú ý là khả năng tạo ra tác động có lợi đến đường tiêu hóa ở người, đặc biệt ở ruột non, và ruột kết, cũng như trên toàn bộ cơ thể.

Đáng ngạc nhiên là, không giống như nhiều chủng nấm men khác, nấm men ScProI và/hoặc SCBI và/hoặc dẫn xuất của chúng có tác dụng kháng viêm, và các chủng này cũng không có tác động gây viêm.

Thực vậy, nấm men ScProI và/hoặc SCBI và/hoặc dẫn xuất của chúng làm tăng khả năng tiết interleukin IL-10, một yếu tố liên quan đến các tín hiệu kháng viêm. Ngoài ra, không giống như tác dụng của lợi khuẩn thuộc loài *Lactobacilli*, chủng ScProI và/hoặc SCBI và/hoặc dẫn xuất của chúng không tạo ra quá trình tổng hợp xytokin gây viêm IL-12. Tương tự, các lợi khuẩn cũng làm giảm mạnh lượng xytokin gây viêm TNF $\alpha$  và IFN $\gamma$  được tạo ra. Hơn thế nữa, các thử nghiệm đã cho thấy tác dụng kháng viêm *in vivo* của nấm men ScProI, đáng chú ý là nó làm giảm một nửa mức độ viêm trong ruột già và giảm một phần ba mức độ hoại tử ruột.

Ngoài ra, nấm men ScProI và/hoặc SCBI và/hoặc dẫn xuất của chúng, ở dạng khô có khả năng đi qua hàng rào dạ dày mà sức sống và tính toàn vẹn của chúng không bị ảnh hưởng và chúng cũng không lưu lại trong môi trường ruột.

Các tác giả sáng chế lần đầu tiên chứng minh được và ngạc nhiên phát hiện thấy nấm men ScProI và/hoặc SCBI và/hoặc dẫn xuất của chúng có thể làm tăng khả năng chịu đau, đáng chú ý là trên mô hình chuột nhắt *in vivo*.

Ngoài các tác động có lợi nêu trên, nấm men ScProI và/hoặc SCBI và/hoặc dẫn xuất của chúng còn có khả năng ức chế sự tạo thành hệ khuẩn lạc và/hoặc sự xâm lấn của các vi sinh vật gây bệnh và/hoặc các vi sinh vật xâm lấn ruột. Việc dùng nấm men này sẽ làm giảm lượng vi khuẩn đường ruột ở ruột kết và lượng vi sinh vật thuộc hệ vi sinh vật đường ruột kháng kháng sinh.

Cụ thể, nấm men này đã được biết đến nhờ tác dụng phòng ngừa và điều trị chống lại sự tạo thành hệ khuẩn lạc của nấm *Candida albicans* và các viêm

nhiễm ở đường ruột có thể do loại nấm này gây ra và duy trì. Ngoài ra, nấm men theo sáng chế có tác dụng ức chế sự bám dính và xâm lấn của các chủng gây bệnh và/hoặc các chủng *Escherichia coli* gây bệnh và có khả năng xâm lấn phân lập được từ sinh thiết ruột hồi của bệnh nhân mắc bệnh Crohn.

Theo sáng chế, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng có thể được dùng ở dạng sống hoặc dạng có thể sống, tốt hơn nếu được dùng qua đường miệng.

Thuật ngữ “dạng sống” hoặc “dạng có thể sống” theo sáng chế chỉ nấm men, sản phẩm chuyển hóa của nó có hoạt tính hoặc có thể có tái hoạt động hoặc có khả năng sao chép. Thuật ngữ này đặc biệt chỉ nấm men ở dạng nấm men khô hoặc dạng nấm men tươi.

Thông thường, nấm men tươi ở dạng mảng ép hoặc bánh. Chúng cũng có thể ở dạng lơ lửng trong pha nước, và sau đây gọi là nấm men lỏng. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu nấm men được bao nang. Phương pháp bao nang và các loại nang khác nhau đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ.

Trong số các dạng nấm men khô, có thể kể đến dạng nấm men khô dùng ngay hoặc dạng khô có hoạt tính. Nấm men khô là nấm men bất kỳ có hàm lượng chất khô trên 90%, tốt hơn nếu nằm trong khoảng 92% đến 96%.

Trong số các dạng nấm men khô, có thể kể thêm đến dạng nấm men có độ ẩm vừa phải, được làm lạnh đông sâu hoặc không.

Nấm men khô dùng ngay chủ yếu dùng trong công nghiệp và ở các cơ sở sản xuất bánh. Các ứng dụng khác của nấm men và sản phẩm của chúng cũng có thể kể đến dựa trên ngành thực phẩm được nêu (dược phẩm, lên men rượu). Đặc điểm nổi bật của loại nấm men khô này là không cần hòa tan trong nước trước khi trộn nó với bột mỳ.

Việc hòa tan nấm men trong nước nhờ tác động của gradient của không khí nóng cho phép biến đổi sản phẩm dạng bột nhão (nấm men dạng ép hoặc lỏng) thành sợi khô và mỏng, đồng thời vẫn giữ được hoạt tính. Sau đó, sản phẩm này nên được giữ ổn định trong môi trường không có oxy.

Nấm men khô có hoạt tính là nấm men sống, được làm khô ở nhiệt độ thấp để nó vẫn giữ được khả năng lên men và có thời gian bảo quản dài. Nó có dạng hình cầu.

Sản phẩm thu được từ việc hòa tan nấm men trong nước nhờ tác động phối hợp giữa gia nhiệt và tác động cơ học cho phép biến đổi nấm men ở dạng bột nhão thành dạng sản phẩm khô nhưng không ảnh hưởng đến khả năng sống của chúng.

Các nấm men có hoạt tính chọn lọc thu được bằng cách ép đùn và làm khô sinh khối (tế bào nấm men sống) trong thiết bị tầng sôi. Nấm men khô có hoạt tính này, nghĩa là nấm men khô có số lượng tế bào nấm men sống cao, được trình bày ở dạng hạt có đường kính nằm trong khoảng từ 0,1µm đến 2,5mm, và lượng nước H<sub>2</sub>O chiếm 4-8% khối lượng.

Các dạng khô này có ưu điểm là có khả năng sống tốt hơn trong môi trường dạ dày so với dạng tươi và tối ưu được tác dụng có lợi của nấm men theo sáng chế. Theo sáng chế, nấm men theo sáng chế được ưu tiên ở dạng nấm men khô có hoạt tính.

Đã biết rằng các xytokin gây viêm kích thích các cơ chế gây viêm, và sau đó, có thể tạo ra nhiều vấn đề lâm sàng, đáng chú ý là ở các bệnh tự miễn hoặc suy giảm miễn dịch.

Do đó, nấm men theo sáng chế có thể được dùng để phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh hoặc các rối loạn viêm của ruột, bất kể mạn tính hoặc cấp tính, đi kèm với ỉa chảy hoặc táo bón hoặc không.

Theo phương án đầu tiên, các rối loạn và các bệnh có đi kèm với ỉa chảy hoặc không.

Theo phương án thứ hai, các rối loạn và các bệnh không đi kèm với ỉa chảy. Đáng chú ý là, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng có thể hữu dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh viêm của ruột đặc trưng chủ yếu bởi viêm ruột kết.

Cụ thể, nấm men này được điều chỉnh hợp lý để phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh viêm ruột mạn tính (Chronic Inflammatory Bowel Diseases -

CIBD), đáng chú ý là bệnh viêm loét đại tràng, viêm kết trực tràng xuất huyết, các bệnh không dung nạp gluten hoặc bệnh Crohn.

Đáng chú ý là, các bệnh này đặc trưng bởi đáp ứng miễn dịch gia tăng, trong đó liên quan đến các đợt đa viêm. Do đó, trong nội dung về tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nêu trên bằng thực phẩm chứa lợi khuẩn và/hoặc thuốc dưới dạng thực phẩm và/hoặc thực phẩm chức năng và/hoặc dược thực phẩm và/hoặc dược mỹ phẩm, điều quan trọng là tác động tiền viêm ở mức độ nhỏ nhất có thể.

Do đó, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng theo sáng chế đặc biệt thích hợp cho các mục đích sử dụng này. Nấm men này có một số ưu điểm bổ sung.

Đầu tiên, nó có khả năng làm tăng khả năng chịu đau. Thứ hai, đặc biệt là đối với bệnh Crohn, nấm men này có khả năng đặc biệt, đó là ức chế sự bám dính và khả năng xâm lấn của chủng *E. coli* gây bệnh và/hoặc các chủng có khả năng xâm lấn ở bệnh nhân mắc bệnh này.

Đáng chú ý là, đáp ứng viêm có thể do sự xâm lấn của tất cả vi sinh vật gây bệnh gây ra.

Do đó, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng theo sáng chế phòng ngừa hoặc điều trị hiệu quả các rối loạn ruột-dạ dày hoặc các bệnh do sự tạo thành hệ khuẩn lạc của vi sinh vật gây bệnh và/hoặc chủng có khả năng xâm lấn, sinh vật nhân sơ, như vi khuẩn, hoặc sinh vật nhân thực, như nấm.

Các rối loạn hoặc bệnh của dạ dày-ruột có thể là bệnh viêm ruột mạn tính như viêm loét đại tràng, bệnh không dung nạp gluten, bệnh Crohn, và viêm kết trực tràng xuất huyết.

Ngoài ra, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng cho phép làm tăng khả năng chịu đau, nó cũng có ưu điểm trong điều trị phòng ngừa hoặc điều trị bệnh lý hoặc rối loạn của ruột đặc trưng bởi tình trạng tăng cảm đau. Cụ thể, các bệnh lý hoặc các rối loạn này có thể là các rối loạn chức năng của ruột, các bệnh viêm ruột mạn tính (CIBD), hoặc các bệnh không dung nạp thực phẩm (dị ứng, tình trạng bệnh, v.v.) khác biệt bởi đau phủ tạng mạn tính.

Nó cũng được điều chỉnh hợp lý để điều trị phòng ngừa hoặc điều trị chứng tăng cảm giác đau và cụ thể là hội chứng ruột kích thích (irritable bowel syndrome - IBS) bất kể ở dạng nào (táo bón, tiêu chảy hoặc kết hợp cả hai), nhưng cũng bao gồm các dạng đau phủ tạng mạn tính không được phân loại vào IBS, như các dạng đau chức năng bất thường không rối loạn trong đi cầu (FAPS: Functional Abdominal Pain) và các dạng đau liên quan đến các bệnh không dung nạp thực phẩm và bệnh không dung nạp gluten.

Do đó, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng hoặc chế phẩm bất kỳ chứa chúng, có thể được dùng để điều trị phòng ngừa cho đối tượng bị di truyền hoặc dễ mắc rối loạn hoặc bệnh này, hoặc điều trị, ví dụ khi mắc bệnh hoặc trong thời gian dài hơn. Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể làm giảm đau cho các đối tượng, làm giảm các triệu chứng hoặc nguyên nhân gây ra các rối loạn này.

Các tác động phối hợp của nấm men theo sáng chế và/hoặc dẫn xuất của nó đến chứng đau, viêm hoặc các vi sinh vật gây bệnh và/hoặc các vi sinh vật của đường ruột giúp cải thiện trạng thái cân bằng giữa tinh thần với thể chất, cải thiện sức khỏe và/hoặc tình trạng của đường dạ dày-ruột ở người hoặc động vật.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa nấm men ScPro1 và/hoặc nấm men SCB1 và/hoặc ít nhất một dẫn xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được lựa chọn từ chất chiết của nấm men, dẫn xuất của thành tế bào nấm men, glucan của thành tế bào nấm men, các mannoprotein của thành tế bào nấm men, các phần lipid của nấm men, và các phần axit nucleic của nấm men (ARN, ADN) với lượng nằm trong khoảng từ  $10^7$  đến  $6.10^{10}$ CFU, và tốt hơn nếu nằm trong khoảng  $10^8$  đến  $2.10^{10}$ CFU, hoặc, nằm trong khoảng từ 1mg đến 10g, và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1mg đến 1g. Lượng này có thể là lượng hằng ngày, dùng một hoặc vài lần trong ngày.

Tốt hơn, nếu nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng được dùng trong các ứng dụng điều trị bệnh hoặc các ứng dụng không dùng để điều trị bệnh với liều hằng ngày nằm trong khoảng từ  $10^7$  đến  $6.10^{10}$ CFU (đơn vị

tạo khuẩn lạc - Colony-Forming Units), và tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ  $10^8$  đến  $2.10^{10}$  CFU.

Trường hợp khi nấm men và/hoặc dẫn xuất của chúng ở dạng sống nhưng không thể sống sót được thì tốt hơn nếu liều hằng ngày trong các ứng dụng điều trị bệnh hoặc các ứng dụng không dùng để điều trị bệnh nằm trong khoảng từ 1mg đến 10g, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1mg đến 1g. Liều cho hiệu quả hằng ngày có thể được dùng một, hai, ba hoặc bốn lần.

Tốt hơn, nếu nấm men và/hoặc dẫn xuất của chúng theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa nó được dùng qua đường miệng. Chúng cũng có thể được dùng với liều cho hiệu quả điều trị, đó là liều làm giảm hoặc ức chế ít nhất một trong số các triệu chứng.

Nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng có thể có mặt trong thực phẩm dành cho người hoặc động vật và/hoặc được dùng cùng với tá dược hoặc chất mang thích hợp dùng qua đường miệng.

Chế phẩm dùng làm thực phẩm cho người có thể ở dạng lỏng, bột nhão hoặc rắn. Đáng chú ý là, chế phẩm này có thể là sản phẩm dùng hằng ngày như pho mát, bơ, sữa chua hoặc kem, sản phẩm chế biến từ quả như nước ép trái cây, mứt quả, đồ uống hoặc thực phẩm rắn, ví dụ thức ăn nhẹ (snack), bánh quy hoặc các dạng thực phẩm khác. Do đó, chế phẩm sẽ chứa nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng và các thành phần khác của thực phẩm hoặc của đồ uống nêu trên.

Nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng cũng có thể có mặt trong dược phẩm. Dược phẩm này được điều chỉnh để dùng qua đường miệng. Do đó, dược phẩm chứa nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng cùng với chất mang thông thường thích hợp, được lựa chọn từ các tá dược được chấp nhận dùng để bào chế dược phẩm. Dược phẩm này được bào chế ở dạng lỏng như xiro hoặc chứa trong các lọ nhỏ, hoặc dưới dạng viên nén, viên nang gelatin, trong túi, viên nang hoặc dạng bột hoặc các dạng galenic khác thích hợp.

Ngoài ra, nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng được dùng cùng với các lợi khuẩn và/hoặc thành phần chức năng khác, tốt hơn là lợi khuẩn khác này giúp tác dụng phòng ngừa hoàn chỉnh hơn. Ví dụ, có thể kể đến vi khuẩn lactic thuộc loài *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, hoặc *Leuconostoc*.

Nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 và/hoặc dẫn xuất của chúng cũng có thể được dùng cùng với thành phần có hoạt tính khác như thuốc kháng sinh, thuốc giảm đau, thuốc chống tiêu chảy, thuốc nhuận tràng, và hỗn hợp của chúng.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế được minh họa bằng các ví dụ và hình vẽ đi kèm dưới đây. Các ví dụ này chỉ mang tính minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Khả năng sống sót của nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 trong hệ tiêu hóa nhân tạo mô phỏng ruột người

Nghiên cứu tỷ lệ chết của nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 khi đi qua dạ dày-ruột

Nấm men ScPro1 và/hoặc SCB1 được thử nghiệm và nghiên cứu *in vivo* trong hệ tiêu hóa nhân tạo mô phỏng đường tiêu hóa của người và cũng được nghiên cứu khả năng sống sót của chúng khi đi qua dạ dày-ruột.

Hai mẫu nấm men ScPro1 dạng khô có hoạt tính và hai mẫu nấm men SCB1 dạng khô có hoạt tính được thử nghiệm.

Cả hai mẫu trên đều được phân biệt bằng thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng trong chân không là thời gian sống của chúng nhỏ hơn 6 tháng hoặc 2 năm.

Các điều kiện thử nghiệm:

Tiến hành tiêu hóa trong hệ thống gọi là TIM1 (dạ dày + ruột non), trong điều kiện thử nghiệm được thiết lập theo số liệu được nêu trong tài liệu chuyên ngành và mô phỏng lại hiện tượng tiêu hóa thực phẩm lỏng (nước) ở người trưởng thành khỏe mạnh khi đói (dạ dày rỗng), đồng thời mô phỏng hiện tượng loại bỏ sản phẩm tiêu hóa bằng cách thẩm tách và hấp thụ. Tiến hành mỗi lần

tiêu hóa trong 5 giờ. Tất cả chúng đều được tiến hành trong cùng điều kiện thử nghiệm, nghĩa là:

Nhiệt độ:

Nhiệt độ bằng 37°C.

Các thông số của quá trình làm rỗng dạ dày:

Quá trình làm rỗng dạ dày được tiến hành theo quy tắc được Elashoff và các đồng tác giả xác định (1982), và theo phương trình sau:

$$F = t \cdot 2e^{-(1/T)^b}$$

trong đó, F là phần thức ăn đã cung cấp, t là thời gian, T là thời gian để tiêu thụ hết một nửa số thực phẩm đã cung cấp và b là thông số mô tả hướng của đường cong. Các thông số là: T = 15 phút; b = 1.

Các thông số của quá trình làm rỗng ruột hồi:

Quá trình làm rỗng ruột hồi tuân theo quy tắc Elashoff cải tiến (đưa thêm thông số d để quá trình làm rỗng giảm dần vào cuối thời gian tiêu hóa)

$$F_m = F + d * t^3.$$

Các thông số là: T = 150 phút; b = 2,4; d =  $-10^{-7}$  (xem Fig. 2).

Giá trị đặt độ pH:

Dạ dày (phút/pH): 0/6,0; 10/3,2; 20/2,4; 40/1,8; 60/1,6; 90/1,5; 300/1,5

Tá tràng: 6,4

Ruột chay: 6,9

Ruột hồi: 7,2

Các sản phẩm tiết của dạ dày:

HCl

Pepsin

Lipaza

Các sản phẩm tiết của ruột:

NaHCO<sub>3</sub> trong ba phần của ruột non

Dịch chiết mật trong tá tràng

Dịch chiết tuyến tụy trong tá tràng

Thẩm tách/Hấp thụ:



Tiến hành loại bỏ các phân tử “nhỏ” trong dịch sữa của ruột ở hai cấp độ TIM1 (ruột chay và ruột hồi) bằng cách thẩm tách máu. Tiến hành thẩm tách dịch sữa của ruột liên tục bằng dung dịch nước muối để thu được chế phẩm gần giống với chế phẩm của huyết tương từ máu. Các sản phẩm sau khi thẩm tách được thu gom và cho vào các túi thẩm tách.

Tiến hành lấy các mẫu khi tiêu hóa ở các cấp độ khác nhau trong đường ruột để theo dõi sự sống sót của nấm men được thử nghiệm.

Tiến hành đếm số lượng tế bào nấm men theo phương pháp vi sinh chuẩn và trên các mẫu đã lấy trong dạ dày tại thời điểm 10, 20, 30 và 45 phút tại đầu ra của ruột hồi sau khi tích lũy trong một giờ, và trong cặn cuối cùng thu được.

Phương pháp đếm như sau:

Pha loãng nhanh theo bậc mỗi mẫu theo tỷ lệ 1/10 trong nước muối sinh lý vô trùng (NaCl 8,5g/L), và sau đó, giữ lại 0,1ml mỗi dịch pha loãng và trải trên bề mặt môi trường gelloza được phân bố trong các đĩa Petri (hai đĩa/1 dịch pha loãng). Ủ các đĩa này trong 48 giờ ở 35°C trước khi tiến hành đếm số đơn vị tạo thành khuẩn lạc (Colony-Forming Units - CFU).

Kết quả đếm được biểu hiện bằng CFU/ml (số liệu thô) và dưới dạng số tế bào nấm men sống so với số tế bào nấm men được đưa vào ban đầu, để xác định tỷ lệ sống sót của nấm men trong dạ dày và khi ra khỏi ruột non.

Bảng dưới đây tóm tắt tỷ lệ sống sót theo lý thuyết (nếu sống 100%) và tỷ lệ sống sót thực tế thu được cho mỗi chủng trong dạ dày, ở tất cả các đầu ra của ruột hồi sau 5 giờ tiêu hóa, và trong toàn bộ hệ thống sau 5 giờ tiêu hóa.

Các kết quả:

| Các sản phẩm đã tiêu hóa | Lượng nấm men được đưa vào (CFU) | Ở đầu ra của dạ dày ở T=45 phút | Ở đầu ra của ruột hồi ở T=5 giờ | Tỷ lệ sống sót tổng số ở T=5 giờ |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Scpro1<br>Mê 1           | $3,5 \cdot 10^{10}$              | 89%                             | 100%                            | 106%                             |
| Scpro1<br>Mê 2           | $2,0 \cdot 10^{10}$              | 88%                             | 95%                             | 106%                             |
| SCB 1                    | $1,5 \cdot 10^{10}$              | 83%                             | 76%                             | 81%                              |
| SCB 2                    | $1,5 \cdot 10^{10}$              | 85%                             | 69%                             | 76%                              |

## Kết luận

Các kết quả này cho thấy sức sống của nấm men ScPro1 và SCB1 trong dạ dày-ruột.

Ví dụ 2: Khả năng sống sót của nấm men ScPro1 trong hệ tiêu hóa nhân tạo mô phỏng ruột người

Nghiên cứu khả năng sống sót của nấm men ScPro1 khi lên men trong ruột và ảnh hưởng của nó đến hệ vi sinh vật của ruột

Nấm men ScPro1 ở dạng khô có hoạt tính được thử nghiệm và nghiên cứu *in vitro* trong hệ tiêu hóa nhân tạo mô phỏng ruột người và tốt hơn là bằng cách nghiên cứu tỷ lệ chết và ảnh hưởng của môi trường đến khả năng sống sót các nấm men được thử nghiệm khi lên men trong ruột.

Quá trình lên men trong ruột là quá trình lên men liên tục bằng cách cung cấp môi trường theo trình tự nhất định nhằm duy trì hệ vi sinh vật của ruột. Môi trường này chủ yếu gồm các phức hydratcacbon, không tiêu hóa được ở phần trên của đường tiêu hóa (tinh bột, pecton, xenluloza, v.v.), các hợp chất protit được thủy phân nhiều hơn hoặc ít hơn và muxin.

Môi trường ruột cũng được lấy ra khỏi hệ thống lên men theo trình tự. Môi trường này cũng được thu hồi bằng hệ thống thẩm tách cho phép loại bỏ liên tục sản phẩm lên men tan.

Sản phẩm sau khi thẩm tách được thu gom để phân tích axit béo mạch ngắn (short chain fatty acid - SCFA). Môi trường này được giữ trong điều kiện hiếu khí được tạo ra bởi các khí lên men chuyên dụng và nó có điện thế oxy hóa khử nhỏ hơn -300 mV. Cuối cùng, độ pH được kiểm soát bằng cách đặt tại giá trị 6.

Mỗi quá trình tiêu hóa bao gồm các giai đoạn sau: giai đoạn ổn định hệ vi sinh vật trong 2-3 ngày sau khi chúng được đưa vào trong ruột, giai đoạn xử lý (ít nhất 3 ngày) với ít nhất một thao tác bổ sung sản phẩm hằng ngày, và giai đoạn ngừng xử lý trong 3 ngày.

Trong mỗi thử nghiệm, các thông số dưới đây được theo dõi và/hoặc ghi lại:

- Khả năng sống sót của nấm men

- Mức độ phát triển của quần thể vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí
- Mức độ giải phóng các sản phẩm lên men chính (SCFA và các khí)
- Phát hiện hoạt tính enzym tiêu chuẩn, và
- Nhiệt độ, độ pH và điện thế oxy hóa khử.

Quá trình lên men được tiến hành trong bình chứa penixilin dung tích 60ml, đóng chặt bằng nắp cao su có gen để vặn trên 30ml môi trường ruột (môi trường nuôi cấy + hệ vi sinh vật của phân mới thải). Mẫu nấm men được bổ sung vào 30ml môi trường.

Một mặt, môi trường ruột gồm huyền phù vi sinh vật thu được từ phân mới thải trong đệm phosphat và mặt khác, cũng gồm thực phẩm điển hình, cũng được dùng để nuôi cấy hệ vi sinh vật của ruột trong ruột nhân tạo.

Sau khi trộn môi trường ruột với sản phẩm được thử nghiệm, đậy nắp bình lại và vặn chặt.

Toàn bộ các thao tác nêu trên được tiến hành trong nắp kỵ khí (hỗn hợp các khí không chứa oxy). Các bình này được đặt vào trong máy ủ quay ( $37^{\circ}\text{C}$  – 200 vòng/phút) trong 24 giờ.

Đối với mỗi sản phẩm, thử nghiệm được tiến hành làm hai bản. Ngoài ra, 4 bình đối chứng (không chứa sản phẩm bất kỳ) được chuẩn bị trong cùng điều kiện. Hai bình được xử lý ngay (thời điểm ban đầu) và hai bình còn lại được ủ giống như các bình thử nghiệm.

Quá trình lên men được ngừng lại sau 24 giờ và các bình này sau đó được xử lý.

Tạo ra các khí có khả năng lên men: Thể tích khí được tạo ra khi lên men được xác định bằng các thiết bị của hệ thống Mariotte (nguyên tắc của phép đo dựa trên thể tích nước bị thay thế bằng khí tạo áp chứa trong bình chứa penixilin). Phân tích các khí có mặt trong bình được tiến hành bằng GPC ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , và  $\text{O}_2$ ).

Tạo ra các axit béo mạch ngắn: Tiến hành lấy mẫu lần đầu đối với các chất có trong ruột. Sau đó, tiến hành làm đông lạnh, hoặc xử lý trực tiếp để xác định nồng độ SCFA (các axit béo mạch ngắn dễ bay hơi) trong dịch nổi nuôi cấy.

Phép đo này được tiến hành bằng GPC. Các sản phẩm chuyển hóa có thể xác định được là axit axetic, axit propionic, axit butyric, axit isobutyric, axit valeric, axit isovaleric, axit caproic, axit isocaproic và axit heptanoic.

Phân tích vi sinh: Tiến hành lấy mẫu lần hai đối với các chất có mặt trong ruột và xử lý ngay (pha loãng theo bậc theo tỷ lệ 1/10 trong môi trường pha loãng giảm dần) để đếm tổng số vi sinh vật kỵ khí; vi sinh vật kỵ-hiếu khí tùy ý và hệ nấm.

Các kết quả về khả năng sống sót của nấm men ScPro1 được minh họa tại Fig.1. Trong hình này, mỗi mũi tên thẳng thể hiện việc dùng nấm men ScPro1.

Cần chú ý rằng nấm men ScPro1 bộc lộ khả năng sống sót tốt vào ngày thứ 3 sau khi dùng và chết nhiều vào ngày thứ 4 đến ngày thứ 7 trong thời gian dùng. Điều này cho thấy nấm men này không cấy ghép được vào trong môi trường ruột.

Các kết quả phân tích vi sinh được minh họa tại Fig. 2. Chúng cho thấy số lượng vi khuẩn đường ruột giảm khi có mặt nấm men ScPro1 và tăng sau khi ngừng dùng nấm men này. Khi dùng nấm men ScPro1, lưu ý rằng hệ vi sinh vật kháng kháng sinh (chloramphenicol, genamycin) bị giảm đi đáng kể.

Các kết quả liên quan về ảnh hưởng của nấm men ScPro1 đến lượng axit béo mạch ngắn dễ bay hơi được tạo thành (SCFA) được tóm tắt trong bảng dưới đây (được biểu hiện bằng mM trong môi trường ruột).

|            | Trước khi xử lý | Trong khi xử lý | Sau khi xử lý |
|------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Axetat     | 71,4 ± 2,3      | 57,6 ± 4,2      | 60,6 ± 0,7    |
| Propionat  | 22,8 ± 0,6      | 26,5 ± 4,2      | 35,7 ± 1,1    |
| Butyrat    | 35,0 ± 1,6      | 36,5 ± 2,2      | 26,6 ± 4,2    |
| Isobutyrat | 3,2 ± 0,3       | 3,3 ± 0,2       | 3,4 ± 0,1     |
| Isovalerat | 5,6 ± 0,5       | 5,2 ± 0,2       | 5,3 ± 0,0     |
| Valerat    | 8,0 ± 0,6       | 7,8 ± 1,4       | 9,1 ± 0,9     |
| Isocaproat | 0,1 ± 0,1       | 0,0 ± 0,0       | 0,0 ± 0,0     |
| Caproat    | 9,0 ± 1,1       | 7,3 ± 0,3       | 5,7 ± 0,7     |
| Heptanoat  | 0,2 ± 0,2       | 0,0 ± 0,1       | 0,0 ± 0,0     |

|      |             |             |             |
|------|-------------|-------------|-------------|
| Tổng | 155,3 ± 2,7 | 144,1 ± 6,8 | 146,4 ± 3,4 |
|------|-------------|-------------|-------------|

Khi xử lý, chú ý rằng lượng axetat bị giảm một phần và lượng propionat tăng lên, điều này cho thấy hoạt tính của hệ vi sinh vật sinh axetic bị giảm.

Trong số các thông số cần theo dõi khác, ảnh hưởng chưa được công nhận của việc xử lý đến:

- ✓ Việc tạo khí (lượng và tỷ lệ);
- ✓ Nồng độ của tổng đường và các đường đơn (ổn định theo thời gian); và
- ✓ Hoạt tính enzym

cũng được theo dõi.

Ví dụ 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của nấm men ScPro1, SCB1 đến việc gây cảm ứng tạo ra các xytokin

Ảnh hưởng của nấm men ScPro1 và SCB1 sống đến việc gây cảm ứng tạo ra các xytokin trên các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi ở người (human peripheral blood mononuclear cell - PBMC) được nghiên cứu.

Nấm men ScPro1 và SCB1 được thử nghiệm khả năng gây cảm ứng tạo ra các xytokin IL-10, ILK-12, TNF $\alpha$ , và TNF $\delta$  ở PBMC người ở dạng khô dùng ngay và dạng khô có hoạt tính.

Chuẩn bị các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi người

Lấy máu tươi ở những đối tượng khỏe mạnh tại trung tâm truyền máu, pha loãng hai lần bằng PBS-Ca (GIBCO) và tinh sạch trên gradient Ficoll (GIBCO). Sau khi ly tâm ở 400 x g trong 30 phút ở 20°C, các tế bào PBMC tạo thành một lớp dạng vòng tròn trong huyết thanh. Các PBMC này được hút ra từ từ, tạo huyền phù trong thể tích cuối cùng là 50ml bằng cách sử dụng PBS-Ca và rửa 3 lần bằng cùng dung dịch đệm kèm theo các lần ly tâm 10 phút ở 20°C ở 350 x g. Sau đó, tái tạo huyền phù từ các PBMC này bằng cách sử dụng môi trường RPMI hoàn chỉnh (GIBCO), được làm giàu bằng 10% trọng lượng/thể tích huyết thanh bào thai bê (đã vô hoạt ở 56°C trong 30 phút), 1% trọng lượng/thể tích L-glutamin (GIBCO) và gentamycin (150 $\mu$ g/ml) (GIBCO). Đếm các PBMC bằng kính hiển vi, điều

chỉnh đến nồng độ  $2 \times 10^6$  tế bào/ml và phân bố (trong 1ml dung dịch phân ước) trên các đĩa nuôi cấy tế bào 24 lỗ (Corning, Inc.).

#### Các chế phẩm vi sinh

Rửa các môi trường đã nuôi cấy qua đêm chứa *Lactobacillus*, *Lactococcus* và *Escherichia coli* (các chủng đối chứng) hai lần bằng đệm PBS ở độ pH=7,2, trước khi tái tạo huyền phù trong PBS ở nồng độ  $2.10^9$ CFU/ml.

Nồng độ nấm men được dùng trong các thử nghiệm đầu tiên là  $2.10^8$ CFU/ml. Đối với nghiên cứu so sánh liều đầu tiên, tiến hành pha loãng theo bậc 10 để so sánh ảnh hưởng nấm men ở nồng độ  $2.10^7$ CFU/ml,  $2.10^8$ CFU/ml và  $2.10^9$ CFU/ml.

#### Ủ các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi người

Chuyển 10 $\mu$ L huyền phù thử nghiệm vào các lỗ trong đĩa chứa PBMC, được ủ ở 37°C trong hỗn hợp khí gồm 5% CO<sub>2</sub> và 95% không khí. Sau 24 giờ ủ, hút dịch nổi ra khỏi đĩa, ly tâm ở 2.000 vòng/phút (mô hình Eppendorf), lấy ra và giữ ở -20°C.

Đối chứng gồm vi khuẩn Gram-dương (*Lactobacillus* và *Lactococcus*), vi khuẩn Gram-âm (*Escherichia coli*) và đệm không chứa vi khuẩn bất kỳ.

#### Định lượng các xytokin

Xác định mức độ biểu hiện của các xytokin bằng thử nghiệm ELISA. Các đĩa ELISA được phủ bằng kháng thể (trong một đêm) và kháng thể này được trung hòa bằng PBS/1% BSA (albumin huyết thanh bê). Tiến hành căn chỉnh bằng xytokin ở nồng độ đã biết, với ngưỡng phát hiện từ 15,62 đến 2000pg/ml (ủ qua đêm). Việc phát hiện và định lượng các chất kháng xytokin được tiến hành bằng cách xác định hoạt tính của streptavidin trên cơ chất TMB (tetrametylbenzidin, Pharmingen2). Bộ kit Pharmingen thương phẩm được dùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bốn xytokin được chọn đó là 3 xytokin gây viêm (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , và IL-12) và 1 xytokin chống viêm (IL-10).

#### Các kết quả

Đáp ứng của bốn xytokin đối với 5 nguồn cho khác nhau được đánh giá ở tỷ lệ nấm men/PBMC là 1/1.

Các kết quả nồng độ của 4 xytokin được tiết ra trong dịch nuôi cấy được tóm tắt trong bảng A dưới đây. Số liệu được tính là giá trị trung bình (Avg) của các nồng độ của 5 nguồn cho này. Bảng này cũng thể hiện giá trị sai số chuẩn của giá trị trung bình (Sem).

Bảng A

|                           | IL-10 (pg/ml) |     | INF $\gamma$ (pg/ml) |       | TNF $\alpha$ (pg/ml) |      | IL-12 (pg/ml) |     |
|---------------------------|---------------|-----|----------------------|-------|----------------------|------|---------------|-----|
|                           | Trung bình    | Sem | Trung bình           | Sem   | Trung bình           | Sem  | Trung bình    | Sem |
| Đối chứng âm              | 0             | 0   | 50                   | 0     | 50                   | 0    | 0             | 0   |
| E. coli                   | 2474          | 839 | 57376                | 29591 | 11185                | 3875 | 15            | 15  |
| Lactococcus lactis        | 111           | 43  | 136103               | 62706 | 25362                | 9818 | 1101          | 543 |
| Bifidobacterium longum    | 1072          | 355 | 33780                | 27164 | 14517                | 5601 | 22            | 20  |
| Lactobacillus acidophilus | 435           | 259 | 85543                | 46838 | 18369                | 6857 | 539           | 343 |
| SCB1                      | 569           | 291 | 27807                | 19231 | 6492                 | 2698 | 14            | 10  |
| ScPro1                    | 442           | 292 | 15218                | 9304  | 3643                 | 1847 | 8             | 5   |

1) Đối với nấm men ScPro1 và SCB1, quan sát thấy PBMC tạo ra IL12 với lượng rất nhỏ hoặc thậm chí là không phát hiện thấy, không giống với vi khuẩn đối chiếu.

2) Quan sát thấy mức IL-10 cao ở cả hai loại nấm men sống, điều này gợi ý rằng SCB1 cho kết quả tốt hơn so với ScPro1.

3) Đối với INF $\gamma$  và TNF $\alpha$ , lượng được tiết ra dưới tác động của nấm men ScPro1 và SCB1 nhỏ hơn nhiều so với các lợi khuẩn khác nhau được thử nghiệm.

Kết luận:

- Có thể thấy rõ rằng nấm men ScPro1 và SCB1 khi có mặt PBMC không tạo ra xytokin gây viêm IL-12, không giống kết quả thường quan sát thấy với lợi khuẩn lactobacilli.

- Nấm men ScPro1 và SCB1 khi có mặt PBMC tạo ra IL-10 với mức cao (chống viêm).

- Lượng IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$  được PBMC tiết ra khi có mặt nấm men ScPro1 và SCB1 nhỏ hơn nhiều so với các lợi khuẩn khác.

Ví dụ 4: Đánh giá tác dụng bảo vệ chống viêm ruột của nấm men ScPro1 và SCB1 ở mô hình do hóa chất tạo ra ở chuột (TNBS)

Mô hình động vật thử nghiệm nêu trên hiện đang được sử dụng và được điều chỉnh để xác định tác dụng chống viêm của nấm men.

Chuột nhắt Balb/c 6 tuần tuổi được dùng trong thử nghiệm này. Chúng được cho làm quen với điều kiện thí nghiệm một tuần trước khi thử nghiệm, đồng thời chúng được cung cấp nước và thực phẩm vừa đủ. Mỗi mẫu được thử trên một nhóm gồm 10 con. Bệnh viêm ruột kết được tạo ra bằng một vòng tròn dùng để phân phối nước uống vừa đủ chứa TNBS 5% (trọng lượng/thể tích-1) trong 7 ngày. Nấm men được dùng bằng cách cho ăn cưỡng bức ngày một lần, 3 ngày trước khi bắt đầu tạo ra viêm ruột kết bằng TNBS và trong thời gian xử lý bằng TNBS (7 ngày).

Ngoài hai nhóm được thử nghiệm, nhóm đối chứng (đối chứng âm) chỉ được nhận dung dịch nước muối sinh lý.

Các thông số thử nghiệm sau khi xử lý là như sau:

- Đánh giá vĩ mô mức độ viêm ruột (theo thang điểm Wallace): rách ruột kết của từng con, soi dưới kính hiển vi (hệ số phóng đại, x5) để đánh giá các tổn thương vĩ mô theo hệ thống điểm Wallace nằm trong khoảng từ 0 đến 10 phụ thuộc vào tiêu chuẩn dùng để đánh giá mức độ trầm trọng của tình trạng viêm như chứng xung huyết, độ dày của thành ruột kết và mức độ loét.

- Đánh giá mô học của tình trạng viêm (theo thang điểm Ameho): lấy mẫu tại khu vực ruột ở vị trí chính xác 2cm kể từ ống hậu môn và dùng mẫu này để đánh giá mô học theo thang điểm Ameho nằm trong khoảng từ 0 đến 6 dựa trên độ thâm lọc khi viêm, khi bị ăn mòn, loét hoặc hoại tử và độ sâu của tình trạng viêm cũng như diện tích viêm trên bề mặt của thương tổn. Việc định lượng mức hoại tử và các thương tổn được tiến hành độc lập với nhau.

- Định lượng mức độ biểu hiện của gen mã hóa IL-10 và PPAR $\alpha$ : để làm được điều này, ARN tổng số được tách ra khỏi các mô ruột kết bằng dụng cụ trong bộ



kit RNeasy (Macherey Nagel, Hoerd, France) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc định lượng ARN thông tin được tiến hành bằng cách sử dụng phổ kế. Sau khi xử lý ở 37°C trong 30 phút bằng 20-50 đơn vị ADnaza không chứa ARnaza I (RNase-free DNase I) (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Ind., USA), đoạn môi oligo-DT (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Ind., USA) được dùng để tổng hợp các ADN mạch đơn dạng vòng. ARN thông tin được định lượng bằng cách sử dụng hỗn hợp chủ màu xanh lục SYBR (Applera, Courtaboeuf, France) và oligonucleotit người đặc hiệu trong nghiên cứu *in vitro* (xem bảng B dưới đây), sử dụng thiết bị GeneAmp Abiprism 700 (Applera, Courtaboeuf, France). Mỗi thử nghiệm cũng bao gồm đối chứng được căn chỉnh hoặc không được căn chỉnh. Mỗi mẫu được xác định ba lần. Cường độ màu của hỗn hợp chủ màu xanh lục SYBR được xác định bằng gói phần mềm Abiprism 7000 SDS (Applera, Courtaboeuf, France). Tất cả các kết quả đều được chuẩn hóa theo gen mã hóa cho  $\beta$ -actin.

Bảng B

| Các gen        | Các trình tự môi nucleotit     |
|----------------|--------------------------------|
| $\beta$ -actin | F: 5'-AAgTCCCTCACCTCCCAAAAg-3' |
|                | R: 5'-AAgCAATgCTgTCACCTTCCC-3' |
| PPAR $\alpha$  | F: 5'-ACgATgCTgTCCTCCTTgATg-3' |
|                | R: 5'-gTgTgATAAAgCCATTGCCgT-3' |
| IL-10          | F: 5'-CAgTCAgCCAgACCCACAT-3'   |
|                | R: 5'-gCTCCACTgCCTTgCTTT-3'    |

Nấm men ScPro1 và SCB1 được thử nghiệm trong mô hình phòng ngừa chuẩn nêu trên. Việc theo dõi trọng lượng của chuột thử nghiệm trước khi tạo ra viêm ruột cho thấy các chế phẩm nấm men được dùng cho chúng được dung nhận rất tốt.

Mức độ viêm ruột, được ước tính theo thang điểm Wallace, giảm xuống 60% khi sử dụng nấm men ScProl (nấm men khô có hoạt tính, 1mg/ngày) và nấm men SCB1 so với đối chứng dương. Nấm men SCB1 cũng có tác dụng

giảm viêm. Tương tự, mức độ hoại tử ruột được ước tính theo thang điểm Ameho cũng giảm 1/3 khi sử dụng nấm men ScPro1 (nấm men khô dùng ngay, 1mg hoặc 100µg/ngày) so với đối chứng dương.

Nấm men ScPro1 và SCB1, được dùng một mình hoặc cùng nhau, làm tăng mức độ biểu hiện của gen mã hóa interleukin kháng viêm, IL-10 và thụ thể nhân PPAR $\alpha$ .

Fig.7-10 thể hiện giá trị theo thang điểm Wallace vĩ mô và theo thang điểm Ameho tuyệt vời của nấm men ScPro1 và SCB1 ở các liều dùng hằng ngày khác nhau.

Điểm Wallace vĩ mô và điểm Ameho mô học của nấm men ScPro1 và SCB1 ở dạng khô dùng ngay, với liều hằng ngày là 10µg và 1mg, được minh họa tại Fig.7 và 8.

Ký hiệu bên dưới các cột trong đồ thị nêu tại Fig.7 và 8 chỉ các yếu tố sau:

- 1 chỉ TNBS một mình,
- 2 chỉ TNBS + ScPro1 (1mg),
- 3 chỉ TNBS + ScPro1 (100µg),
- 4 chỉ TNBS + SCB1 (1mg),
- 5 chỉ TNBS + SCB1 (100µg).

Lưu ý rằng nấm men khô ScPro1 dùng ngay, với liều 100µg/ngày, làm giảm đáng kể thương tổn ở cấp độ vĩ mô và cấp độ mô học.

Điểm Wallace vĩ mô và điểm Ameho mô học của nấm men ScPro1 và SCB1, riêng lẻ hoặc kết hợp, ở dạng khô dùng ngay hoặc ở dạng khô có hoạt tính, với liều hằng ngày là 100µg và 1mg, được minh họa tại Fig.9 và 10.

Fig.14 và 15 lần lượt thể hiện mức độ biểu hiện của gen mã hóa interleukin kháng viêm, và PPAR $\alpha$  thụ thể nhân ở các tế bào ruột.

Ký hiệu bên dưới các cột trong đồ thị tại Fig. 9, 10, 14 và 15 chỉ các yếu tố sau đây:

- 1 chỉ TNBS một mình,
- 2 chỉ TNBS + ScPro1 dạng khô dùng ngay (100µg),
- 3 chỉ TNBS + ScPro1 dạng khô có hoạt tính (10µg),

4 chỉ TNBS + SCB1 dạng khô có hoạt tính (100 $\mu$ g),

5 chỉ TNBS + ScPro1 dạng khô có hoạt tính (1 $\mu$ g),

6 chỉ TNBS + ScPro1 dạng khô có hoạt tính (100 $\mu$ g),

7 chỉ TNBS + ScPro1 dạng khô có hoạt tính (100 $\mu$ g) + SCB1 (100 $\mu$ g).

Kết luận:

Có thể chú ý rằng ScPro1 ở dạng khô có hoạt tính làm giảm đáng kể thương tổn ở cấp độ vĩ mô, và hỗn hợp gồm ScPro1 và SCB1 có tác dụng kháng viêm hiệp đồng trên cả cấp độ vĩ mô lẫn mô học.

ScPro1 và SCB1 làm tăng mức độ biểu hiện của gen mã hóa interleukin kháng viêm IL-10 ở liều 100 $\mu$ g lần lượt là 2,9 và 3,1. Hỗn hợp bao gồm ScPro1 + SCB1 (biểu đồ 7) làm tăng mức độ biểu hiện lên 2,7 (Fig.14).

ScPro1 và SCB1 làm tăng mức độ biểu hiện của gen mã hóa thụ thể nhân PPAR $\alpha$  ở liều 100 $\mu$ g lần lượt là 1,5 và 1,6 lần. Hỗn hợp bao gồm ScPro1 + SCB1 (biểu đồ số 7) làm tăng mức độ biểu hiện lên 1,7 lần (Fig.15).

Ví dụ 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của nấm men ScPro1 và SCB1 đến việc gây cảm ứng tạo hệ khuẩn lạc của *Candida albicans* ở ruột trong mô hình chuột nhắt bị viêm do hóa chất

Nghiên cứu này nhằm xác định ảnh hưởng của việc dùng nấm men ScPro1 và SCB1 thuộc nhóm lợi khuẩn đến việc tạo thành hệ khuẩn lạc của nấm men *Candida albicans* gây bệnh ở ruột và ảnh hưởng viêm tiềm ẩn trong mô hình viêm ruột ở chuột nhắt do hóa chất gây ra.

Các nấm men được thử nghiệm ở dạng khô dùng ngay.

Các điều kiện thử nghiệm:

Chuột cái chủng Balb/C ở 4-6 tuần tuổi. Từ ngày 0 đến ngày 14, những con chuột này được nhận DSS (Dextran Natri Sulphat) với nồng độ 1,5% trong nước uống, để tạo ra viêm ruột do hóa chất.

Tiến hành ba thử nghiệm.

Trong thử nghiệm đầu tiên, vào ngày thứ 5, chuột được cho ăn cưỡng bức  $5.10^7$  tế bào nấm men ScPro1 trong 200 $\mu$ L PVS (đệm phosphat) bằng ống thông. Thao tác này được lặp lại mỗi ngày kéo dài trong 19 ngày. Vào ngày 0, chuột được cho ăn

cường bức  $5 \times 10^7$  tế bào nấm men *C. albicans* chủng SC5314 trong 200 $\mu$ L PBS bằng ống thông.

Trong thử nghiệm thứ hai, vào ngày thứ 0, chuột được cho ăn cường bức  $5.10^7$  tế bào nấm men *C. albicans* chủng SC5314 trong 200 $\mu$ L PBS bằng ống thông. 4 ngày sau đó, nhóm chuột này được cho ăn cường bức  $5.10^7$  tế bào nấm men ScPro1 trong 200 $\mu$ L PBS. Thao tác này lặp lại hằng ngày trong 14 ngày.

Trong thử nghiệm thứ ba, vào ngày thứ 0, chuột được cho ăn cường bức  $5.10^{17}$  tế bào nấm men *C. albicans* chủng SC5314 trong 200 $\mu$ L PBS bằng ống thông. Một giờ sau, nhóm chuột này được cho ăn cường bức  $5.10^7$  tế bào nấm men ScPro1 trong 200 $\mu$ L PBS. Thao tác cuối cùng này được lặp lại hằng ngày trong 15 ngày.

Toàn bộ số chuột nêu trên (từ các thử nghiệm 1, 2 và 3) được theo dõi hằng ngày các thông số sau:

- Tính ổn định của phân, hiện tượng chảy máu hậu môn, thể trọng của chúng (điểm lâm sàng),
- Nuôi cấy lại bằng 1g phân đồng hóa trong 1ml PBS, 10 $\mu$ L môi trường nuôi cấy nêu trên được gieo mầm trên môi trường chọn lọc Candi; sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C, CFU của *C. albicans* (được nhuộm màu xanh dương) và *S. cerevisiae* (được nhuộm màu xanh lục) được đếm,
- Toàn bộ số chuột thử nghiệm bị giết vào thời điểm cuối của mỗi thử nghiệm. Lấy mẫu máu ngay bằng cách chích vào tim, gạn mẫu ở nhiệt độ phòng, thu gom huyết thanh bằng cách ly tâm và bảo quản ở -80°C; lấy mẫu ruột và chia làm 4 phần, 3 trong số 4 phần được làm lạnh đông và một phần còn lại được đặt vào máy khuấy trộn (4% PFA) để nghiên cứu mô học.

Các kết quả:

Như có thể thấy tại Fig.3, trong thử nghiệm đầu tiên (thử nghiệm tác dụng phòng ngừa), đã quan sát thấy trong mô hình viêm ruột do hóa chất gây ra, việc dùng DSS làm tăng đáng kể việc tạo thành hệ khuẩn lạc của *C. albicans* được tạo thành trên niêm mạc ruột bắt đầu vào ngày thứ 4 (DSS+Ca). Đáng ngạc nhiên là, có thể thấy rằng việc dùng nấm men thuộc nhóm lợi khuẩn ScPro1

trong 19 ngày làm giảm đáng kể việc tạo thành hệ khuẩn lạc của *C. albicans* được tạo thành do DSS gây ra.

Như nêu tại Fig.4, trong thử nghiệm thứ hai (thử nghiệm về tác dụng điều trị), đã quan sát thấy việc dùng nấm men thuộc nhóm lợi khuẩn ScPro1 hoặc SCB1 làm giảm đáng kể việc tạo thành hệ khuẩn lạc do DSS gây ra. Ngoài ra, tác dụng của nấm men ScPro1 là có thể thấy được, ngay cả khi ngừng xử lý bằng DSS ở ngày thứ 14.

Kết luận:

Việc dùng nấm men ScPro1 hoặc nấm men SCP1 làm giảm đáng kể việc tạo thành hệ khuẩn lạc của *C. albicans*, và điều này cũng diễn ra trong cả điều kiện điều trị phòng ngừa lẫn các điều kiện điều trị. Cần hiểu rằng tác dụng bảo vệ kéo dài cho đến khi ngừng xử lý.

Ví dụ 6: Nghiên cứu tác dụng ức chế khả năng bám dính và khả năng xâm lấn của chủng gây bệnh *E. coli* phân lập được từ sinh thiết ruột hồi của bệnh nhân mắc bệnh Crohn của nấm men ScPro1 hoặc SCB1 hoặc dẫn xuất của chúng

Ảnh hưởng của nấm men sống ScPro1, SCB1 và dẫn xuất của chúng được nghiên cứu trên khía cạnh ức chế khả năng bám dính và khả năng xâm lấn của chủng gây bệnh *E. coli* phân lập được từ sinh thiết ruột hồi của bệnh nhân mắc bệnh Crohn.

Chủng *E. coli* được ký hiệu là AIEC cho *E. coli* bám dính-xâm lấn phân lập được từ sinh thiết ruột hồi của bệnh nhân mắc bệnh Crohn (CD) có khả năng bám dính và xâm lấn tế bào biểu mô ruột.

Chủng LF82 *E. coli*, phân lập được từ thương tổn ruột hồi mạn tính ở bệnh nhân mắc bệnh Crohn, có tất cả đặc tính của vi khuẩn gây bệnh xâm lấn. Đặc tính của kiểu hình bám dính-xâm lấn của chủng LF82 và sự vắng mặt của các chất xác định di truyền xâm lấn đã được phát hiện thấy ở *E. coli*, *Shigella* và *Salmonella*, điều này dẫn tới việc xác định được sự tồn tại của nhóm *E. coli* gây bệnh mới mà có thể gây ra bệnh Crohn, được ký hiệu là AIEC. Sau khi được tiêu hóa bởi các đại thực bào ở chuột nhắt hoặc người, chủng AIEC LF82 sống sót và nhân lên trong không bào mở, trong khi đó vẫn giữ lại được sự toàn vẹn của tế bào chủ. Sau khi nhiễm, các đại thực bào này tiết ra TNF $\alpha$  với tỷ lệ đáng

kể. Sự phổ biến của chủng AIEC là 36,4% ở các thương tổn ruột hồi ở bệnh nhân mắc CD.

Quy trình bám dính của vi khuẩn vào tế bào nhân chuẩn dẫn đến sự tương tác đặc hiệu giữa phôi tử có mặt trên bề mặt của vi khuẩn, gọi là adhesin, và thụ thể của protein, glycoprotein hoặc glycolipit được biểu hiện tự nhiên trên bề mặt của tế bào biểu mô của vật chủ. Đối với vi khuẩn, đã biết rằng adhesin FimH của pili loại I liên quan đến sự bám dính của vi khuẩn AIEC vào tế bào biểu mô ruột. Adhesin FimH của vi khuẩn nhận biết thụ thể tế bào ruột CEACAM6 (cũng được ký hiệu là CD66c hoặc NCA), một glycoprotein mang nhiều gốc manosa và được biểu hiện bất thường ở cấp độ ruột hồi ở 90% bệnh nhân mắc CD.

Điều kiện thử nghiệm:

Chủng AIEC LF82 đặc trưng bởi khả năng bám dính và khả năng xâm lấn vào tế bào biểu mô ruột đã nuôi cấy được dùng làm chủng mẫu đầu tiên.

Nghiên cứu này được mở rộng cho 10 chủng AIEC phân lập được từ bệnh nhân mắc CD để khẳng định kết quả thu được với chủng AIEC LF82.

Chủng DAEC (Diffuse Adherent *Escherichia coli*) C1845 *E. coli*, mà bám dính vào tế bào biểu mô thông qua cơ chế không phụ thuộc manosa (Afa/Dr adhesin) được dùng làm đối chứng âm.

Thử nghiệm bám dính

Với nấm men ScPro1 và SCB1 sống, thử nghiệm bám dính định lượng được tiến hành khi có mặt vi khuẩn AIEC, hoặc khi có mặt chất chiết tinh khiết của pili loại I được tạo ra từ chủng AIEC LF82 theo quy trình được mô tả trong tài liệu của Boudeau và các đồng tác giả (2001 *Mol. Microbiol.* 39: 1272-84). Chỉ số bám dính được xác định bằng nấm men ở các nồng độ khác nhau và vi khuẩn hoặc pili loại I đã tinh sạch với nồng độ khác nhau.

Trong trường hợp các phần của nấm men thuộc loại mannoprotein không có hiện tượng bám dính được quan sát thấy thì việc xác định khả năng liên kết của pili loại I được tiến hành bằng kỹ thuật ELISA.

Các thử nghiệm này thường được tiến hành trên các vi đĩa. Các phần của nấm men được cố định trên vi đĩa. Các dịch pha loãng theo tỷ lệ khác nhau của pili loại I đã tinh sạch được cho tiếp xúc với các phần của nấm men. Sau khi rửa nhiều lần, pili loại I được phát hiện bằng kháng thể kháng pili loại I thu được ở thỏ (Boudeau và các đồng tác giả, 2001). Sau khi rửa nhiều lần, kháng thể thứ hai được cho kết hợp với peroxidaza. Việc định lượng được tiến hành bằng cơ chất của peroxidaza ( $H_2O_2$ ) và chất tạo màu (tetrametylbenzidin) và bằng cách đo vi đĩa ở mật độ quang là 450nm.

Các thử nghiệm ức chế sự tương tác của vi khuẩn AIEC với thụ thể CEACAM6 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào biểu mô ruột bằng nấm men ScPro1 hoặc SCB1

Các tế bào được dùng:

Đối với các thử nghiệm ức chế *in vitro* (ủ trước và cùng ủ), tiến hành nhuộm màu tế bào biểu mô ruột T84 chưa biệt hóa, biểu hiện thụ thể CEACAM6 ở mức cao. Nuôi cấy các tế bào T84 này trong 5%  $CO_2$  ở 37°C trong môi trường cơ bản DMEM (môi trường Dulbecco's Eagle cải biến) được bổ sung 50% Ham-F12 (Life Technology) và 10% huyết thanh bào thai bê được làm biến tính bằng nhiệt. Bổ sung 1% axit amin không thiết yếu (Life Technology), 1% glutamin (Life Technology), 200U/L penixilin, 50mg/L streptomycin, 0,25mg/L amphotericin B và 1% hỗn hợp vitamin X-100 dùng cho môi trường MEM (môi trường thiết yếu tối thiểu - Minimum Essential Medium) (Life Technology) vào môi trường nêu trên. Gieo mầm bằng các tế bào này với mật độ  $4.10^5$  tế bào/lỗ/ml và ủ trong 48 giờ ở 37°C, trong 5%  $CO_2$ . Sau đó, rửa tám chứa các tế bào T84 bằng PBS, và sau đó, bổ sung 1ml môi trường gây nhiễm (DMEM/F12 + 10% FCS) vào mỗi lỗ. Từ môi trường nuôi cấy qua đêm của chủng AIEC LF82 ở 37°C trong dịch chiết thịt Luria-Bertani (LB), pha chế huyền phù chứa vi khuẩn có  $OD_{620}$  bằng 0,1 trong PBS. Gây nhiễm tế bào T84 đến mức bội nhiễm (MOI) 10 vi khuẩn/tế bào bằng cách bổ sung 25 $\mu$ L huyền phù chứa vi khuẩn ở  $OD_{620}$  là 0,1 vào môi trường gây nhiễm. Ủ đĩa 24 lỗ trong 3 giờ ở 37°C trong không khí giàu  $CO_2$ . Mức độ bám dính và xâm lấn dư của vi khuẩn thu được như được mô tả dưới đây.

Sử dụng thử nghiệm trên tế bào CHO-K1 không biểu hiện CEACAM6 và trên cùng tế bào được cải biến di truyền biểu hiện ổn định CEACAM6 (CHO-K1/CEACAM6). Ủ tế bào CHO-K1 trong môi trường DMEM/F12, 5% huyết thanh tế bào bào thai bê, 1% L-glutamin, 200U/L penixilin, 50mg/L streptomycin và 0,25mg/L amphotericin B. Nuôi cấy các tế bào CHO-K1/CEACAM6 trong môi trường DMEM/F12, 5% huyết thanh bào thai bê, 1% L-glutamin và 600µg/ml hygromycin. Gieo mầm chủng trong đĩa 24 lỗ với mật độ  $2.10^5$  tế bào/lỗ. Sau 7-8 giờ ủ ở 37°C, thay thế môi trường bằng môi trường nuôi cấy mới, được bổ sung natri butyrat 5mM, để biểu hiện CEACAM6. Tiến hành tách Western để theo dõi mức độ biểu hiện của protein CEACAM6 bằng các tế bào đã chuyển nhiễm.

Sau 20-24 giờ ủ ở 37°C, ủ các tế bào với nấm men khô dùng ngay thuộc chủng ScPro1 với nồng độ tăng dần trong 1 giờ (thử nghiệm ủ trước), và sau đó, gây nhiễm bằng MOI = 20 ( $4.10^6$  vi khuẩn/lỗ), để quan sát tỷ lệ vi khuẩn/các nấm men được dùng trước đó khi thử nghiệm trên tế bào T84. Sau 3 giờ ủ ở 37°C, đếm số vi khuẩn bám dính khi không có mặt hoặc khi có mặt nấm men như được mô tả dưới đây.

Một thử nghiệm khác được tiến hành trên phần chứa vi khuẩn sống từ người bệnh. Các tế bào ruột, từ sinh thiết ruột hồi của 3 bệnh nhân mắc bệnh Crohn, được rửa bằng PBS và sau đó, ủ trước trong ống Oppendorf dung tích 2ml, trong 1ml môi trường DMEM, 20% huyết thanh bào thai bê, khi có mặt 0; 1,25; 2,5 hoặc 5mg/ml nấm men khô dùng ngay chủng ScPro1. Khuấy ống này bằng cách quay trong 15 phút ở 37°C, và sau đó, gây nhiễm tế bào ruột với sự có mặt của nấm men cùng với 50µL môi trường LB để qua đêm chứa chủng AIEC LF82. Tiến hành ủ trong 3 giờ kèm theo khuấy. Rửa hai lần các tế bào ruột bằng PBS, và sau đó, giữ trên phiến kính và lá kính và quan sát trên kính hiển vi tương phản pha. Việc đếm số lượng vi khuẩn bám dính vào phần bờ dạng bàn chải của các tế bào ruột được tiến hành khi có mặt nấm men hoặc không. Thử nghiệm này cũng được tiến hành với thể đột biến LF82-delta fimH không được tạo lông, để xác định mức độ bám dính cơ sở của vi khuẩn AIEC không được nhận biết bằng pili loại I ở thụ thể CEACAM6. Tương tự,



thử nghiệm ức chế sự bám dính cũng được tiến hành khi có mặt kháng thể kháng-CEACAM6.

Quy trình dưới đây dùng để xác định mức độ bám dính và xâm lấn dư của vi khuẩn vào tế bào biểu mô ruột T84

Rửa 4 lần phiến kính chứa tế bào bằng 1ml PBS và sau đó, làm tan các tế bào này bằng cách ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng với 500 $\mu$ L Triton X-100 1% trong nước cất. Pha loãng dịch tan và sau đó, đổ lên LB-Agar gelloza để xác định số CFU, tương ứng với số vi khuẩn bám dính.

Để đếm số vi khuẩn xâm lấn, rửa phiến kính chứa vi khuẩn bằng PBS sau 3 giờ gây nhiễm, và sau đó, ủ trong 1 giờ với 1ml môi trường gây nhiễm chứa 100 $\mu$ g/ml gentamycin, để phá hủy vi khuẩn ngoại bào. Vi khuẩn xâm lấn được đếm sau khi làm tan tế bào, pha loãng theo bậc và đổ lên LB-Agar gelloza.

Mức độ bám dính và xâm lấn của chủng AIEC LF82 được phân tích tương đối với tế bào được gây nhiễm bằng chủng AIEC LF82 không qua xử lý bất kỳ bằng nấm men hoặc dẫn xuất của nấm men.

Tất cả các kết quả được biểu hiện theo tỷ số R:

$R = \frac{\text{Số vi khuẩn bám dính hoặc vi khuẩn xâm lấn khi có mặt nấm men ScPro1}}{\text{Số vi khuẩn bám dính hoặc vi khuẩn xâm lấn khi không xử lý}}$

Quy trình 1: Mô hình cùng ủ

Chuẩn bị các tế bào T84 và huyền phù chứa vi khuẩn như được mô tả ở trên, trong thử nghiệm bám dính và xâm lấn. Tạo huyền phù từ nấm men hoặc dẫn xuất của chúng trong PBS với nồng độ đã xác định, và sau đó, bổ sung 25 $\mu$ L huyền phù này vào môi trường gây nhiễm chứa tế bào T84 (1ml). Tiếp theo, gây nhiễm ngay các tế bào này ở MOI = 10 bằng chủng vi khuẩn nêu trên. Ủ huyền phù chứa vi khuẩn/nấm men có mặt tế bào đã đồng hóa, và ủ đĩa 24 lỗ trong 3 giờ ở 37°C. Mức độ bám dính và xâm lấn của chủng vi khuẩn này được xác định như được mô tả ở trên, và khi có mặt nấm men hoặc chất chiết của nấm men khi gây nhiễm hoặc không. Tỷ lệ giữa mức độ bám dính và xâm lấn của vi khuẩn khi không có mặt nấm men (100%) và mức độ bám dính và xâm lấn của

vi khuẩn khi có mặt các nấm men chỉ mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn dư của vi khuẩn.

#### Quy trình 2: Mô hình ủ trước

Chuẩn bị tế bào T84 và huyền phù chứa vi khuẩn như được mô tả ở trên, trong thử nghiệm bám dính và xâm lấn. Bổ sung huyền phù chứa nấm men hoặc dẫn xuất của chúng vào môi trường gây nhiễm (1ml) chứa tế bào T84 trong thể tích 25 $\mu$ L. Đồng hóa huyền phù chứa nấm men và ủ đĩa 24 lỗ chứa tế bào trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, gây nhiễm tế bào T84 bằng chủng vi khuẩn này, ở MOI = 10, khi có mặt nấm men, và việc này diễn ra trong 3 giờ ở 37°C. Việc đếm số vi khuẩn bám dính và xâm lấn được tiến hành như được mô tả ở trên, khi có mặt nấm men hoặc không, để xác định phần trăm bám dính dư hoặc xâm lấn, trong đó 100% chỉ sự bám dính hoặc xâm lấn khi không có mặt nấm men.

#### - Kiểm tra sự biểu hiện của CEACAM6

Việc đánh dấu tế bào miễn dịch bằng hóa chất được tiến hành vào mỗi mẻ nuôi cấy tế bào để kiểm tra sự có mặt của chúng và ước tính lượng CEACAM6 được biểu hiện. Các tế bào được nuôi cấy trên phiến kính thủy tinh vô trùng. Phiến kính chứa vi khuẩn này được rửa bằng PBS, và sau đó, được cố định bằng 3% paraformaldehyt ở độ pH=7,4 trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào được ủ với kháng thể đơn dòng kháng-CECAM6 (dòng 9A7, Genovac), pha loãng theo tỷ lệ 1/100 trong PBS-5% huyết thanh ngựa, trong không khí ẩm trong một giờ. Sau khi rửa bằng PBS, tế bào được cho tiếp xúc với kháng thể thứ hai kết hợp với flocrom (FITC-kháng chuột, Zymed) được pha loãng theo tỷ lệ 1/500 trong PBS-5% huyết thanh ngựa, trong 1 giờ trong không khí ẩm. Các phiến kính được cố định trên phiến kính bằng Moewiol, và sau đó, được soi dưới kính hiển vi huỳnh quang.

#### - Phát hiện khả năng gây độc tế bào

Việc phát hiện khả năng gây độc tế bào do nấm men tạo ra ở các liều khác nhau được thực hiện bằng cách dùng enzym lactat deshydrogenaza (LDH) trong nấm men/tế bào hoặc môi trường ủ FDL/tế bào (Glasser và các đồng tác giả, 2001).

Các kết quả:

Các thử nghiệm bám dính với LF82

Hiệu giá bám dính thu được với LF82 khi có mặt của nấm men ScPro1 hoặc SCB1 đã nuôi cấy (= dạng tươi) hoặc ở dạng khô (dạng khô dùng ngay hoặc dạng đông khô) được tóm tắt trong bảng dưới đây. Các kết quả này là kết quả của 3-5 thử nghiệm độc lập.

| Nấm men | - Dạng             | Hiệu giá bám dính |                     |                   |
|---------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|         |                    | Trung bình        | Hiệu giá trung bình | Hiệu giá lớn nhất |
| ScPro1  | Mới nuôi cấy       | 1/7               | 1/3                 | 1/12              |
| ScPro1  | Dạng khô dùng ngay | 1/58              | 1/20                | 1/96              |
| ScPro1  | Mới nuôi cấy       | 1/43              | 1/24                | 1/64              |
| SCB1    | Mới nuôi cấy       | 1/28              | 1/12                | 1/40              |
| SCB1    | Dạng khô dùng ngay | 1/16              | 1/12                | 1/20              |
| SCB1    | Mới nuôi cấy       | 1/19              | 1/16                | 1/24              |

Tất nhiên, kết quả bám dính tốt với LF82 thu được với nấm men khô, ScPro1 dạng khô dùng ngay và SCB1 dạng khô dùng ngay.

Với các nấm men này, kết quả nêu trên cũng cho thấy ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy và đáng chú ý là phương pháp làm khô đến khả năng bám dính.

Thử nghiệm bám dính với pili đã tinh chế

Hiệu giá bám dính thu được với pili đã tinh sạch khi có mặt của nấm men ScPro1 nuôi cấy (= dạng mới nuôi cấy) hoặc ở dạng khô dùng ngay và của nấm men SCB1 (khô) được tóm tắt trong bảng sau đây:

| Nấm men | Dạng           | Hiệu giá bám dính |              |              |
|---------|----------------|-------------------|--------------|--------------|
|         |                | Thử nghiệm 1      | Thử nghiệm 2 | Thử nghiệm 3 |
| ScPro1  | Nấm men mới ép | 1/300             | 1/300        | 1/400        |
| ScPro1  | Khô dùng ngay  | 1/600             | 1/600        | 1/300        |
| SCB1    | Đông khô       | 1/300             | 1/300        | 1/200        |

Thử nghiệm này khẳng định rằng tương tác pili-nấm men thực sự cần cho việc bám dính. Do pili có đặc tính nhận ra các cấu trúc manozơ nên cấu trúc này là cấu trúc được nhận ra trên nấm men và liên quan đến hiện tượng bám dính quan sát được. Các kết quả tốt nhất thu được với nấm men khô dùng ngay ScPro1.

Kết quả thử nghiệm dùng để xác định khả năng liên kết của pili loại 1 trên phân mannoprotein của nấm men ScPro1

Fig. 18 cho thấy rõ ràng là pili loại 1 được tinh sạch từ chủng AIEC LF82 liên kết đặc hiệu với mannoprotein của nấm men. Lưu ý rằng phương pháp điều chế (phương pháp nhiệt hoặc phương pháp enzym) mannoprotein này (EL05 và EL06) ít ảnh hưởng đến hằng số ái lực của pili.

Kết quả ức chế tương tác của vi khuẩn AIEC với thụ thể CEACAM6 được biểu hiện trên bề mặt tế bào biểu mô

1/ Kết quả sàng lọc mẫu nấm men hoặc dẫn xuất của chúng về khả năng ức chế sự bám dính và xâm lấn của chủng AIEC LF82 vào tế bào biểu mô ruột T84 trong mô hình cùng ủ.

Nghiên cứu được tiến hành đối với nấm men khô dùng ngay ScPro1 ( $3,09.10^7$  nấm men/mg), nấm men khô ScPro1 ( $1,86.10^7$  nấm men/mg) và nấm men dạng khô dùng ngay SCB1 ( $5,83.10^7$  nấm men/mg), cũng như mannoprotein của nấm men EL05 (dạng khô).

Để so sánh, Ultra-levure<sup>®</sup> (Biocodex với  $2,054.10^7$  nấm men/mg) được bổ sung vào.

So sánh khả năng ức chế của các nấm men theo sáng chế với một số nấm men tương tự trong mô hình cùng ủ.

Sau khi rửa trong PBS và ly tâm trong 15 phút ở 7500 vòng/phút, tái tạo huyền phù từ các mẫu nấm men ở nồng độ  $4.10^8$  nấm men/ml trong PBS. Tiến hành pha loãng nấm men trong PBS theo tỷ lệ là  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{20}$ , và  $\frac{1}{100}$ .

Tiến hành ba thử nghiệm độc lập bằng cách sử dụng quy trình 1. Kết quả nêu trên Fig. 19A và 19B (mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn dư) được thể

hiện dưới dạng giá trị trung bình của tỷ lệ giữa mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn và thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn của giá trị trung bình.

Fig. 19A và 19B thể hiện các kết quả sau đây:

Mức độ bám dính:

- Nấm men ScPro1 dạng khô dùng ngay và nấm men ScPro1 dạng khô, ức chế mạnh sự bám dính của chủng LF82 vào tế bào T84 theo cách phụ thuộc vào liều. Mức độ ức chế là đáng kể ở mật độ từ  $5.10^5$  nấm men/ml đối với nấm men khô dùng ngay ScPro1, so với  $5.10^6$  nấm men/ml cho nấm men khô ScPro1.

- Nấm men dạng khô dùng ngay SCB1 ức chế bám dính kém hơn so với 2 mẫu nấm men khác với mức độ bám dính dư là 45,7% ở nồng độ  $1.10^7$  nấm men/ml, so với mức độ bám dính dư là 18,7% và 8% đối với dạng khô dùng ngay của chủng ScPro1 và dạng khô của chủng ScPro1 tương ứng.

Mức độ xâm lấn:

- Nấm men khô dùng ngay ScPro1 ức chế đáng kể sự xâm lấn của tế bào T84 của chủng AIEC LF82 từ nồng độ  $1.10^5$  nấm men/ml. Ở nồng độ  $1.10^7$  nấm men/ml, tỷ lệ xâm lấn dư là 16,3%.

- Đối với nấm men khô ScPro1 và nấm men dạng khô dùng ngay SCB1, tác dụng ức chế diễn ra chậm hơn, từ  $1.10^6$  nấm men/ml và  $5.10^6$  nấm men/ml, tương ứng.

Các thử nghiệm ức chế bằng mannoprotein EL05 trong mô hình cùng ủ

Tạo huyền phù từ mannoprotein của nấm men EL05 trong PBS ở nồng độ là 160mg/ml. Tiến hành pha loãng theo bậc trong PBS theo tỷ lệ là  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ , và  $\frac{1}{40}$  và bổ sung 25 $\mu$ L mỗi dịch pha loãng huyền phù chứa mannoprotein vào môi trường gây nhiễm đồng thời sử dụng quy trình 1.

Tiến hành ba thử nghiệm độc lập. Các kết quả được minh họa tại Fig. 20A và 20B (mức độ bám dính dư và xâm lấn dư) được biểu hiện dưới dạng giá trị trung bình của tỷ lệ giữa mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn và thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn của giá trị trung bình.

Các hình này cho thấy các mannoprotein của nấm men EL05 có khả năng ức chế sự bám dính và xâm lấn của chủng AIEC LF82 vào tế bào T84 theo cách phụ thuộc liều trong mô hình cùng ủ.

2/ Sàng lọc các mẫu nấm men hoặc dẫn xuất của chúng về khả năng ức chế sự bám dính và xâm lấn của chủng AIEC LF82 vào tế bào T84 biểu mô ruột trong mô hình ủ trước.

Các mẫu nấm men giống nhau và các phần của chúng được dùng cho mô hình cùng ủ tiếp tục được dùng trong mô hình ủ trước này.

So sánh khả năng ức chế của nấm men với nhóm nấm men giống nhau trong mô hình ủ trước

Sau khi rửa trong PBS và ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 7500 vòng/phút, tái tạo huyền phù từ mẫu nấm men ở nồng độ  $4.10^8$  nấm men/ml trong PBS. Tiến hành pha loãng huyền phù chứa nấm men này trong PBS theo các tỷ lệ là  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{20}$  và  $\frac{1}{100}$ . Ba thử nghiệm độc lập được tiến hành cùng sử dụng quy trình 2.

Các kết quả được minh họa tại Fig. 21A và 21B (mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn dư) được biểu hiện dưới dạng giá trị trung bình của tỷ lệ giữa mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn và thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn của giá trị trung bình.

Bằng cách xử lý trước tế bào T84 bằng nấm men, có thể thu được tác dụng ức chế đáng kể sự bám dính của chủng LF82 từ liều  $5.10^6$  nấm men/ml đối với dạng khô dùng ngay chủng ScPro1 và dạng khô chủng ScPro1. Tuy nhiên, ở liều này, tác dụng ức chế không đáng kể được quan sát thấy với nấm men dạng khô dùng ngay SCB1.

Bằng cách xử lý trước tế bào T84 bằng nấm men, có thể thu được tác dụng ức chế sự xâm lấn của chủng LF82 bắt đầu từ liều  $1.10^5$  nấm men/ml đối với chủng nấm men khô ScPro1.

Bắt đầu từ liều  $5.10^5$  nấm men/ml, 3 mẫu nấm men đều làm giảm đáng kể sự xâm lấn của chủng LF82.

Các thử nghiệm ức chế bằng các mannoprotein của EL50 trong mô hình ủ trước

Các mannoprotein của nấm men EL05 được tạo huyền phù trong PBS ở nồng độ 160mg/ml. Tiến hành pha loãng huyền phù này trong PBS theo tỷ lệ là 1/2, 1/4, 1/8 và 1/40 và 25µL dịch huyền phù đã pha loãng chứa mannoprotein được bổ sung vào môi trường gây nhiễm cùng sử dụng quy trình 2. Ba thử nghiệm độc lập được tiến hành. Các kết quả tại Fig. 22A và 22B (mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn dư) được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình của tỷ lệ giữa mức độ bám dính dư và mức độ xâm lấn dư và thanh sai số tương ứng với sai số chuẩn của giá trị trung bình.

Các mannoprotein của EL05 ức chế theo cách phụ thuộc liều sự bám dính và xâm lấn của chủng LF82 bắt đầu từ nồng độ 2mg/ml.

Kết quả của thử nghiệm ức chế sự bám dính của chủng AIEC LF82 vào tế bào CHO-K1 biểu hiện thụ thể CEACAM6 bằng nấm men trong mô hình ủ trước hoặc không

Năm thử nghiệm độc lập được tiến hành cùng sử dụng quy trình 2 như đã mô tả ở trên.

Fig. 23 cho thấy mức độ ức chế đáng kể sự bám dính của chủng AIEC LF82 vào tế bào CEACAM6/CHO bằng 25µg/ml nấm men ủ trước. Tác dụng phụ thuộc liều được quan sát thấy đối với các tế bào này.

Cũng quan sát thấy sự bám dính của chủng AIEC LF82 vào tế bào CHO-K1, điều này chắc chắn do sự biểu hiện của các protein đã manosyl hóa trên bề mặt của các tế bào này. Tuy nhiên, việc ủ trước chủng LF82 với nấm men không dùng ngay ScPro1 ức chế mạnh sự bám dính vào các tế bào không được chuyển nhiễm.

Do đó, điều này khẳng định rằng nấm men ảnh hưởng đến sự bám dính của chủng LF82 vào thụ thể CEACAM6 được biểu hiện trên các tế bào.

Kết quả ức chế sự bám dính của chủng AIEC LF82 vào bờ dạng bàn chải của các tế bào ruột ở bệnh nhân mắc bệnh Crohn trong mô hình ủ trước.

Fig.24 cho thấy chỉ số bám dính trung bình thu được trong thử nghiệm và nó được tính khi có mặt nấm men khô dùng ngay ScPro1 (mg/ml) hoặc không hoặc khi có mặt kháng thể kháng-CEACAM6 với nồng độ tăng dần. Theo kết quả được thể hiện trên hình này, mức độ giảm đáng kể và phụ thuộc vào liều của chủng AIEC LF82 được thông báo ở bờ dạng bàn chải của tế bào ruột ở bệnh nhân khi có mặt nấm men khô dùng ngay chủng ScPro1. Ở liều 5mg nấm men/ml, mức độ bám dính dư của chủng AIEC LF82 tương tự như mức độ bám dính dư quan sát được khi có mặt kháng thể kháng-CEACAM6 hoặc tương tự như mức độ bám dính dư quan sát được cho biến thể không có pili loại 1 bất kỳ.

Kết luận:

Từ nghiên cứu trên, thấy rằng:

- Nấm men ScPro1 và SCB1, đặc biệt là ở dạng khô dùng ngay, có khả năng ức chế sự bám dính của chủng LF82 vào tế bào.
- Nấm men ScPro1 và SCB1 có khả năng ức chế sự bám dính và xâm lấn *in vitro* của *E. coli* vào tế bào biểu mô ở người (T84, tế bào ruột trong sinh thiết ruột hồi) và của tế bào CHO biểu hiện thụ thể CEACAM6 ở người theo cách phụ thuộc liều.
- Các mannoprotein có khả năng ức chế sự bám dính và xâm lấn *in vitro* của *E. coli* vào tế bào biểu mô ở người (T84, tế bào ruột trong sinh thiết ruột hồi) và của tế bào CHO biểu hiện thụ thể CEACAM6 ở người theo cách phụ thuộc liều.
- *In vitro*, nấm men ScPro1 ở nồng độ cao có khả năng bảo vệ một phần, khoảng 80% tế bào khỏi nhiễm khuẩn.

Ví dụ 7: Nghiên cứu vai trò điều hòa sự biểu hiện của gen mã hóa IL-10 và PPAR $\alpha$  của nấm men ScPro1, SCB1 và dẫn xuất của chúng ở tế bào biểu mô ruột ở người được nuôi cấy *in vitro*

Tính “lợi khuẩn” của nấm men ScPro1 và SCB1 được nghiên cứu, riêng lẻ hoặc kết hợp, và/hoặc tính lợi khuẩn của các phần của nấm men, và khả năng ức chế sự kích khởi các bệnh viêm bằng cách tương tác với một số thụ thể nhất định ở ruột cũng được nghiên cứu.



### Các thử nghiệm *in vitro*

Các tác dụng của nấm men và dẫn xuất của chúng theo sáng chế được nghiên cứu kỹ ở các thụ thể khác nhau của tế bào biểu mô ruột bằng phân tích *in vitro* trên hai dòng tế bào ung thư ruột CaCo-2 (ATCC HTB-37) và HT-29 (ATCC HTB-38).

Để thực hiện các thử nghiệm này, tiến hành phép phân tích phiên mã bằng cách chiết ARN theo phương pháp sau:

Làm tan các tế bào trong trizol. Đối với phần tan, tiến hành xử lý bằng deoxyribonucleaza bằng cách bổ sung 200 $\mu$ L dung dịch chứa 10U chất ức chế ribonucleaza và 10U deoxyribonucleaza.

Tiến hành phiên mã ngược 10 $\mu$ g ARN với sự có mặt của 200U enzym phiên mã ngược, dithiothreitol, oligo-dT15 và deoxyribonucleotit.

ADN bổ sung được khuếch đại bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza đã biết (polymerase chain reaction technique - PCR) ở cùng thời điểm dưới dạng phân tử cạnh tranh sử dụng đoạn mồi có nghĩa và đối nghĩa đặc hiệu, đáng chú ý là các gen sau: IL-10 và PPAR $\alpha$ .

Sau khi tiến hành 40 chu trình khuếch đại với sự có mặt của 1,25U Ampli Taq Gold 5000, điện di các mẫu khác nhau trên 3% agarosa, xác định cường độ các dải ảnh thu được bằng máy phân tích ảnh.

Các kết quả được biểu hiện bằng số phân tử ARN thông tin cho 10<sup>5</sup> phân tử chất chuẩn nội là  $\beta$ -actin.

Các kết quả, được thể hiện theo nhóm tại Fig.11, gồm mức độ biểu hiện ARN thông tin ở thời điểm 1 giờ (trong tham chiếu A) và 3 giờ (trong tham chiếu B) của nấm men hoặc dẫn xuất của chúng sau khi cho chúng tiếp xúc với tế bào biểu mô ruột của gen mã hóa protein kháng viêm IL-10.

Tại Fig.11, các ký hiệu sau chỉ các nấm men/dẫn xuất của chúng được thử nghiệm có mức độ biểu hiện sớm lớn hơn 4 lần tín hiệu tham chiếu:

3 chỉ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,

5 chỉ nấm men ScPro1 theo sáng chế,

6 chỉ chiết xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, và

12 chỉ phần ARN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Các kết quả này thực tế cho thấy nấm men và dẫn xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* theo sáng chế, tạo ra sự biểu hiện sớm của gen mã hóa xytokin kháng viêm, IL-10, sau một giờ.

Thực vậy, so với đối chứng không được xử lý, mức độ biểu hiện ARN thông tin của nấm men theo sáng chế và dẫn xuất của chúng lớn hơn 4 lần trên trục tung, giá trị này đồng nghĩa với việc xuất tín hiệu biểu hiện rất sớm.

Các kết quả khác được nêu theo nhóm tại Fig.13. Hình này cho thấy tác dụng điều hòa, mức độ biểu hiện ARN thông tin của gen mã hóa protein IL-10 theo cách phụ thuộc vào lượng dẫn xuất của nấm men được cung cấp.

Tại Fig. 13, mức độ biểu hiện được xác định sau một giờ (1 giờ) và sau 3 giờ (3 giờ). Mức độ biểu hiện của nấm men và chiết xuất của *Saccharomyces cerevisiae* theo sáng chế có thể quan sát được, được ký hiệu như sau:

- 5 chỉ nấm men ScPro1 theo sáng chế,
- 6 chỉ chiết xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 8 chỉ  $\beta$ -glucan thành tế bào của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 9 chỉ mannoprotein thành tế bào của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 11 chỉ phần ADN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, và
- 12 chỉ phần ARN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Mức độ biểu hiện được xác định ở các nồng độ khác nhau của nấm men và/hoặc dẫn xuất của chúng.

Tại Fig.13, cột có màu càng tối thì nồng độ của nấm men/dẫn xuất của chúng càng cao.

Các kết quả nêu tại Fig.13 cho thấy chất chiết của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* theo sáng chế sớm tạo ra ARN thông tin của xytokin kháng viêm (IL-10).

Các kết quả được nêu thành nhóm tại Fig.12 gồm mức độ biểu hiện ARN thông tin của gen mã hóa thụ thể nhân PPAR $\alpha$  một giờ (trong tham chiếu A), và 3 giờ (trong tham chiếu B) sau khi cho nấm men hoặc dẫn xuất của chúng tiếp xúc với tế bào biểu mô ruột.

Tại Fig.12, các ký hiệu dưới đây chỉ nấm men/dẫn xuất của chúng được thử nghiệm có mức độ biểu hiện chậm hơn ba lần so với tín hiệu tham chiếu:

- 1 chỉ nấm men ScPro1 thuộc chủng *Saccharomyces cerevisiae* theo sáng chế ở dạng khô có hoạt tính,
- 4 chỉ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 5 chỉ nấm men ScPro1 thuộc chủng *Saccharomyces cerevisiae* theo sáng chế ở dạng khô có hoạt tính,
- 8 chỉ một phần của thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 9 chỉ một phần của  $\beta$ -glucan thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 10 chỉ một phần của mannoprotein của thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 11 chỉ phần ADN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, và
- 12 chỉ phần ARN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Các kết quả này thực tế cho thấy nấm men và dẫn xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* theo sáng chế tạo ra sự chậm biểu hiện gen mã hóa thụ thể nhân PPAR $\alpha$  sau 3 giờ.

Thực vậy, mức độ biểu hiện ARN thông tin của nấm men và dẫn xuất theo sáng chế lớn hơn ba lần trên trục tung, giá trị này tương ứng với sự chậm biểu hiện tín hiệu ở mức tốt.

Ví dụ 8: Nghiên cứu vai trò điều hòa mức độ biểu hiện của gen mã hóa IL-10 và TNF- $\alpha$  *ex vivo* của nấm men và dẫn xuất của chúng ở tế bào biểu mô ruột ở người phân lập được từ sinh thiết ruột từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn

Ảnh hưởng của nấm men và/hoặc dẫn xuất của chúng đến việc tiết cytokin IL-10 (kháng viêm) và TNF- $\alpha$  (gây viêm), được nghiên cứu *ex vivo* trên sinh thiết ruột lấy từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoặc không.

Lấy mẫu sinh thiết ruột từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoặc không, và sau đó, đặt chúng trong 24 giờ trên môi trường HBSS-CMF được bổ sung penixilin và streptomycin, ở 37°C trong không khí chứa 5% CO<sub>2</sub>. Sau khi rửa, cho sinh thiết này tiếp xúc với nấm men hoặc dẫn xuất của chúng trong 4 giờ trong môi

trường RPMI 1640. Thu hồi dịch nổi để phân tích bằng ELISA. Sau đó, làm tan sinh thiết để chiết được ARN thông tin hoặc protein tổng số.

Việc tiết ra các xytokin được xác nhận bằng cách phân tích miễn dịch học dịch nổi thu được từ môi trường nuôi cấy tế bào và protein được chiết bằng ELISA. Toàn bộ số protein được làm biến tính trong 5 phút ở 95°C trong đệm lưu giữ (thể tích/thể tích; 75mM Tris độ pH=6,8; 5% glyxerol; 0,25% xanh lục bromphenol; 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol được lưu giữ (50 $\mu$ g) và phân tách trên gel polyacrylamit 10%. Sau khi di chuyển, chuyển các protein này lên màng PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) bằng cách điện chuyển bán rắn (Hoefer TE77, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) trong 1 giờ ở 16V. Tiến hành phát hiện PPAR $\alpha$  và IL-10 bằng kháng huyết thanh đa dòng của thỏ kháng-PPAR $\alpha$  và kháng-IL-10 của người, được pha loãng đến 1/500 và định lượng bằng phương pháp phát quang hóa học (E.C.L. Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) trên màng Biomax-MR (Kodak) bằng gói phần mềm Gel Analyst (CLARA VISION, Paris, France).

Fig. 16 và 17 lần lượt thể hiện các kết quả thu được đối với IL-10 và TNF- $\alpha$ . Trục tung thể hiện lượng xytokin được biểu hiện bằng pg/ml. Mỗi điểm tương ứng với giá trị đo được từ sinh thiết ruột ở bệnh nhân mắc bệnh Crohn đang trong giai đoạn cấp tính (vòng tròn màu đen), ở bệnh nhân mắc bệnh Crohn đang ở giai đoạn thuyên giảm (các vòng tròn màu xám) và ở bệnh nhân khỏe mạnh (vòng tròn màu trắng). Phần ký hiệu dạng thanh thể hiện giá trị trung bình của các phép đo.

Trong các hình này:

- 1 chỉ nấm men *Saccharomyces cerevisiae* ScPro1 theo sáng chế ở dạng khô có hoạt tính,
- 3 chỉ nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 8 chỉ một phần của thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*,
- 11 chỉ phần ADN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, và
- 12 chỉ phần ARN của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.

Tại Fig. 16, nấm men ScPro1 theo sáng chế tiết ra xytokin kháng viêm, IL-10 gấp hai lần so với các tế bào biểu mô ở bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoặc ở

bệnh nhân mắc bệnh Crohn đang ở giai đoạn thuyên giảm so với bệnh nhân khỏe mạnh và so với đối chứng âm (-) tương ứng, trong đó các phép đo được tiến hành khi chỉ có mặt nước muối sinh lý.

Fig.17 cho thấy nấm men ScPro1 theo sáng chế không làm tăng việc tiết xytokin gây viêm, TNF- $\alpha$ , ở tế bào ruột phân lập được từ sinh thiết ruột lấy từ bệnh nhân mắc bệnh Crohn hoặc đang thuyên giảm. ScPro1, hoặc nấm men khác hoặc dẫn xuất của chúng được thử nghiệm gây tiết TNF- $\alpha$ .

Ví dụ 9: Nghiên cứu đặc tính giảm đau của các nấm men và dẫn xuất của chúng trong mô hình chuột nhắt bị phồng ruột

Ở chuột nhắt khỏe mạnh

1/ Thiết bị và phương pháp

Chuột nhắt cái Sprague Dawley (Charles River, l'Arbresle, France) có trọng lượng nằm trong khoảng từ 175 đến 200g được dùng trong các thử nghiệm này. Chúng được cho làm quen với điều kiện trong lồng nhốt trước khi thử nghiệm. Chúng được nhốt trong lồng với số lượng 5 con/một lồng, được cung cấp nước và thức ăn vừa đủ. Tất cả các thử nghiệm được tiến hành theo khuyến cáo của Ủy ban nghiên cứu các vấn đề đạo đức của hiệp hội thế giới chuyên nghiên cứu về chứng đau [6]. Việc chẩn đoán trước cũng được tiến hành để tránh hoặc giảm thiểu căng thẳng cho những con chuột này.

2/ Đánh giá tính nhạy của ruột kết

Ngưỡng cảm nhận đau của động vật được ước tính bằng cách xác định áp suất trong ruột cần để tạo ra đáp ứng hành vi. Áp suất này được tạo ra bằng cách làm phồng ruột kết trực tràng bằng cách bơm một quả bóng và đưa vào trong ruột. Đáp ứng hành vi đặc trưng bởi sự gia tăng thể tích phần sau của cơ thể động vật và sự co bóp bất thường có thể nhìn thấy rõ trong một vài lần co bóp [7-9]. Gây mê những con chuột này bằng thuốc gây mê dễ bay hơi (2% isofluran) và đưa quả bóng vào ruột kết trực tràng (được chuẩn bị theo quy trình đã được Bourdu [8] mô tả) thông qua đường trực tràng theo cách ít xâm lấn nhất có thể, và ở vị trí 7cm so với hậu môn. Gắn ống thông vào gốc đuôi bằng băng dính. Sau 5 phút, đặt chúng vào giữa hộp Plexiglas và nối ống thông với hộp

điều áp điện tử (Distender Series IIRTM, G & J Electronics). Để áp suất tăng dần cho đến khi kích khởi phản xạ đau hoặc cho đến khi đạt đến áp suất giới hạn bằng 80mm thủy ngân.

### 3/ Các hợp chất được dùng

Nấm men được dùng bằng cách cho ăn cưỡng bức một lần một ngày trong 15 ngày.

Đối chứng dương được tạo ra bằng cách tiêm morphin vào trong màng bụng với liều 1mg/kg, 30 phút trước khi làm phòng ruột kết trực tràng.

Tiến hành nghiên cứu trên 8 nhóm:

- 10 chuột đối chứng nhận PBS,
- 10 chuột nhận dạng khô dùng ngay ScPro1 (100 $\mu$ g/ngày), (tham chiếu 1)
- 10 chuột nhận dạng khô có hoạt tính chủng ScPro1(100 $\mu$ g/ngày), (tham chiếu 2)
- 10 chuột nhận chủng SCB1 (100 $\mu$ g/ngày), (tham chiếu 3)
- 10 chuột nhận dạng khô dùng ngay chủng ScPro1 (50 $\mu$ g/ngày) + dạng khô dùng ngay chủng SCB1 (50 $\mu$ g/ngày) (tham chiếu 4)
- 10 chuột nhận một liều tiêm morphin (1mg/kg, 30 phút trước khi làm phòng) (tham chiếu 5).

### 4/ Các kết quả

Fig.26 một mặt cho thấy nấm men ScPro1 ở dạng khô dùng ngay của nó có thể được dùng một mình (tham chiếu 1) hoặc kết hợp với chủng SCB1 (tham chiếu 4), và mặt khác ở dạng khô có hoạt tính (tham chiếu 2), nó làm tăng ngưỡng cảm nhận đau, nhờ đó làm giảm đáng kể ngưỡng đau nội tạng so với chuột không được dùng gì.

Các kết quả dưới đây được tính bằng mm thủy ngân so với đối chứng:

- 74,5 $\pm$ 3,07 so với 53,6 $\pm$ 3,9,  $p=0,07$  đối với dạng khô dùng ngay chủng ScPro1 – (tham chiếu 1),
- 66,5 $\pm$ 3,36 so với 53,6 $\pm$ 3,9,  $p=0,04$  đối với hỗn hợp gồm dạng khô dùng ngay của chủng ScPro1 và SCB1 – (tham chiếu 4),

-  $72 \pm 2,59$  so với  $53,6 \pm 3,9$ ,  $p < 0,01$  đối với dạng khô dùng ngay chủng ScPro1 – (tham chiếu 2).

Mặt khác, tác dụng này tương đương với tác dụng được tạo ra nhờ morphin – tham chiếu 5 – được dùng ở liều 1mg/kg với ngưỡng đau là  $72 \pm 2,59$  mm thủy ngân.

Dạng khô dùng ngay của chủng SCB1 cũng tạo ra tác dụng giảm đau ở chuột khỏe mạnh,  $70,6 \pm 3,10$  mm thủy ngân  $p = 0,026$ .

Ở chuột có nội tạng quá mẫn

#### 1/ Thiết bị và phương pháp

Chuột nhắt cái Sprague Dawley (Charles River, L'Arbresle, France) có trọng lượng nằm trong khoảng từ 175 đến 200g được dùng. Những con chuột này được cho làm quen với điều kiện thí nghiệm một tuần trước khi thử nghiệm. Chúng được giữ với số lượng 5 con/lồng và được cung cấp nước uống và thức ăn vừa đủ. Tất cả các thử nghiệm được tiến hành theo khuyến cáo của Ủy ban nghiên cứu về vấn đề đạo đức của hiệp hội thế giới chuyên nghiên cứu về chứng đau [6]. Việc chẩn đoán trước cũng được tiến hành để tránh hoặc giảm thiểu căng thẳng cho những con chuột được thử nghiệm.

2/ Tạo ra phản ứng quá mẫn của ruột kết bằng cách rửa nhiều lần bằng butyrat

Với mỗi lần rửa, đưa ống thông (2mm Fogarty) vào trong ruột kết ở vị trí 7cm tính từ hậu môn và cho động vật được nhận 1ml dung dịch butyrat 200mM có độ pH trung tính (độ pH=6,9) hai lần một ngày trong 3 ngày. Các con chuột “khỏe mạnh” được nhận nước muối sinh lý.

#### 3/ Xử lý động vật thử nghiệm bằng nấm men theo sáng chế

10 nhóm chuột có nội tạng quá mẫn được sử dụng ( $n=10$ /nhóm). Các con chuột xử lý được nhận  $100\mu\text{g}$  nấm men bằng cách cho ăn cưỡng bức, một ngày một lần trong 15 ngày. Các con chuột đối chứng được nhận PBS theo cùng quy trình như nêu trên. Nấm men được tạo huyền phù trong dung dịch PBS. Truyền dung dịch butyrat hoặc dung dịch nước muối sinh lý bắt đầu vào ngày thứ 7 sau khi cho ăn cưỡng bức lần đầu, và tiến hành trong ba ngày. Xác định phản ứng

quá mẫn của ruột kết 14 ngày sau khi bắt đầu xử lý thông qua dùng đường miệng, nghĩa là 7 ngày trước khi truyền các dung dịch nêu trên vào ruột kết.

#### 4/ Nhóm động vật nghiên cứu

Tiến hành nghiên cứu trên 7 nhóm chuột. Số tham chiếu tương ứng được nêu tại Fig.26.

- 10 chuột nhận PBS (đối chứng),
- 10 chuột nhận nấm men dạng khô dùng ngay ScPro1 (100µg/ngày) – (tham chiếu 1),
- 10 chuột nhận nấm men dạng khô có hoạt tính ScPro1(100µg/ngày) – (tham chiếu 2),
- 10 chuột nhận nấm men khô dùng ngay ScPro1 (100µg/ngày) – (tham chiếu 3),
- 10 chuột nhận dạng khô dùng ngay ScPro1 (50µg/ngày) và dạng khô dùng ngay SCB1 (50µg/ngày) – (tham chiếu 4),
- 10 chuột nhận morphin – (tham chiếu 5),
- 10 chuột nhận dung dịch fibrat – (tham chiếu 6).

#### 5/ Các kết quả

Trước hết, cần thấy rằng đối với các chuột đối chứng, ngưỡng đau trong thử nghiệm trên chuột được làm quá mẫn nhỏ hơn ngưỡng đau của chuột khỏe mạnh như được nêu dưới đây.

Nấm men khô dùng ngay ScPro1, riêng lẻ hoặc kết hợp với nấm men SCB1, thể hiện tác dụng giảm đau đáng kể trong mô hình này.

Các trị số là như sau:

| Các tham chiếu | mm thủy ngân      |
|----------------|-------------------|
| 1              | 56,5±4,27 p= 0,03 |
| 4              | 59±4,33 p= 0,02   |

Nấm men theo sáng chế cho phép phục hồi ngưỡng cảm nhận đau giống như với ngưỡng cảm nhận đau quan sát được ở chuột khỏe mạnh. Tác dụng giảm đau này của nấm men tương đương với tác dụng giảm đau do morphin tạo ra.



Ngoài ra, Fig.26 còn cho thấy tác dụng giảm đau mạnh mẽ của fenofibrat, hợp chất này làm tăng ngưỡng cảm nhận đau ở chuột có nội tạng quá mẫn lên 2 lần ( $70 \pm 4,48$  p= 0,001).

Kết quả này đã khẳng định vai trò của thụ thể PPAR $\alpha$  trong việc điều biến chứng đau nội tạng.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa tế bào nấm men bao gồm: (i) các tế bào có tất cả các đặc tính định danh của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) với số lưu giữ CNCM I-3856, và/hoặc (ii) các tế bào có tất cả các đặc tính định danh của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số lưu giữ CNCM I-3799, và (iii) ít nhất một tá được.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên ở dạng khô hoặc dạng tươi.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên ở dạng khô dùng ngay hoặc dạng khô có hoạt tính.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa từ  $10^7$  đến  $6.10^{10}$  CFU tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên.
5. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa từ 1mg đến 10g tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên.
6. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa từ  $10^8$  đến  $2.10^{10}$  CFU tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này chứa từ 1mg đến 1g tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một dẫn xuất của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được chọn từ chất chiết của nấm men, dẫn xuất của thành tế bào nấm men, glucan của thành tế bào nấm men, mannoprotein của thành tế bào nấm men, các phần lipid của nấm men, và các phần axit nucleic của nấm men (ARN, ADN).
9. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được dùng để làm tăng sức chịu đau hoặc giảm đau ở đối tượng cần dùng.
10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó chứng đau do tăng cảm đau gây ra.

11. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó chứng đau được chọn từ chứng đau ruột, đau nội tạng mạn tính, và chứng đau do tăng cảm đau đi kèm với bệnh lý và rối loạn của ruột.

12. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó chứng đau đi kèm với bệnh lý hoặc rối loạn của ruột được chọn từ các rối loạn chức năng của ruột, hội chứng đau ruột chức năng, bệnh viêm ruột mạn tính, không dung nạp thực phẩm, hội chứng ruột kích thích, viêm loét đại tràng, viêm kết trực tràng xuất huyết, bệnh không dung nạp gluten, và bệnh Crohn.

13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm này được dùng với lượng đủ để cải thiện ít nhất một trong số tình trạng của dạ dày-ruột và hệ vi sinh vật đường ruột.

14. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm này được dùng với lượng đủ để điều trị bệnh lý hoặc rối loạn.

15. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên ở dạng khô hoặc tươi.

16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên ở dạng khô dùng ngay hoặc dạng khô có hoạt tính.

17. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên được dùng với liều hằng ngày chứa từ  $10^7$  đến  $6.10^{10}$ CFU.

18. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên được dùng với liều hằng ngày chứa từ  $10^8$  đến  $2.10^{10}$ CFU.

19. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó chế phẩm này được dùng với liều hằng ngày nằm trong khoảng từ 1mg đến 10g.

20. Chế phẩm theo điểm 19, trong đó chế phẩm này được dùng với liều hằng ngày nằm trong khoảng từ 1mg đến 1g.

21. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được dùng với lượng hữu hiệu cho đối tượng cần điều trị bệnh lý hoặc rối loạn của ruột.

22. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó bệnh lý hoặc rối loạn của ruột được chọn từ các rối loạn chức năng của ruột, hội chứng đau ruột chức năng, bệnh

viêm ruột mạn tính, không dung nạp thực phẩm, hội chứng ruột kích thích, viêm loét đại tràng, viêm kết trực tràng xuất huyết, bệnh không dung nạp gluten, và bệnh Crohn.

23. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó chế phẩm này được dùng với lượng đủ để cải thiện ít nhất một trong số tình trạng của dạ dày-ruột và hệ vi sinh vật đường ruột.

24. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên ở dạng khô hoặc tươi.

25. Chế phẩm theo điểm 24, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên ở dạng khô dùng ngay hoặc dạng khô có hoạt tính.

26. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên được dùng với liều hằng ngày chứa từ  $10^7$  đến  $6.10^{10}$ CFU.

27. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó tế bào nấm men của ít nhất một chủng nấm men nêu trên được dùng với liều hằng ngày chứa từ  $10^8$  đến  $2.10^{10}$ CFU.

28. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó chế phẩm này được dùng với liều hằng ngày nằm trong khoảng từ 1mg đến 10g.

29. Chế phẩm theo điểm 28, trong đó chế phẩm này được dùng với liều hằng ngày nằm trong khoảng từ 1mg đến 1g.

30. Kit chứa tế bào nấm men bao gồm: (i) các tế bào có tất cả các đặc tính định danh của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3856, và/hoặc (ii) các tế bào có tất cả các đặc tính định danh của chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* thu được từ chủng được lưu giữ tại bộ sưu tập giống vi sinh vật quốc gia với số CNCM I-3799 ở dạng thích hợp để dùng qua đường miệng.

1/13

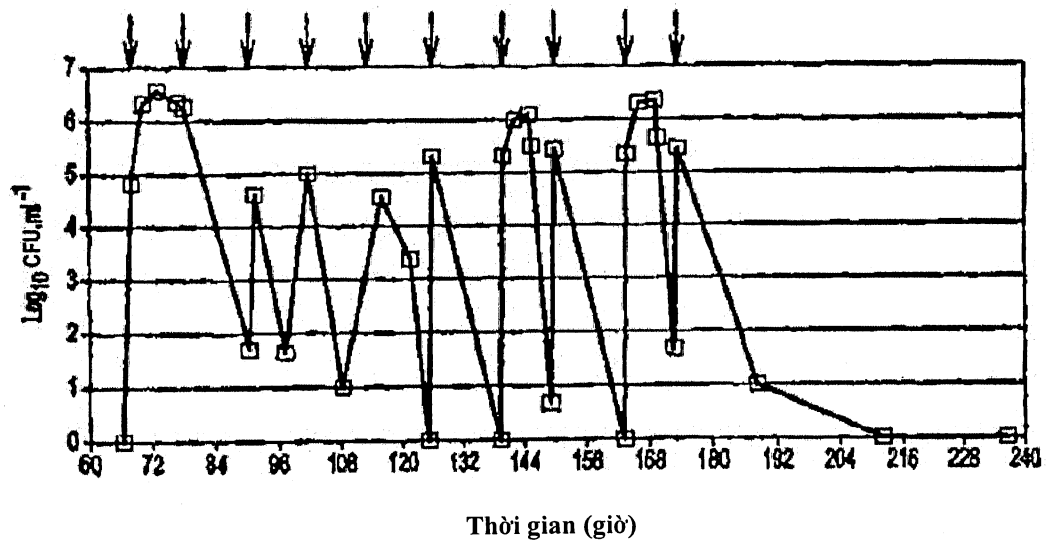


Fig. 1

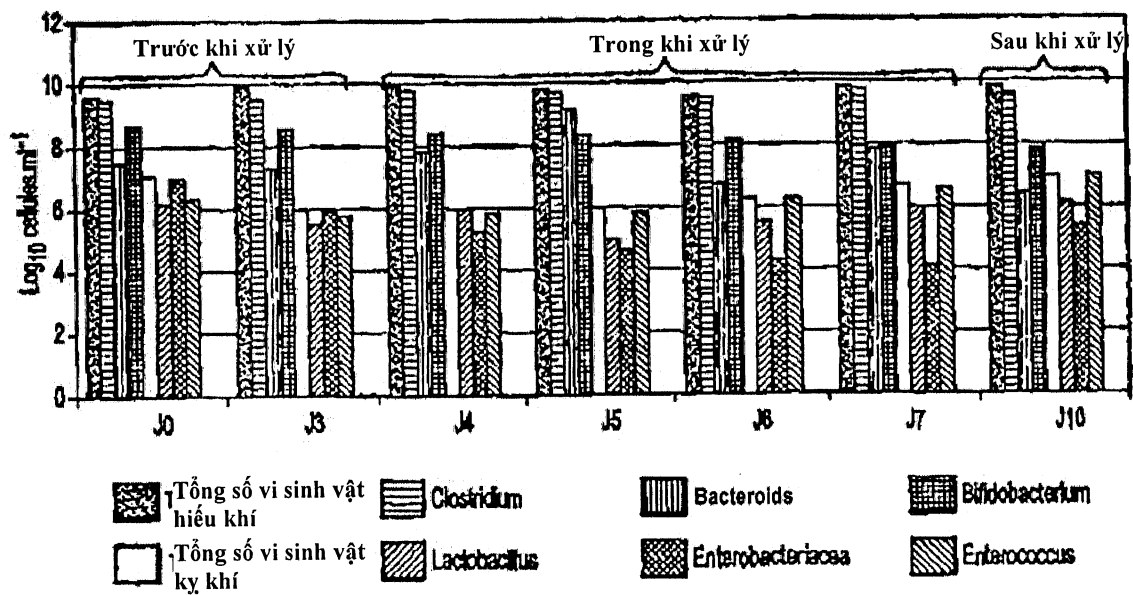


Fig. 2

2/13

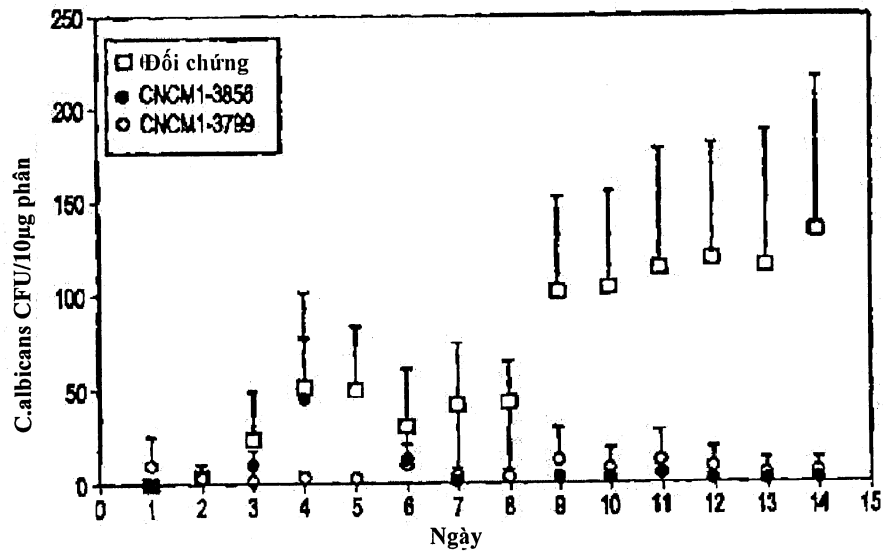


Fig. 3

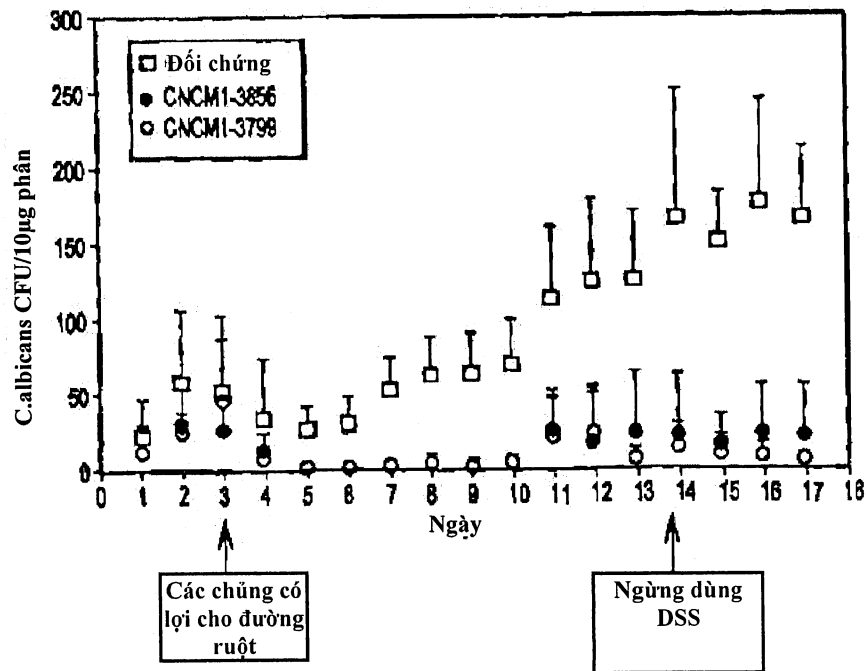


Fig. 4

3/13

Fig. 5

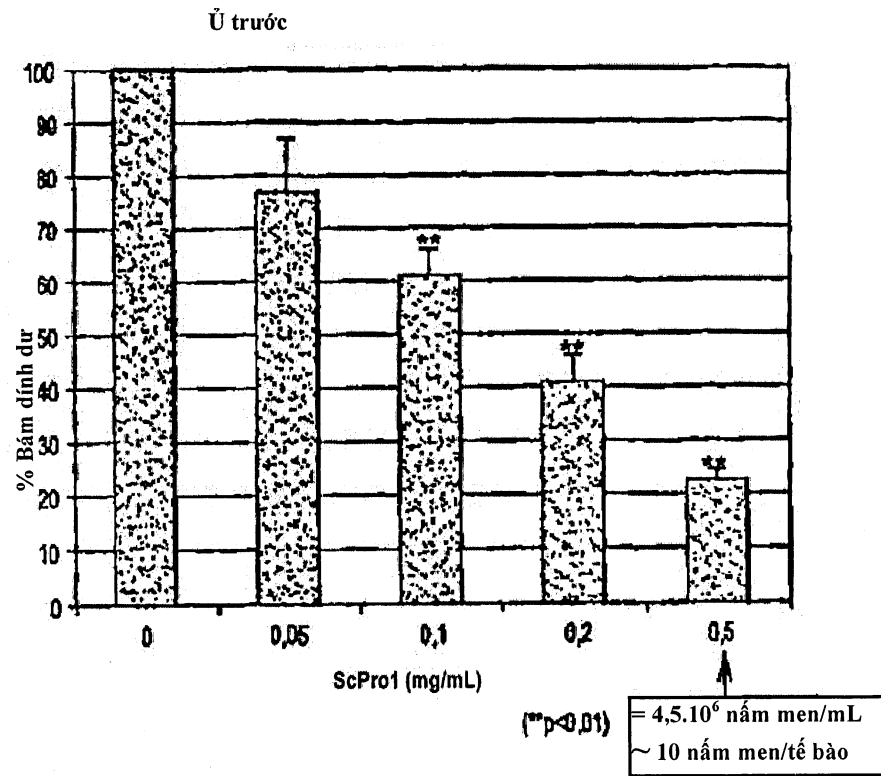
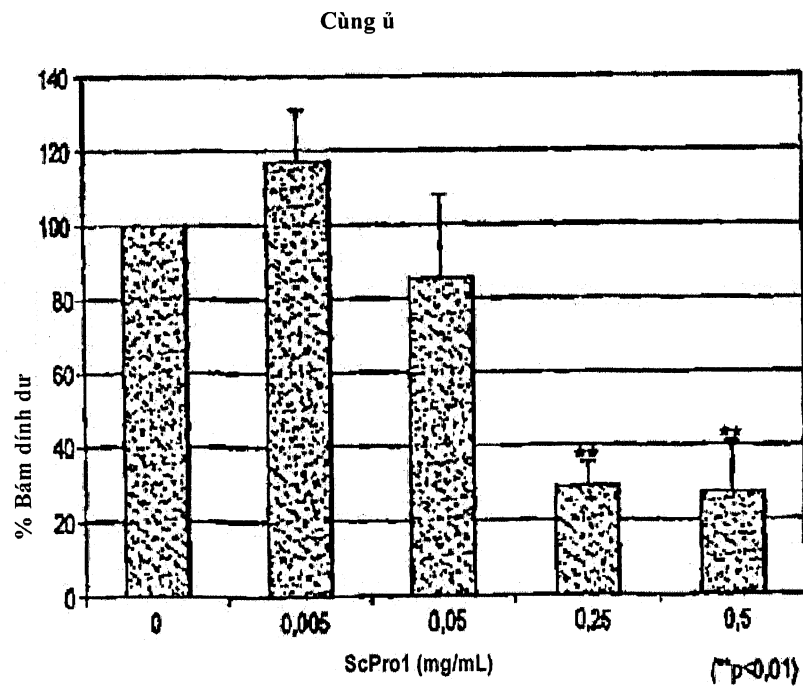
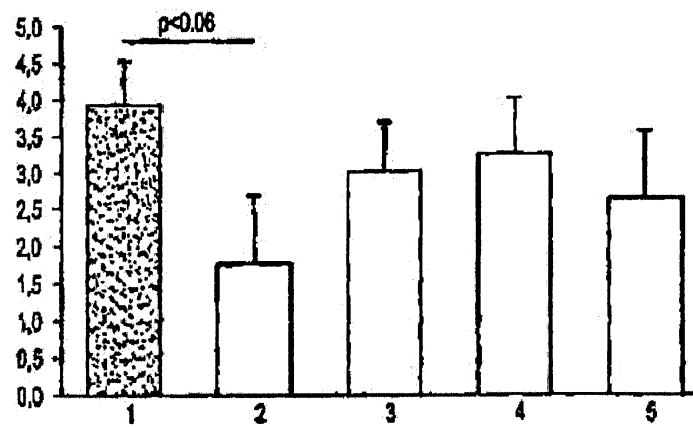
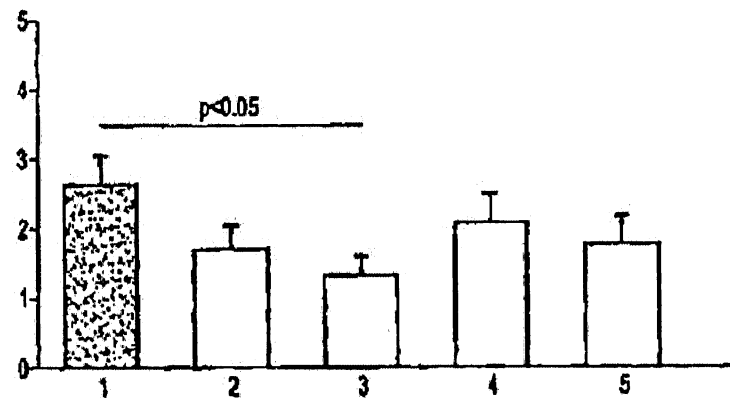
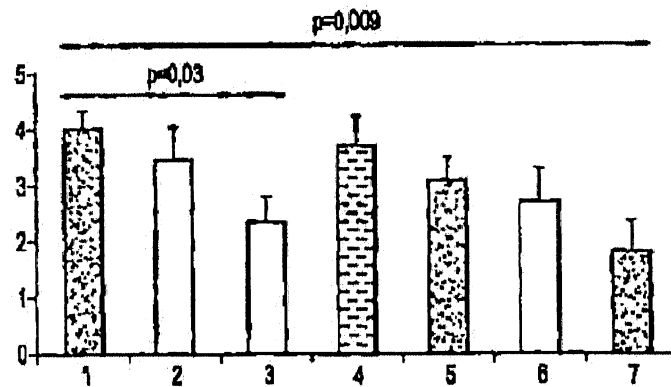
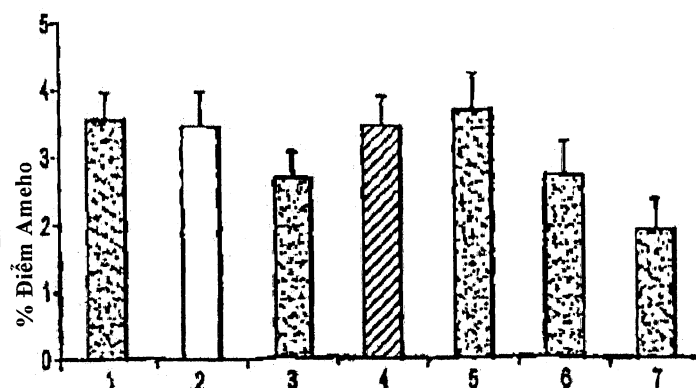


Fig. 6

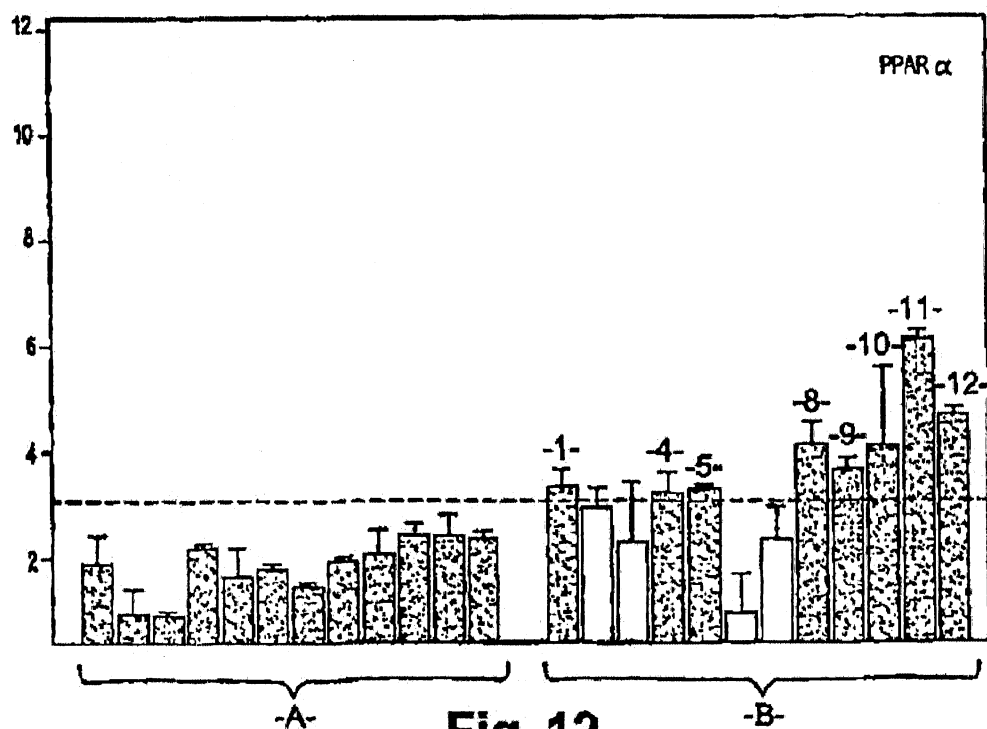
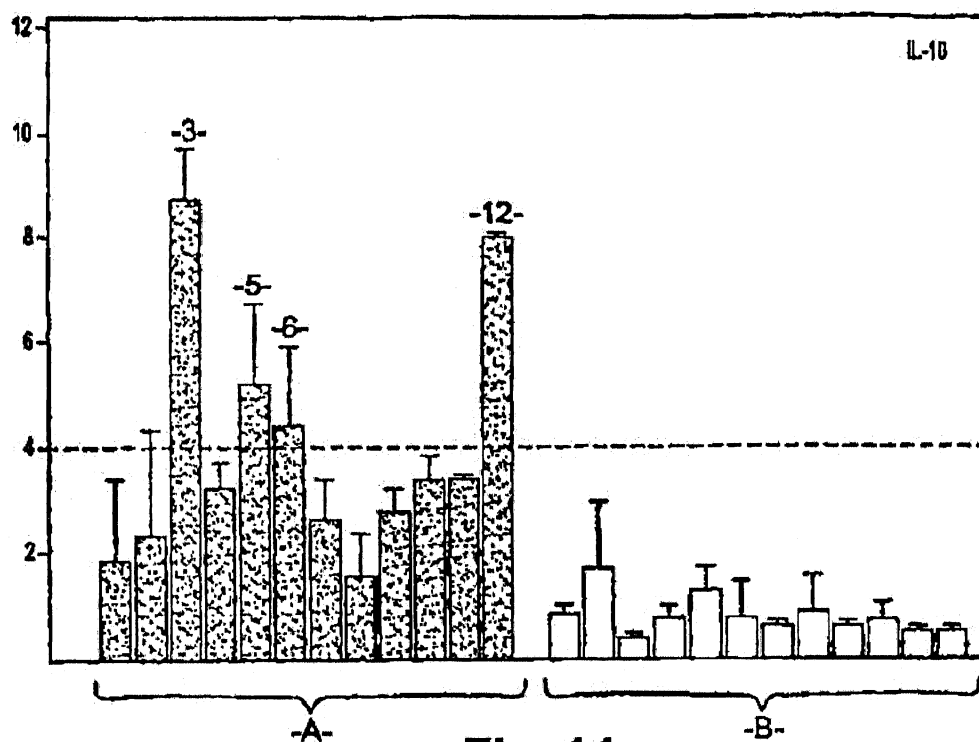


4 / 13

**Fig. 7****Fig. 8****Fig. 9****Fig. 10**



5/13



6/13

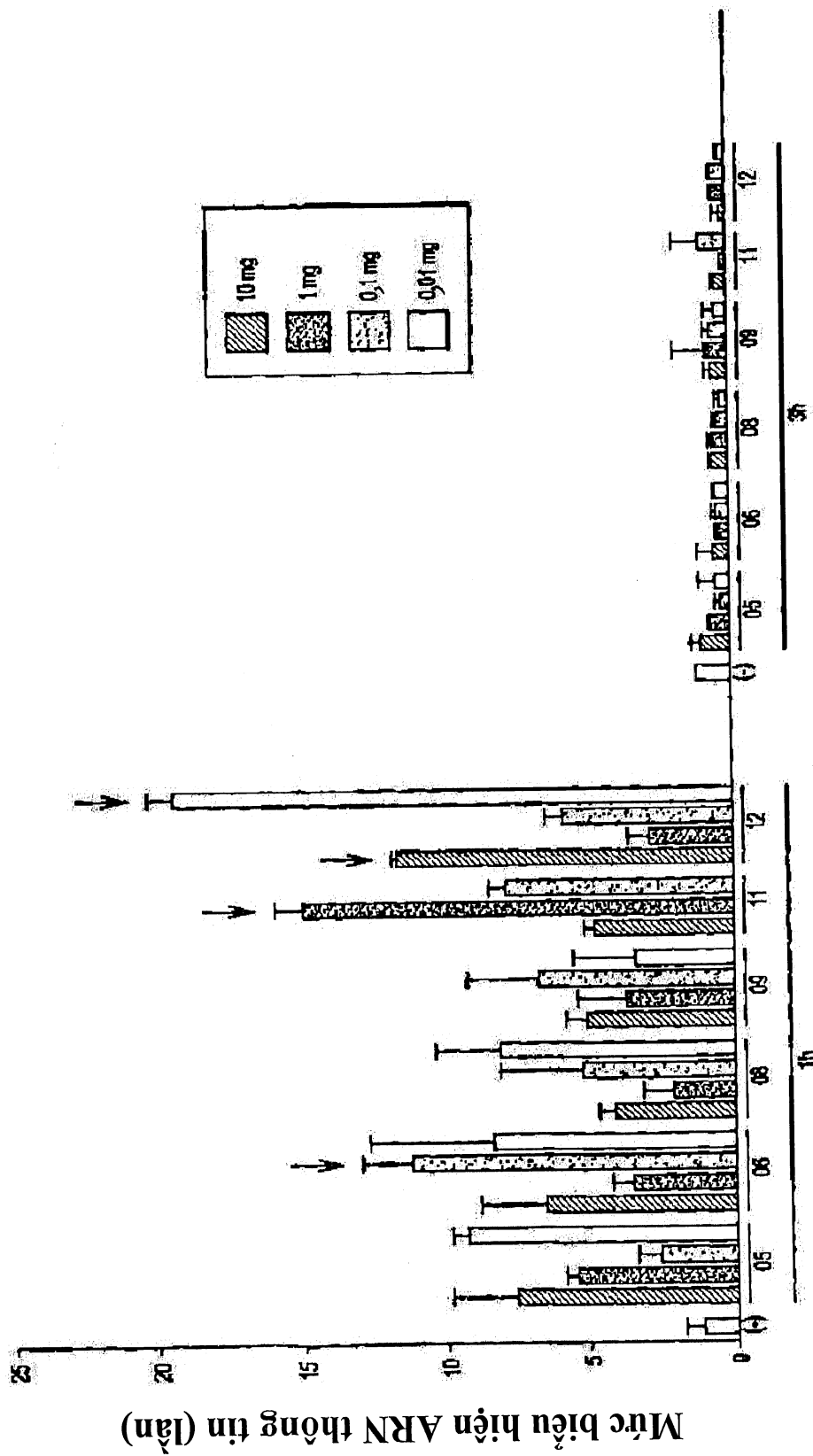


Fig. 13

7/13

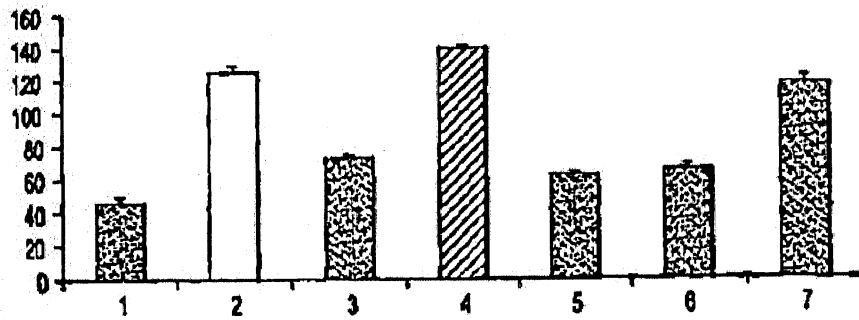


Fig. 14

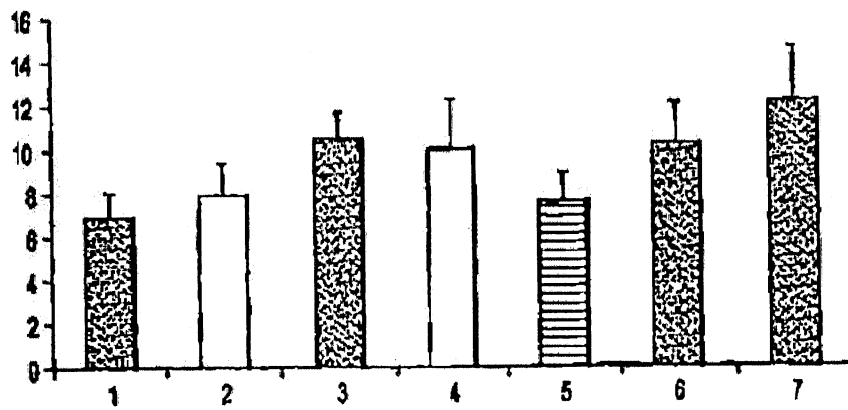


Fig. 15

8/13

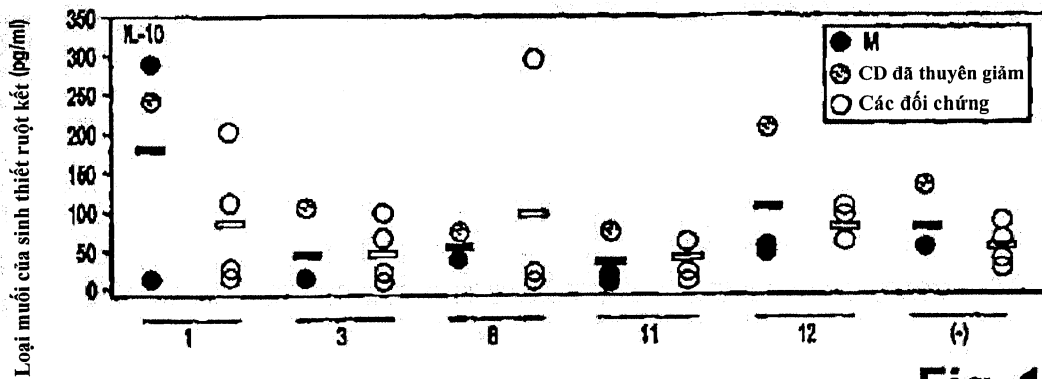


Fig. 16

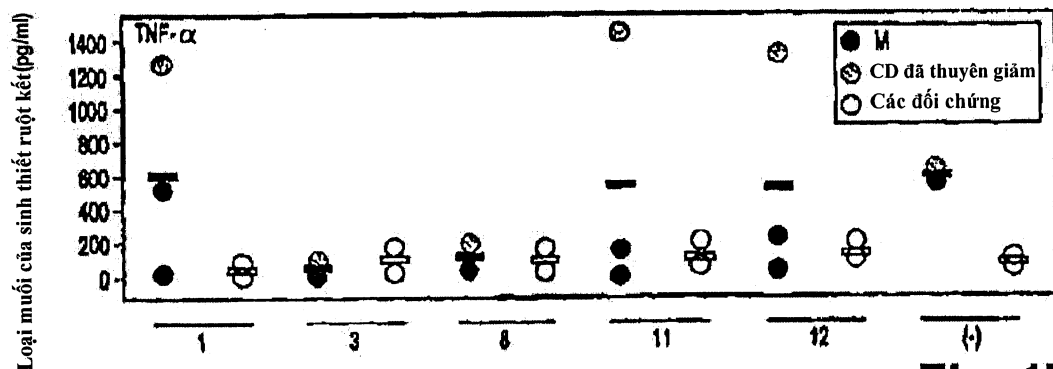


Fig. 17

Thử nghiệm ELISA : Các mannoprotein của nấm men

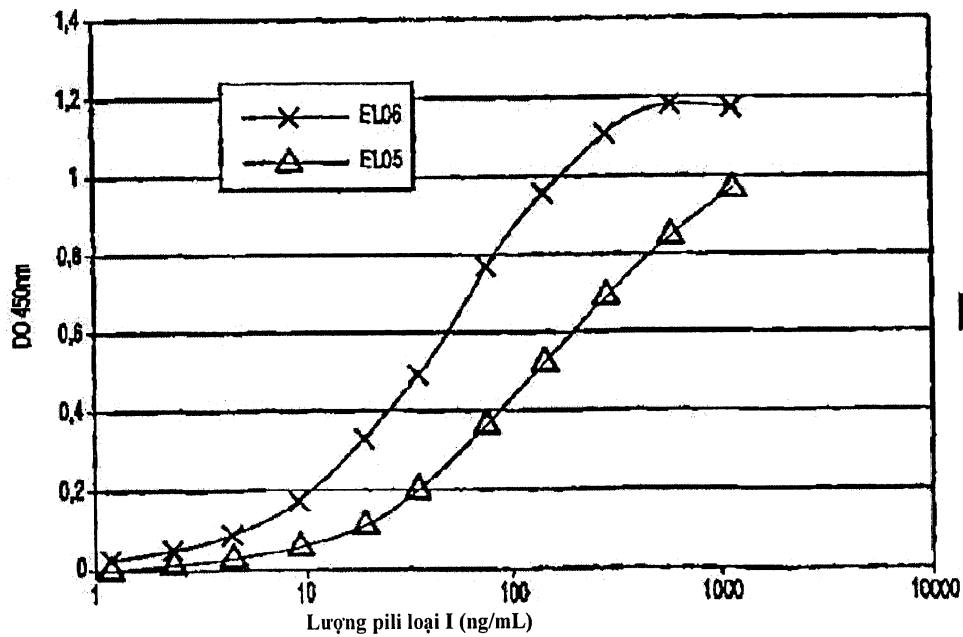


Fig. 18

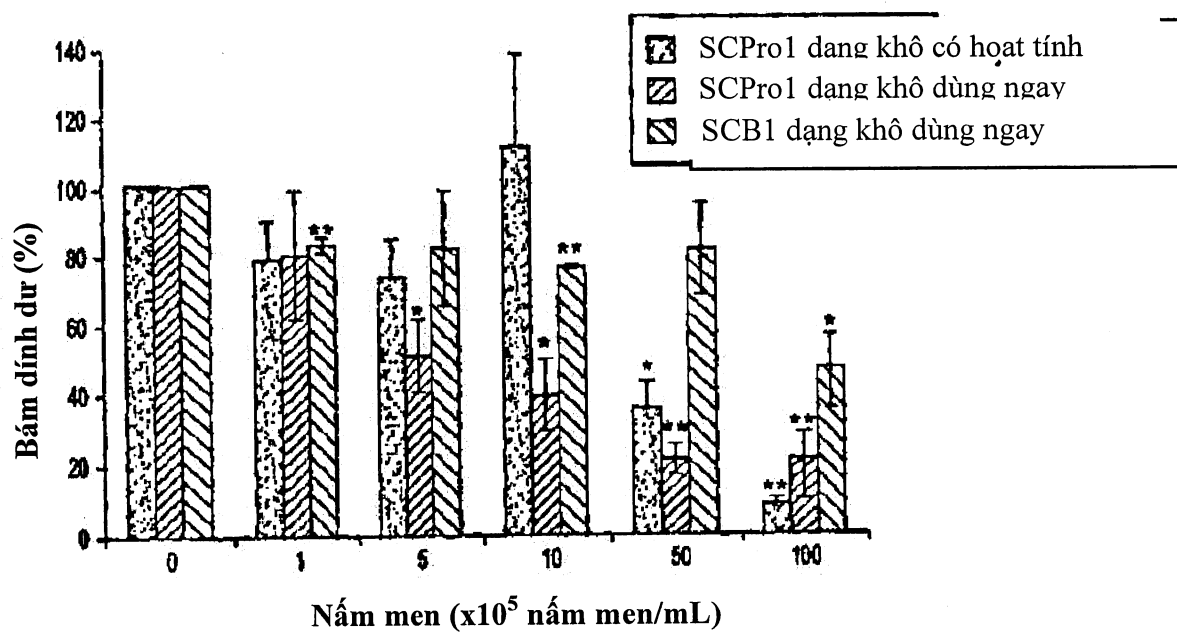


Fig. 19A

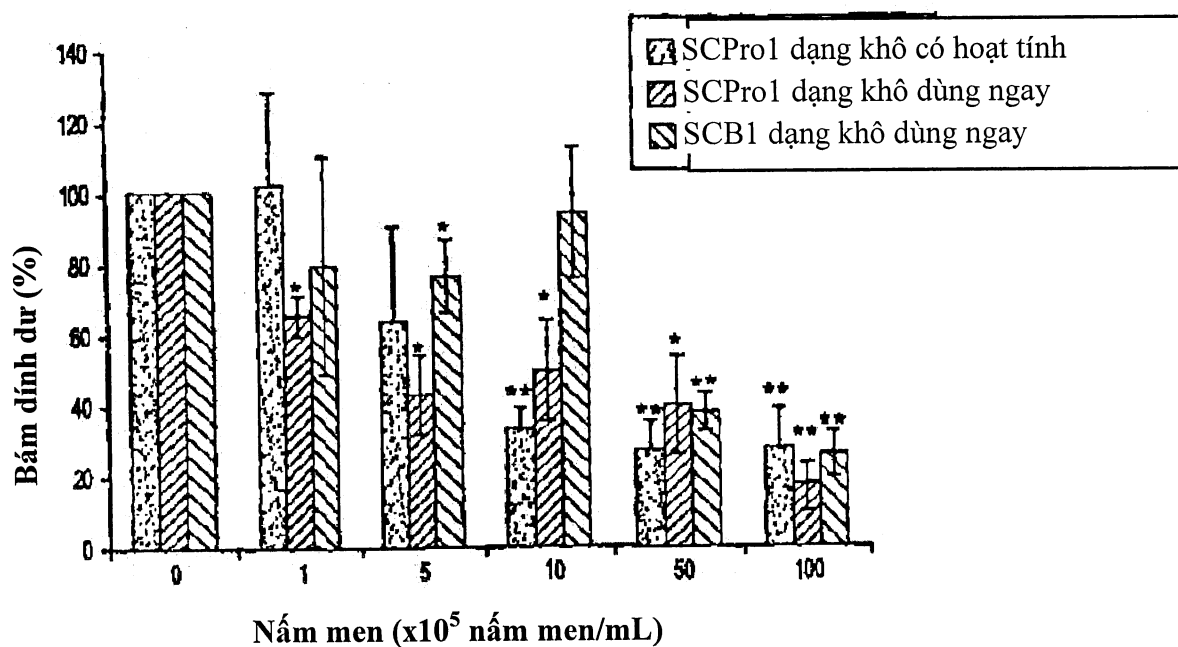
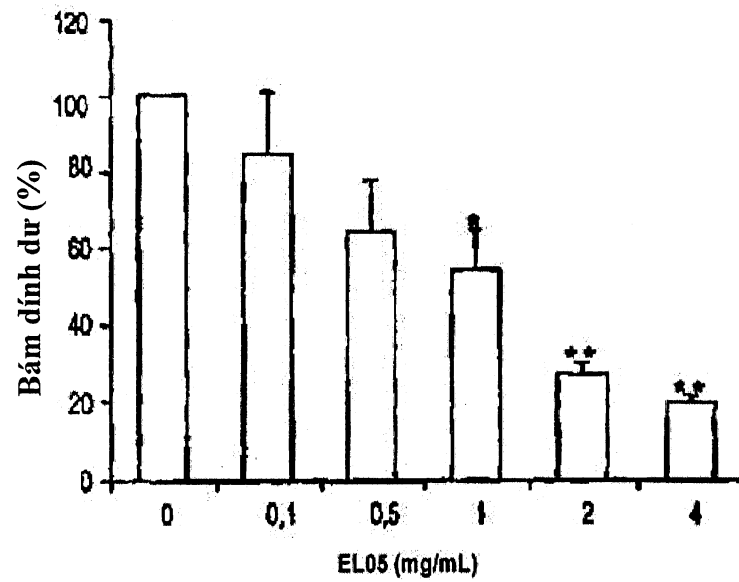
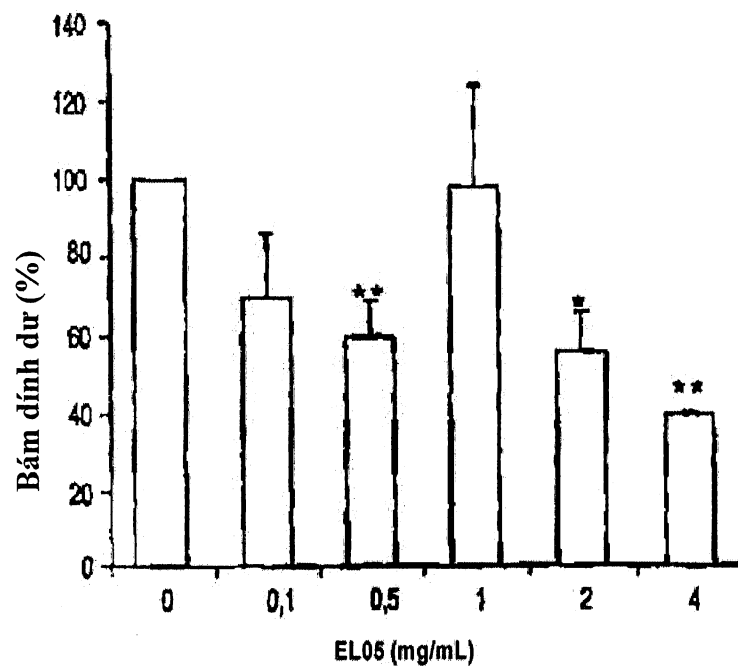


Fig. 19B

10/13

**Fig. 20A****Fig. 20B**

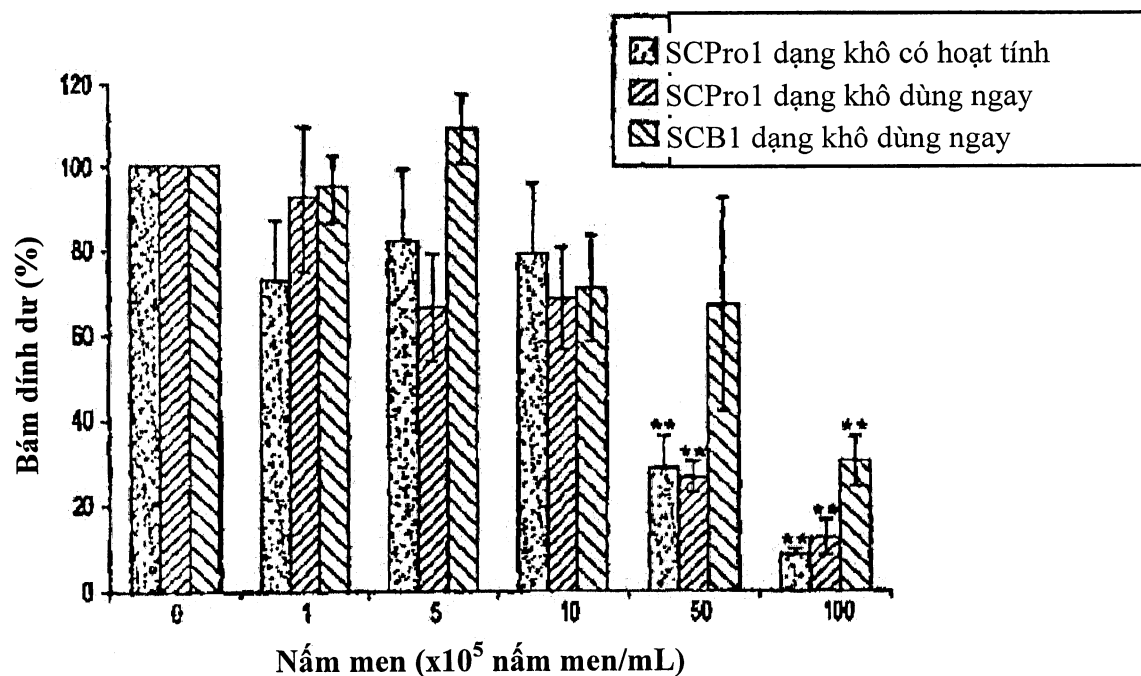


Fig. 21A

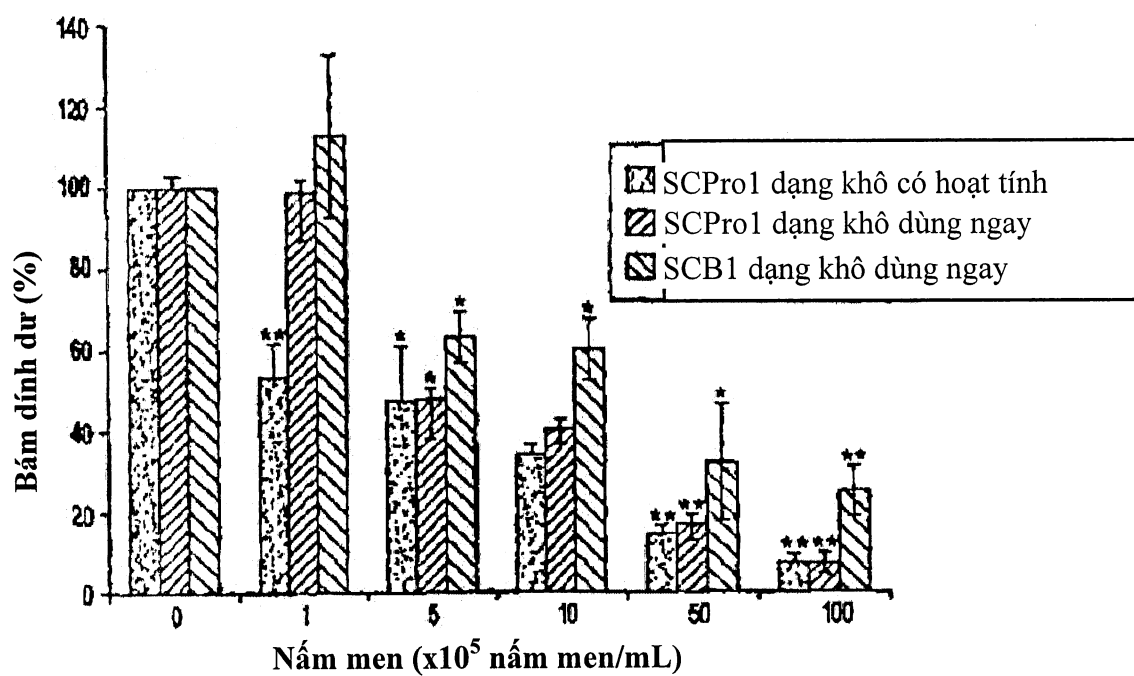


Fig. 21B

12/13

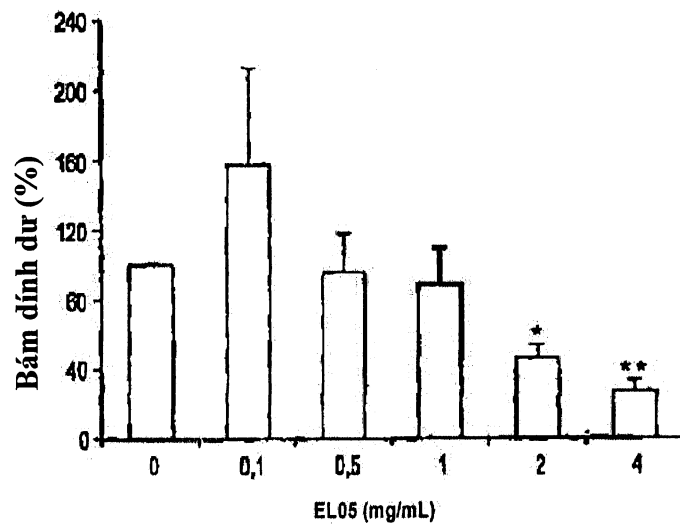


Fig. 22A

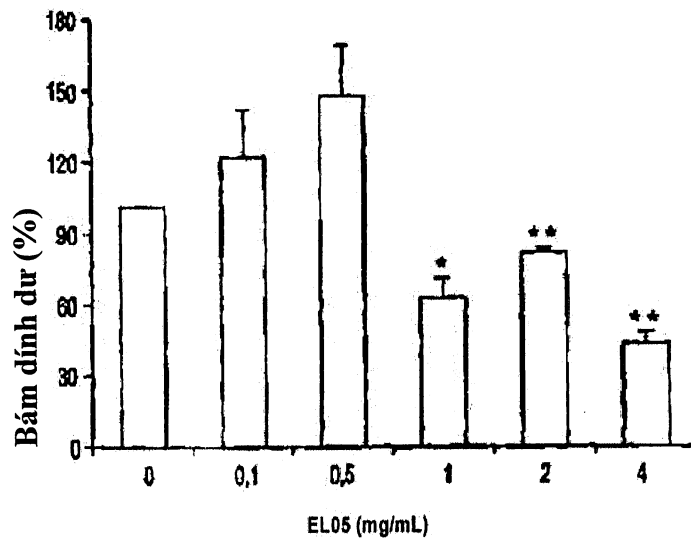


Fig. 22B

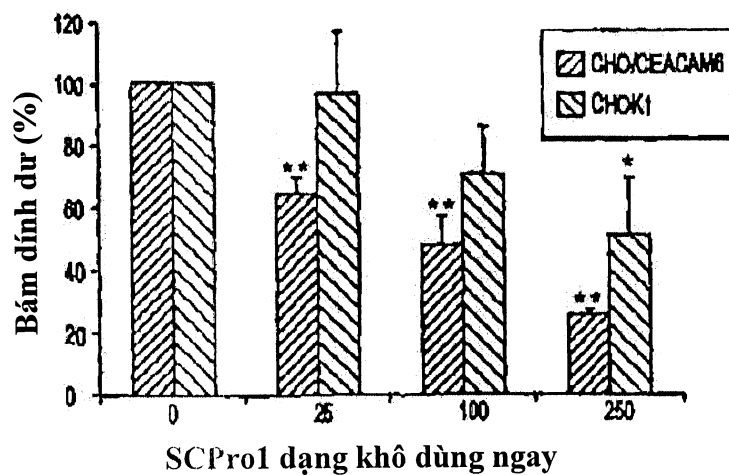


Fig. 23



13/13

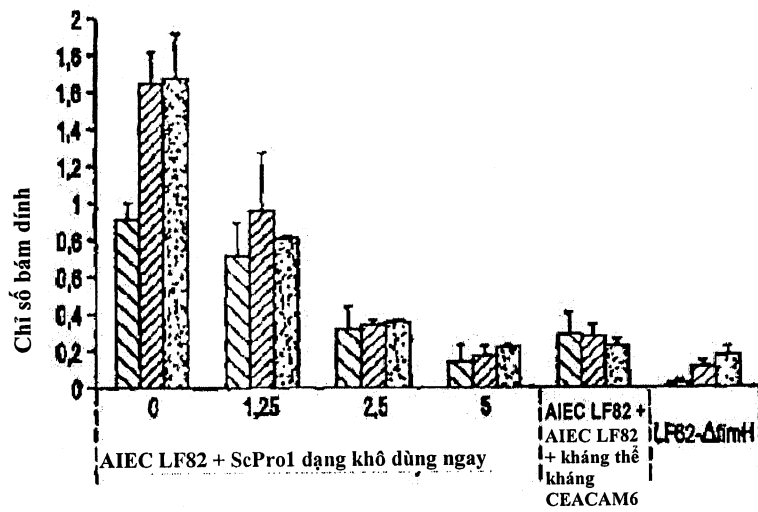


Fig. 24

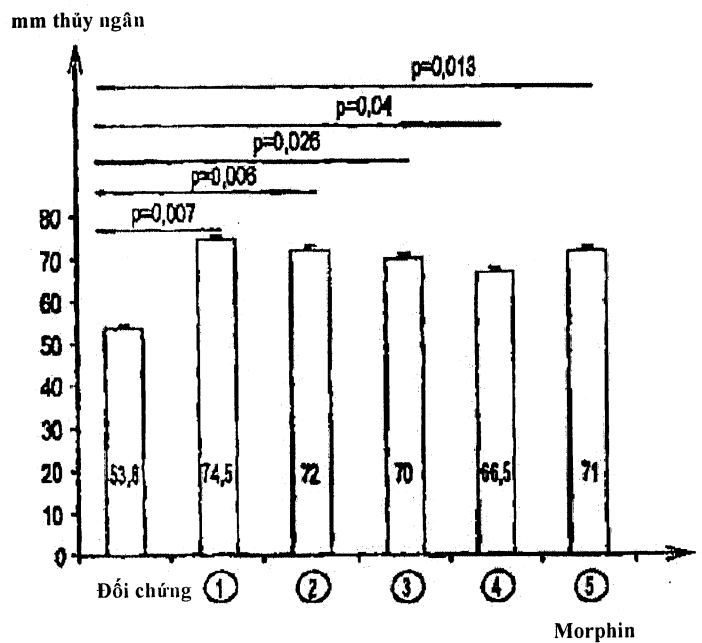


Fig. 25

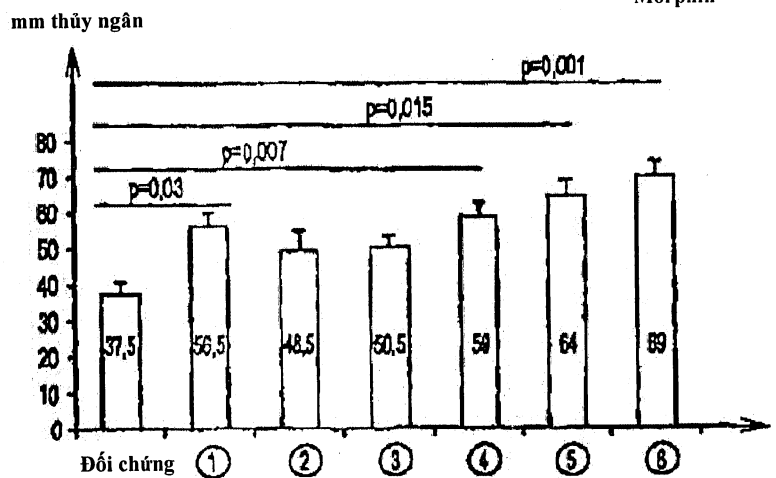


Fig. 26