

NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ CỦA VIÊN NANG ALGAL OIL OMEGA 3-6 GIÀU DHA, EPA, DPA TỪ DẦU VI TẢO BIỂN DỊ DƯỠNG *Schizochytrium mangrovei* TB17 TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

Lê Thị Thom^{1,2}, Nguyễn Hoàng Ngân³, Đặng Diễm Hồng^{1,2*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST, Việt Nam

³Học viện Quân y, Việt Nam

TÓM TẮT: Trong những năm gần đây, sinh khối vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei* đã được chứng minh là giàu các axit béo omega 3-6, chủ yếu là axit docosaheptaenoic (DHA), ecosapentanoic (EPA) và docosapentanoic (DPA). Các axit béo này có vai trò quan trọng đối với sức khỏe con người. Trong công bố này, kết quả nghiên cứu về tính an toàn và tác dụng dược lý của viên Algal Oil Omega 3-6 (AOO-3-6) được tạo ra từ dầu vi tảo biển dị dưỡng *S. mangrovei* TB17 lên chuột thí nghiệm sau 90 ngày sử dụng đã được trình bày. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp không tìm thấy giá trị LD₅₀ khi chuột nhất trắng uống với mức liều cao nhất, 15,27 g tổng DHA, EPA, DPA/kg trọng lượng cơ thể/ngày (mức liều cao gấp 113,63 lần so với liều dùng trên chuột) cho thấy viên AOO-3-6 không độc. Khi cho chuột cống trắng uống viên AOO-3-6 liên tục trong 90 ngày với mức liều tổng DHA, EPA và DPA là 78,4 và 352,8 mg/kg trọng lượng cơ thể/ngày không ảnh hưởng đến tình trạng chung, thể trọng, chỉ số huyết học, chỉ tiêu sinh hóa; chức năng của gan, thận; mô bệnh học gan, thận, lá lách của chuột cống trắng. Ngoài ra, chuột nhất trắng sử dụng các liều có tổng DHA, EPA và DPA là 134,4 và 403,2 mg/kg trọng lượng cơ thể/ngày có tác dụng cải thiện khả năng học tập, trí nhớ ở chuột, giúp chuột hình thành và bền vững phản xạ tìm thức ăn trong mê lộ nhanh hơn, với thời gian phản xạ ngắn hơn. Như vậy, viên nang AOO-3-6 an toàn và có khả năng cải thiện trí nhớ, khả năng học tập trên chuột, đảm bảo cho phép sử dụng làm thực phẩm chức năng cho sức khỏe con người.

Từ khóa: *Schizochytrium mangrovei*, AOO-3-6, bán trường diễn, độc tính cấp, DHA, EPA, DPA.

MỞ ĐẦU

Viên thực phẩm chức năng Algal Oil Omega 3-6 (AOO-3-6) từ dầu vi tảo biển dị dưỡng *Schizochytrium mangrovei* có chứa chủ yếu axit docosaheptaenoic (DHA; C22: 6 ω -3), axit ecosapentanoic (EPA; C20: 5 ω -3) và axit docosapentanoic (DPA; C22:5 ω -6). Các axit béo này có tác dụng quan trọng đối với sức khỏe con người như thúc đẩy sự phát triển của hệ thần kinh trung ương ở trẻ sơ sinh (Medina et al., 1999), giúp phòng ngừa các bệnh tim mạch (Meyer & Groot, 2017) và kháng viêm (Berger et al., 2012; Zárate et al., 2017), làm chậm quá trình lão hoá (SanGiovanni et al., 2005). Tuy nhiên, trong cơ thể con người việc tổng hợp DHA là rất hạn chế. Do đó, các axit béo này chủ yếu được cung cấp từ các nguồn thực phẩm (Plourde & Cunnane, 2007; Roos et al., 2009).

Cơ thể con người cũng chỉ hấp thu được một lượng nhất định các axit béo này sẽ tốt cho

sức khỏe. Theo khuyến cáo của các tổ chức toàn cầu lượng EPA và DHA tối thiểu nên tiêu thụ khoảng 300 mg/ngày, trong đó 200 mg/ngày là DHA. Đối với phụ nữ có thai và cho con bú có thể lên đến 700–1000 mg EPA và DHA/ngày (Global Organization, 2015). Đặc biệt, Tổ chức lương thực thế giới (FAO) của Liên Hợp Quốc cùng với Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và Cơ quan An toàn Thực phẩm châu Âu (EFSA) khuyến nghị sử dụng ít nhất 250 mg EPA và DHA/ngày, chính phủ Anh đặt ra là 450 mg EPA và DHA/ ngày đối với người lớn (FAO, 2010; Agostoni et al., 2010; Scientific Advisory Committee on Nutrition, 2004); 450–500 mg EPA và DHA/ ngày cho người trưởng thành (Zárate et al., 2017); 500 mg DHA/ngày (Meyer & Groot, 2017).

Fedorova-Dahms et al., (2011) đã đánh giá tác dụng của dầu tảo (chứa 37% DHA và 16% EPA so với axit béo tổng số) tách chiết từ

Schizochytrium sp. với mức liều 3250 mg/kg trọng lượng cơ thể (TLCT) /ngày trên chuột đực và cái. Mức liều này tương đương với lượng 30 g/ngày/người có trọng lượng 60 kg. Ở mức liều 4000 mg/kg TLCT/ngày đã không quan sát thấy bất cứ một tác dụng phụ nào lên cơ thể chuột thử nghiệm đã cho thấy dấu tảo từ *Schizochytrium* sp. có độ an toàn cao (Hammond et al., 2001).

Hoàng Lan Anh và nnk., (2008) đã đánh giá tính an toàn và tác dụng dược lý của chế phẩm Algal Omega-3 tạo ra từ sinh khối *S. mangrovei* giàu DHA trên động vật thực nghiệm. Trong nghiên cứu này, mức độ an toàn và tác dụng dược lý của viên nang AOO-3-6 từ dầu tảo *S. mangrovei* giàu DHA, EPA và DPA trên động vật thực nghiệm đã được nghiên cứu để cung cấp cơ sở khoa học cho phép sử dụng viên nang AOO-3-6 làm thực phẩm chức năng cho con người.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chế phẩm

Viên thực phẩm chức năng AOO-3-6 được tạo ra từ dầu vi tảo biển dị dưỡng *S. mangrovei* (chủng TB17), có khối lượng 700 mg/viên, chứa 200 mg dầu tảo, trong đó tổng hàm lượng DHA, EPA, DPA là 140 mg và hàm lượng axit béo không bão hòa đa nối đôi omega 3-6 là 160 mg. Viên nang mềm có màu vàng đậm thể tích thực $0,55 \pm 0,03$ mL/viên.

Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng (CNT) trưởng thành, dòng *Swiss*, không phân biệt giống, khối lượng 18–22 g/con; chuột cống trắng (CCT) trưởng thành, dòng *Wistar*, không phân biệt giống, trọng lượng 160–180 g/con do Ban chăn nuôi động vật thí nghiệm, Học viện Quân Y cung cấp. Chuột được nuôi trong phòng nuôi động vật thí nghiệm một tuần trước khi nghiên cứu bằng thức ăn chuẩn dành cho động vật nghiên cứu, nước sạch uống tự do.

Nghiên cứu độc tính cấp của viên AOO-3-6

Độc tính cấp và giá trị LD₅₀ được xác định theo phương pháp của Litchfield-Wincxon (Đỗ Trung Đàm, 2001; 2014) theo qui định của Bộ Y tế Việt Nam (Bộ Y Tế, 2007), hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD)

(OECD, 2002) và của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2000).

Trước khi thí nghiệm chuột nhịn ăn 12 giờ, cho uống nước bình thường. Sau đó, cho chuột uống chế phẩm với các mức liều tăng dần bằng cách đưa thẳng vào dạ dày bằng kim công đầu tù.

CNT gồm 48 con, chia ngẫu nhiên thành 6 lô (8 con/lô). Các lô được cho uống chế phẩm với liều tăng dần từ 15, 24, 33, 42, 51 và 60 mL/kg, tương ứng với các mức liều 3,82; 6,11; 8,40; 10,69; 12,98 và 15,27 g (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày. Sau khi uống, tiến hành theo dõi tình trạng chung (vận động, bài tiết,...) và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ và đến hết ngày thứ 7 sau khi uống chế phẩm lần đầu. Tiến hành phân tích tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết để xác định nguyên nhân gây độc.

Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của viên AOO-3-6

Độc tính bán trường diễn của viên AOO-3-6 được đánh giá theo qui định của Bộ Y tế Việt Nam (Bộ Y Tế, 2007), hướng dẫn của Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) (OECD, 2002) và của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2000).

CCT gồm 24 con, được chia ngẫu nhiên thành 3 lô (8 con/lô) như sau.

Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày.

Lô trị 1: uống chế phẩm liều 78,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng).

Lô trị 2: uống chế phẩm liều 352,8 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 4,5 lần liều ở lô trị 1).

Chuột được uống nước hoặc thuốc trong 90 ngày liền, mỗi ngày một lần vào buổi sáng. Các thông số theo dõi được kiểm tra vào trước lúc uống thuốc (D0), ngày thứ 45 (D45) và ngày thứ 90 (D90) của nghiên cứu.

Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu

Tình trạng chung, thể trọng của chuột; Đánh giá chức phận tạo máu thông qua số lượng hồng cầu, thể tích trung bình hồng cầu, hàm lượng

hemoglobin, hematocrit, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và số lượng tiểu cầu; Đánh giá chức năng gan thông qua định lượng một số enzym và chất chuyển hoá trong máu: ALT (Alanine transaminase), AST (Aspartate transaminase), albumin và cholesterol toàn phần; Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ creatinin huyết thanh và giải phẫu mô bệnh học: Sau 90 ngày uống thuốc, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan. Kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, lách, thận của ít nhất 30% số chuột ở mỗi lô. Các xét nghiệm vi thể được thực hiện tại Bộ môn khoa Giải phẫu bệnh-Pháp y, Bệnh viện Quân y 103.

Nghiên cứu tác dụng tăng cường khả năng học tập và ghi nhớ của viên AOO-3-6

Tác dụng tăng cường khả năng học tập và ghi nhớ của viên dầu tảo trên mô hình tìm thức ăn trong mê lộ ở CNT được tiến hành theo phương pháp được Nguyễn Liêm và nnk. (2002) mô tả.

CNT gồm 24 con, chia ngẫu nhiên thành 3 lô, 8 con/lô. Lô 1 (chứng sinh lý): uống nước muối sinh lý liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày. Lô 2 (trị 1): uống chế phẩm liều 134,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng). Lô 3 (trị 2): uống chế phẩm liều 403,2 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 3 lần liều ở lô trị 1).

Tiến hành các thí nghiệm như sau:

Tiến hành thành lập phản xạ có điều kiện trên CNT: sau khi cho chuột uống thuốc 5 ngày thì cho uống tiếp 5 ngày nữa (tổng thời gian chuột uống thuốc là 10 ngày liên tục) để thành lập phản xạ. Cho chuột nhịn ăn qua đêm và tập phản xạ vào các buổi sáng. Đặt chuột ở cửa vào và dẫn dắt chuột tới đích, nơi có thức ăn. Mỗi ngày tập 3 lần, mỗi lần cách nhau 5 phút. Tập đến khi nào đặt chuột ở cửa vào và chuột chạy một mạch tới đích, không quay lại, không nhائم vào ngõ cụt, tức phản xạ đã hình thành và được xem là bền vững.

Tiến hành dập tắt phản xạ: sau khi phản xạ đã được bền vững bằng cách tiếp tục cho chuột chạy trong mê lộ, nhưng ở đích không để thức ăn. Khi nào 3 lần thả chuột liên tiếp ở điểm xuất

phát chuột không chạy tới đích nữa thì xem như phản xạ đã bị dập tắt.

Theo dõi các chỉ số sau:

Tốc độ hình thành phản xạ được biểu hiện bằng số lần tập để chuột chạy từ điểm xuất phát đến đích mà không nhائم đường;

Tốc độ có phản xạ bền vững được tính bằng số lần tập để có 3 lần liên tiếp chuột chạy từ điểm xuất phát đến đích mà không nhائم đường, không quay lại;

Thời gian phản xạ là thời gian chuột chạy từ điểm xuất phát đến đích;

Tốc độ dập tắt phản xạ được tính bằng số lần không cho chuột ăn (không cung cố) khi chuột tới đích, đến khi chuột không chạy tới nơi để thức ăn nữa.

Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y sinh học, so sánh bằng Anova test sử dụng phần mềm SPSS 16.0. Số liệu được biểu diễn dưới dạng $\bar{x} \pm SD$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Độc tính cấp của viên AOO-3-6

Kết quả nghiên cứu về độc tính cấp của viên nang dầu tảo AOO-3-6 được trình bày ở bảng 1. Kết quả cho thấy CNT uống viên AOO-3-6 với các mức liều khác nhau từ liều thấp nhất là 15 mL/kg (3,82 g DHA, EPA, DPA/kg TLCT) đến mức liều cao nhất 60 mL/kg (15,27 g DHA, EPA, DPA/kg TLCT) chuột có thể uống nhưng không có chuột nào chết.

Từ mức liều 33 mL/kg đến mức liều 60 mL/kg TLCT, chuột có biểu hiện phân nát vài giờ đầu sau uống thuốc thử sau đó trở lại bình thường. Ở mức liều thấp hơn, hầu hết các chuột đều có phân bình thường. Quan sát không thấy xuất hiện triệu chứng bất thường nào khác ở chuột trong 72 giờ sau uống thuốc lần cuối và trong suốt 7 ngày sau uống viên AOO-3-6.

Chuột đã dùng viên dầu tảo đến mức liều 60 mL/kg, gấp khoảng 113,63 lần mức liều dự kiến có tác dụng quy đổi ra trên CNT, mà không có chuột nào chết. Triệu chứng đi ngoài phân nát trong những giờ đầu ở những lô uống liều cao là triệu chứng thường gặp khi lượng thử quá lớn vào đường ruột, không phản ánh về độc tính của viên AOO-3-6. Kết quả nghiên cứu về độc tính

cấp đã không tìm được liều LD₅₀ chứng tỏ viên nang dầu tảo AOO-3-6 bảo đảm tính an toàn khi đánh giá độc tính cấp theo đường uống trong

24 giờ, khoảng an toàn điều trị của viên AOO-3-6 rộng. Như vậy, có thể kết luận viên dầu tảo AOO-3-6 giàu DHA, EPA, DPA không độc.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của viên nang dầu tảo AOO-3-6

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Thể tích cho uống mỗi lần × số lần	Tổng thể tích cho uống mL/ 1 kg chuột	Tổng hàm lượng DHA, EPA và DPA) cho chuột uống (g/kg TLCT)	Số chuột sống/chết sau 72 giờ
Lô 1	08	0,05 mL/10 g × 3 lần	15	3,82	08/0
Lô 2	08	0,08 mL/10 g × 3 lần	24	6,11	08/0
Lô 3	08	0,11 mL/10 g × 3 lần	33	8,40	08/0
Lô 4	08	0,14 mL/10 g × 3 lần	42	10,69	08/0
Lô 5	08	0,17 mL/10 g × 3 lần	51	12,98	08/0
Lô 6	08	0,20 mL/10 g × 3 lần	60	15,27	08/0

Ghi chú: TLCT - trọng lượng cơ thể

Độc tính bán trường diễn của viên AOO-3-6

Ảnh hưởng của viên nang dầu tảo AOO-3-6 lên tình trạng chung và sự thay đổi thể trọng của CCT khi dùng dài ngày

CCT được theo dõi hàng ngày về tình trạng chung gồm hoạt động, ăn uống, tình trạng lông, da, niêm mạc, chất tiết. Các chuột ở cả lô chứng và các lô dùng viên AOO-3-6 đều hoạt động bình thường. Chuột lông mượt, da niêm mạc bình thường, ăn uống bình thường, phân thành khuôn.

Ngoài đánh giá tình trạng chung của chuột ở các lô thí nghiệm, thể trọng của chuột cũng được tiến hành theo dõi (bảng 2). Kết quả thu

được cho thấy sau 90 ngày theo dõi, tất cả các lô thí nghiệm thể trọng của chuột đều tăng so với thời điểm trước thí nghiệm. Khi so sánh giữa các lô thí nghiệm tại cùng thời điểm nghiên cứu, thể trọng chuột của các lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 45 và 90 ngày lấy mẫu, chuột tăng cân đều giữa các lô thí nghiệm. Khi so sánh trong cùng lô giữa các thời điểm sau so với trước thấy thể trọng chuột của cả ba lô nghiên cứu đều tăng, sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với ($p < 0,01$). Như vậy, viên AOO-3-6 giàu DHA, EPA, DPA với các mức liều và thời gian sử dụng trong nghiên cứu không gây ảnh hưởng đến sự phát triển thể trọng của chuột.

Bảng 2. Ảnh hưởng của viên nang AOO-3-6 đối với trọng lượng cơ thể chuột (n = 10, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm xét nghiệm	Trọng lượng cơ thể (g)			p _{so} sánh giữa các lô
	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	
Trước thí nghiệm (a)	168,63 ± 5,24	169,25 ± 4,03	170,13 ± 4,36	p ₂₋₁ > 0,05 p ₃₋₁ > 0,05 p ₃₋₂ > 0,05
Sau 45 ngày (b)	194,88 ± 5,06	196,50 ± 4,57	197,75 ± 9,91	
Sau 90 ngày (c)	214,75 ± 5,63	215,63 ± 5,80	216,63 ± 10,94	
p _{so} sánh trong cùng lô	p _{b,c-a} < 0,01; p _{c-b} < 0,01			

Ghi chú: Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày; Lô trị 1: uống dầu tảo liều 78,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô trị 2: uống chế phẩm liều 352,8 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 4,5 lần liều ở lô trị 1); TLCT - trọng lượng cơ thể

Ảnh hưởng của viên AOO-3-6 giàu DHA, EPA và DPA lên một số chỉ tiêu huyết học của chuột

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của AOO-3-6 lên chức năng tạo máu của chuột thông qua một số chỉ tiêu huyết học của chuột thí nghiệm được trình bày ở các bảng 3. Kết quả thu được cho thấy khi cho chuột uống viên AOO-3-6 với các mức liều 78,4 và 352,8 mg DHA, DPA,

EPA/kg/ ngày liên tục trong 90 ngày, các chỉ số huyết học trong máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê giữa các lô chứng và thực nghiệm cũng như giữa các lô thực nghiệm với nhau ($p > 0,05$). Như vậy, viên nang AOO-3-6 sử dụng với các mức liều và thời gian khác nhau trong nghiên cứu đã không làm thay đổi các chỉ tiêu chức năng tạo máu của chuột.

Bảng 3. Ảnh hưởng của viên nang AOO-3-6 lên một số chỉ tiêu huyết học của chuột (n = 08, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm xét nghiệm	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{so} sánh giữa các lô
Số lượng hồng cầu chuột ($\times 10^{12}$ /g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	8,42 ± 0,73	8,59 ± 1,11	8,18 ± 0,70	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	8,16 ± 1,94	8,76 ± 2,46	8,22 ± 2,55	
Sau 90 ngày (c)	8,40 ± 1,54	8,65 ± 2,07	8,25 ± 0,50	
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-
Hàm lượng huyết sắc tố trong máu chuột (g/dL)				
Trước thí nghiệm (a)	134,75 ± 12,46	129,63 ± 10,51	133,63 ± 11,03	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	131,38 ± 5,13	128,38 ± 11,89	131,75 ± 20,60	
Sau 90 ngày (c)	132,88 ± 18,22	130,63 ± 9,80	133,88 ± 13,45	
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			
Hematocrit (%)				
Trước thí nghiệm (a)	42,38 ± 3,56	42,41 ± 4,65	41,04 ± 3,80	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	41,12 ± 3,45	42,70 ± 10,89	41,61 ± 12,38	
Sau 90 ngày (c)	42,75 ± 6,05	41,54 ± 6,45	41,29 ± 2,67	
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			
Thể tích trung bình hồng cầu (fl)				
Trước thí nghiệm (a)	50,25 ± 2,55	51,75 ± 5,60	50,13 ± 2,59	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	50,50 ± 6,00	50,88 ± 4,12	51,13 ± 3,00	
Sau 90 ngày (c)	51,25 ± 1,98	50,38 ± 7,96	50,50 ± 2,62	
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			
Số lượng bạch cầu (g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	653,63 ± 105,30	708,00 ± 130,59	627,50 ± 164,98	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	667,88 ± 109,12	692,38 ± 86,28	600,38 ± 197,29	
Sau 90 ngày (c)	673,88 ± 151,04	688,75 ± 244,82	626,25 ± 87,21	
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			
Số lượng tiểu cầu (g/L)				
Trước thí nghiệm (a)	653,63 ± 105,30	708,00 ± 130,59	627,50 ± 164,98	$p_{2-1} > 0,05$ $p_{3-2} > 0,05$ $p_{3-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	667,88 ± 109,12	692,38 ± 86,28	600,38 ± 197,29	
Sau 90 ngày (c)	673,88 ± 151,04	688,75 ± 244,82	626,25 ± 87,21	
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			

Ghi chú: Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày; Lô trị 1: uống dầu tảo liều 78,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô trị 2: uống chế phẩm liều 352,8 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 4,5 lần liều ở lô trị 1); TLCT - trọng lượng cơ thể

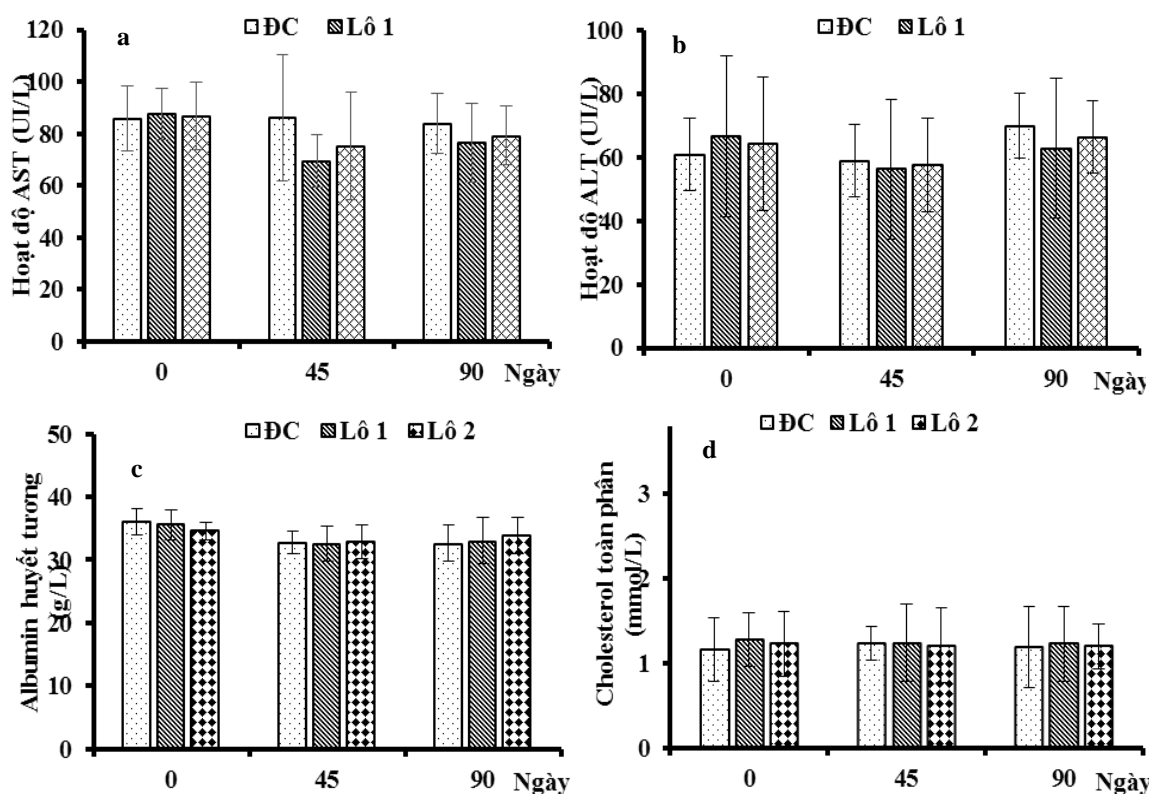
Đánh giá mức độ tổn thương tế bào gan và chức năng gan chuột khi dùng viên nang AOO-3-6 dài ngày

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của viên AOO-3-6 đến hoạt độ của các enzyme AST và ALT, albumin huyết thanh và cholesterol toàn phần của chuột trong thí nghiệm thu được thể hiện ở hình 1. Kết quả thu được cho thấy

trước khi thử nghiệm, hoạt độ của AST và ALT, albumin huyết tương và cholesterol toàn phần của chuột ở các lô chứng và 2 lô thí nghiệm đều không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Sau 90 ngày cho uống liên tục, ở lô trị 2 hoạt độ của AST ($79,13 \pm 11,32$ UI/L) và ALT ($66,38 \pm 11,29$ UI/L), hàm lượng albumin ($33,88 \pm 2,90$ g/L) và cholesterol huyết thanh ($1,20 \pm 0,26$ mmol/L) có sự thay đổi không đáng kể so với đối chứng.

Sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê sinh học ($p > 0,05$). Khi so sánh trong từng lô thí nghiệm giữa các thời điểm thí nghiệm, các chỉ số albumin và cholesterol toàn phần máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Từ các kết quả trên đã khẳng định, viên nang AOO-3-6 với các mức liều và thời gian sử dụng trong

thí nghiệm không làm thay đổi hoạt độ của AST và ALT, các chỉ số albumin và cholesterol toàn phần trong máu chuột thí nghiệm. Do đó, viên nang AOO-3-6 không gây tổn thương tế bào gan và không làm ảnh hưởng đến chức năng gan chuột trong thí nghiệm.



Hình 1. Ảnh hưởng của viên AOO-3-6 đối với hoạt độ AST (a) và ALT (b), hàm lượng Albumin huyết tương (c) và Cholesterol toàn phần (d)

Ghi chú: - Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày; Lô trị 1: uống dầu tảo liều 78,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô trị 2: uống chế phẩm liều 352,8 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 4,5 lần liều ở lô trị 1); TLCT - trọng lượng cơ thể

Đánh giá ảnh hưởng lên chức năng thận của chuột khi dùng viên AOO-3-6 dài ngày

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của viên nang AOO-3-6 sử dụng dài ngày lên chức năng của thận thông qua nồng độ creatinin huyết thanh được trình bày ở bảng 4. Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy, tại các thời điểm 45 và 90 ngày, các lô chuột thử nghiệm 1 và 2 và so sánh trong cùng một lô giữa các thời điểm thí nghiệm khác nhau đều có nồng độ creatinin máu chuột thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, viên AOO-3-6 với các mức liều và thời gian sử dụng trong thí nghiệm

(90 ngày) không làm thay đổi nồng độ creatinin trong máu chuột cho thấy chúng không ảnh hưởng lên chức năng thận của chuột.

Giải phẫu mô bệnh học gan, thận, lách của chuột

Sau 90 ngày theo dõi, tiến hành giải phẫu chuột cho thấy bằng mắt thường và dưới kính lúp có độ phóng đại 25 lần thấy màu sắc, hình thái của gan, thận, lách ở hai lô dùng viên dầu tảo không khác so với chứng (hình 2). Hình ảnh gan, thận, lá lách của chuột ở các lô trị 1 (hình 2b), lô trị 2 (hình 2c) có màu nâu đỏ thẫm đồng

đều, bề mặt nhẵn, không có u cục hoặc xuất huyết, có đàn hồi khi ấn xuống, không khác biệt so với hình ảnh gan, thận, lách của chuột ở lô chứng (hình 2a).

Kết quả nghiên cứu mô bệnh học gan, thận, lách chuột cho thấy viên dầu tảo dùng đường uống với liều 78,4 mg và liều 352,8 mg/kg/ngày liên tục trong 90 ngày, không gây tổn thương trên gan của chuột (hình 3).

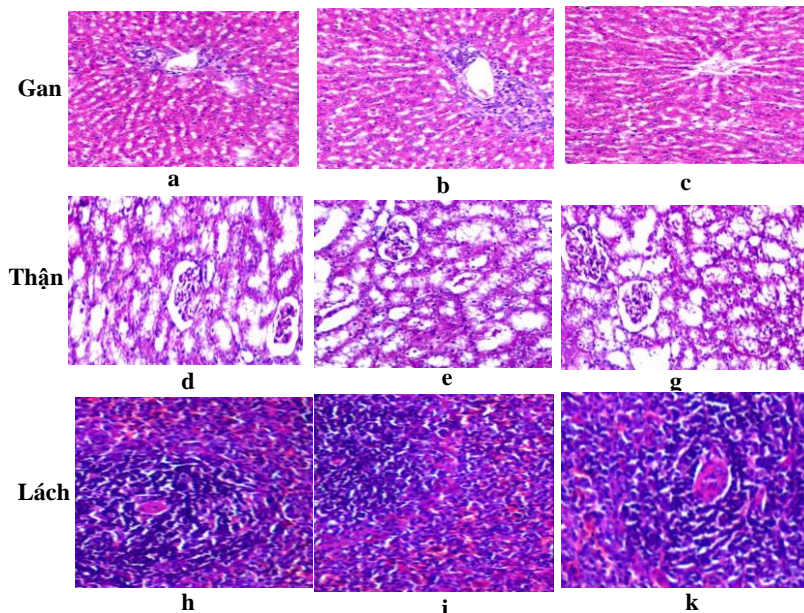
Bảng 4. Ảnh hưởng của viên nang AOO-3-6 lên nồng độ creatinin huyết thanh chuột (n = 08, $\bar{X} \pm SD$)

Thời điểm XN	Lô chứng (1)	Lô trị 1 (2)	Lô trị 2 (3)	P _{so} sánh giữa các lô
Creatinin (μmol/l)				
Trước thí nghiệm (a)	71,63 ± 30,35	71,50 ± 16,12	71,13 ± 23,49	$p_{2-1} > 0,05$
Sau 45 ngày (b)	66,50 ± 19,99	68,38 ± 7,25	67,75 ± 10,65	$p_{3-2} > 0,05$
Sau 90 ngày (c)	63,38 ± 27,84	62,38 ± 22,14	57,13 ± 13,82	$p_{3-1} > 0,05$
P _{so} sánh trong cùng lô	$p_{b,c-a} > 0,05; p_{c-b} > 0,05$			-

Ghi chú: Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày; Lô trị 1: uống dầu tảo liều 78,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô trị 2: uống chế phẩm liều 352,8 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 4,5 lần liều ở lô trị 1)



Hình 2. Hình ảnh đại thể gan, thận, lách chuột lô đối chứng (a), lô trị 1 (b) và lô trị 2 (c)



Hình 3. Hình ảnh mô bệnh học vi thể gan, thận, lách chuột sau 90 ngày uống thuốc lô đối chứng (a, d, h), lô trị 1 (b, e, i) và lô trị 2 (c, g, k), tương ứng (HE, × 400)

Ghi chú: Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày; Lô trị 1: uống dầu tảo liều 78,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô trị 2: uống chế phẩm liều 352,8 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 4,5 lần liều ở lô trị 1)

Kết quả hình 3 cho thấy vi thể gan, thận, lách dưới kính hiển vi với độ khuếch đại 400 lần của chuột ở lô trị 1 (hình 3b, e, i) và lô trị 2 (hình 3 c, g, k) không có khác biệt so với hình ảnh vi thể gan, thận, lách chuột ở lô chứng (hình 3a, d, h). Cấu trúc các bè gan bình thường, không thấy hình ảnh hoại tử, thoái hóa tế bào gan. Cấu trúc các tế bào ống thận và các vùng chức năng khác của thận bình thường. Trên hình ảnh lách thấy vùng tủy trắng bất màu xanh thẫm, tập trung các nang lympho lớn. Vùng tủy đỏ có màu xanh đỏ, với các xoang nang chứa nhiều hồng cầu và một số đại thực bào. Không thấy ô xuất huyết hoặc hoại tử.

Như vậy, có thể kết luận viên dầu tảo AOO-3-6 giàu DHA, EPA, DPA an toàn. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với một số sản phẩm đã được thương mại hóa như DHASCO™ (dầu từ chi *Cryptocodinium*), DHASCO®-S (dầu từ *Schizochytrium* sp.), các sản phẩm này có hàm lượng DHA khoảng 350 mg/g dầu và đã được kiểm tra tính an toàn trên chuột cống hay thỏ trong 13 tuần. Bột tảo đã được trộn vào thức ăn của chuột với mức liều 4000 mg/kg TLCT/ngày đã không quan sát thấy độc tính đối với cơ thể. Ở thỏ, không qua sát thấy độc tính đối với cơ thể thỏ mẹ khi cho ăn bột tảo ở mức liều 600 mg/kg TLCT/ngày (Martek, 2003).

Tác dụng tăng cường trí nhớ của viên dầu tảo AOO-3-6 ở chuột thí nghiệm

Kết quả đánh giá tốc độ hình thành phản xạ được đánh giá bằng thời gian để CNT chạy tới đích mà không dừng lại ở dọc đường sau khi uống AOO-3-6 liên tục trong 10 ngày. Kết quả bảng 5 cho thấy, so sánh về tốc độ hình thành phản xạ: số lần tập để hình thành phản xạ và thời gian phản xạ (khi đã hình thành phản xạ) hay tốc độ dập tắt phản xạ có điều kiện của chuột ở các lô dùng AOO-3-6 ở cả 2 mức liều đều ngắn hơn so với lô uống nước muối sinh lý (lô chứng). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). So sánh giữa lô dùng liều 1 và liều 2, sự khác biệt giữa 2 lô chưa có ý nghĩa thống kê ($p_{3-2} > 0,05$). Khi so sánh tốc độ để phản xạ bền vững: số lần tập để hình thành phản xạ bền vững và thời gian phản xạ (khi phản xạ đã bền vững) của chuột ở các lô dùng AOO-3-6 ở cả 2 mức liều đều tốt hơn so với lô uống nước muối sinh lý. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). So sánh giữa lô dùng liều 1 và liều 2, sự khác biệt giữa 2 lô chưa có ý nghĩa thống kê ($p_{3-2} > 0,05$).

Như vậy, viên nang AOO-3-6 có tác dụng cải thiện khả năng học tập, ghi nhớ ở chuột, giúp chuột hình thành, bền vững phản xạ và dập tắt nhanh phản xạ khi không còn yếu tố củng cố để tìm thức ăn trong mê lộ nhanh hơn, với thời gian phản xạ ngắn hơn.

Bảng 5. Tốc độ hình thành phản xạ có điều kiện, tốc độ dập tắt phản xạ có điều kiện tìm thức ăn trong mê lộ của các lô chuột nghiên cứu (n = 8)

Lô thí nghiệm	Tốc độ hình thành phản xạ		Tốc độ để phản xạ bền vững		Số lần không củng cố để dập tắt phản xạ
	Số lần tập	Thời gian phản xạ (s)	Số lần tập	Thời gian phản xạ (s)	
Chứng sinh lý (1)	19,88 ± 2,03	39,85 ± 4,67	48,88 ± 3,04	33,14 ± 3,72	15,63 ± 3,07
Lô trị 1 (2)	16,25 ± 3,85	35,15 ± 2,93	43,13 ± 6,08	27,59 ± 5,36	12,13 ± 2,42
Lô trị 2 (3)	15,63 ± 3,36	34,19 ± 2,84	40,63 ± 7,95	26,74 ± 5,42	11,75 ± 2,12
p	$p_{2-1} < 0,05$; $p_{3-1} < 0,05$; $p_{3-2} > 0,05$				

Ghi chú: Lô chứng: uống nước cất liều 1,00 mL/kg TLCT/ngày; Lô trị 1: uống dầu tảo liều 134,4 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (liều dự kiến có tác dụng); Lô trị 2: uống chế phẩm liều 403,2 mg (DHA, EPA, DPA)/kg TLCT/ngày (gấp 3 lần liều ở lô trị 1)

KẾT LUẬN

Chưa tìm thấy giá trị LD₅₀ của viên dầu tảo AOO-3-6 (ở mức liều 63,63 g (DHA, EPA, DPA)/kg trọng lượng cơ thể) theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Ở chuột cống trắng cho uống viên dầu tảo AOO-3-6 ở các mức liều 78,4 mg và 352,8 mg DHA, EPA, DPA/kg

trọng lượng cơ thể/ngày liên tục trong 90 ngày đảm bảo an toàn, không làm thay đổi các chỉ số huyết học, không làm tổn thương tế bào gan, chức năng gan và thận ở chuột thí nghiệm. Viên dầu tảo ở hai mức liều có tổng hàm lượng DHA, EPA và DPA là 134,4 và 403,2 mg/kg trọng lượng cơ thể/ngày đã có tác dụng cải thiện khả năng học tập, ghi nhớ ở chuột, giúp chuột

hình thành và bền vững phân xạ tìm thức ăn trong mê lộ nhanh hơn với thời gian phân xạ ngắn hơn và khả năng dập tắt phân xạ khi không còn yếu tố củng cố là nhanh hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Authority E. F. S., Agostoni C., Bresson J., Fairweather-Tait S., Flynn A., Golly I., Korhonen H., Lagiou P., Løvik M., Marchelli R., Martin M., Moseley B., Neuhäuser-Berthold M., Przyrembel H., Salminen S., Sanz Y., Sean J. J., 2010. Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3): 1461.
- Berger M. M., Delodder F., Liaudet L., Tozzi P., Schlaepfer J., Chiolerio R.L., Tappy L., 2012. Three short perioperative infusions of n-3 PUFAs reduce systemic inflammation induced by cardiopulmonary bypass surgery: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 97(2): 246–254.
- Bộ Y Tế, 2007. Quyết định số 01/2007/QĐ-BYT về việc ban hành “Quy định về thử thuốc trên lâm sàng.
- Đỗ Trung Đàm, 2001. Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm. *Tạp chí Dược học*, 2(298):7–9.
- Đỗ Trung Đàm, 2014. Phương pháp xác định độc tính của thuốc. *Nxb. Y học*, 264tr.
- FAO, 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO. Food. Nutr. Pap.*, 1: 1–166.
- Fedorova Dahms I., Marone P. A., Bailey Hall E., Ryan A. S., 2011. Safety evaluation of Algal Oil from *Schizochytrium* sp. *Food. Chem. Toxicol.*, 49(1): 70–77.
- Global Organization for EPA and DHA Omega-3s., 2015. Global recommendations for EPA and DHA intake, p.17.
- Hammond B. G., Mayhew, D. A., Naylor M. W., Ruecker F. A., Mast R.W., Sander W. J., 2001. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. Part I. Subchronic rat feeding study. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 33(2): 192–204.
- Hoàng Lan Anh, Nguyễn Huy Nam, Vũ Mạnh Hùng và Đặng Diễm Hồng, 2008. Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng dược lý của chế phẩm Algal Omega-3 từ sinh khối vi tảo biển *S. mangrovei* giàu DHA trên động vật thực nghiệm. *Tạp chí Hóa học*, 46(5A): 91–97.
- Martek Biosciences Corporation, 2003. GRAS exemption claim for DHA algal oil derived from *Schizochytrium* sp. as a source of DHA for use in foods: 6480 Dobbin Road Columbia, Maryland 21045; www. Martekbio.com.
- Medina A. R., Cerdán L. E., Giménez A. G., Páez B. C., González M. J. I., Grima E. M., 1999. Lipasecatalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *J. Biotechnol.*, 70(1-3): 379–391.
- Meyer B. J., de Groot R. H., 2017. Effects of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on cardiovascular mortality: the importance of the dose of DHA. *Nutrients*, 9(12): 1305.
- Nguyễn Liêm, Đỗ Công Huỳnh, Triệu Duy Diệt, Nguyễn Bích Luyện, Trần Cẩm Vinh, Trịnh Thị An, 2002. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa, chống đông máu và một số tác dụng đối với hệ thần kinh trung ương của cây đờ ngon. *Tạp chí Dược liệu*, số 2/2002.
- OECD, 2002. Drug Safety Evaluation I: Acute and subchronic toxicity assesment. USA Academy Press.
- Plourde M., Cunnane S. C., 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 32(4): 619–634.
- Roos B., Mavrommatis Y., Brouwer I. A., 2009. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. *Brit. J. Pharmacol.*, 158(2): 413–428.
- SanGiovanni J. P., Chew E. Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty

- acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.*, 24(1): 87–138.
- Scientific Advisory Committee on Nutrition., 2004. Advice on fish consumption: benefits and risks. Stationery office. TSO, Norwich, ISBN 0 11 243083 X. <https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/fshre-port200401.pdf>.
- World Health Organization - WHO., 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, Geneva, Switzerland 2000.
- Zárate R., El Jaber- Vazdekis N., Tejera N., Pérez J. A., Rodríguez C., 2017. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Transl. Med.*, 6(1): 25.

SAFETY ASSESSEMENT AND PHARMACOLOGICAL EFFECT OF ALGAL OIL OMEGA 3-6 CAPSULE RICH IN DHA, DPA, EPA FROM OIL OF HETEROTROPHIC MARINE MICROALGA *Schizochytrium mangrovei* TB17 ON THE EXPERIMENTAL ANIMALS

Le Thi Thom^{1,2}, Nguyen Hoang Ngan³, Dang Diem Hong^{1,2*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Vietnam Military Medical University

SUMMARY

Recently, heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* has been shown to be rich in omega 3-6 fatty acids, mainly docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentanoic acid (EPA) and docosapentanoic acid (DPA). These fatty acids play an important role on human health.

In this article, we presented results of safety assessment and pharmacological effect of Algal Oil Omega 3-6 (AOO-3-6) which made from oil of *S. mangrovei* TB17 on the experimental animals after 90 days of use. The results of acute toxicity study showed that by oral administration of the AOO-3-6 on white mice at the highest dose of 15.27 g total of DHA, EPA, DPA/kg of whole body of mice/ day (the dosage was 113.63 times higher than the mice dose), the LD₅₀ was not determined. It means that AOO-3-6 capsules was no signs toxicity. At doses of 78.4 mg and 352.8 mg of total of DHA, EPA, DPA/ kg of whole body of rat/ day (effective dose and 4.5 times higher than the expected dose) for 90 continuous days on the mice didn't affect the normal increment of body weight, hematological indices, biochemical indicators; function of liver and kidney; histopathology of liver, kidney, spleen of white rats. At the same time, at doses of 134.4 and 403.2 mg total of DHA, EPA and DPA/kg of body weight/day improved the ability to learn, remember on the mice. In addition, it also allowed building its reflexes sustainability in finding food to be faster with shorter reflectance time. As a result, AOO-3-6 capsules are safe and have the ability to improve memory, learning ability on the mouse which can be used for functional food for human health.

Keywords: *Schizochytrium mangrovei*, acute toxicity, AOO-3-6, DPA, DHA, EPA, subchronic toxicity.

Citation: Le Thi Thom, Nguyen Hoang Ngan, Dang Diem Hong, 2018. Safety assessment and pharmacological effect of algal oil omega 3-6 capsule rich in DHA, DPA, EPA from oil of heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* TB17 on the experimental animals. *Tap chi Sinh hoc*, 40(2): 193–202. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.12730>.

*Corresponding author email: ddhong60vn@yahoo.com

Received 9 July 2018, accepted 20 August 2018