한국어병학회지 제32권 제1호 (2019)
J. Fish Pathol., 32(1) : 021~028

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2019.32.1.021

항산화물질 N-acetylcysteine (NAC)이 메기에서 비특이적 면역지표인 화학발광 반응에 미치는 영향

박관하[†] · 이한나 · 안재영 · 배준성 · 이채원 · 양찬영 · 최상훈

군산대학교 해양과학대학 해양생명의학과

Effects of N-acetylcysteine (NAC) on chemiluminescence response as a non-specific immune parameter in Far Eastern catfish *Silurus asotus*

Kwan Ha Park[†], Han-Na Lee, Jae-Young An, Jun Sung Bae, Chae Won Lee, Chan Young Yang and Sang-Hoon Choi

Departments of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University

It has been reported that various anti-oxidant substances stimulate non-specific immune responses in fishes. In this study it was examined whether *N*-acetylcysteine (NAC), a precusor for anti-oxidant glutathione (GSH) synthesis, can modulate non-specific immune function in Far Eastern catfish *Silurus asotus*. Immune functions were assessed using the respiratory burst activity monitored by chemiluminescence (CL) responses in isolated leucocyte. NAC stimulated CL responses with doses of 10 or 100 mg/kg, but not with 1 mg/kg after 48 hr injection. It was observed with 10 mg/kg NAC that CL activity continued to elevate from 24 hr through 96 hr post-dosing, and returned to the near pre-injection level by 10 days. To understand whether NAC can also activate CL activity *in vitro*, NAC was directly added to isolated catfish leucocytes. It was observed, however, that NAC can not stimulate CL at reasonable concentration ranges *in vitro*. As NAC is a precursor for the strong anti-oxidant glutathione (GSH), a putative immune stimulator, it was assessed whether GSH can also stimulate CL responses. Observed results show that GSH activated CL both *in vivo* and *in vitro*. The data obtained collectively support the proposition that NAC indirectly stimulates non-specific immune functions in catfish by enhancing GSH biosynthesis, but not by direct action of NAC. Such effects may have beneficial significance in aquaculture for practical utilization.

Key words: *N*-acetylcysteine (NAC), Non-specific immune functions, Chemiluminescence (CL) response, Far Eastern catfish

특정 생물의 면역기능은 면역세포내의 항산화 상태(anti-oxidant status), 즉 항산화성분자-산화성 분자의 농도 균형에 매우 예민하게 반응한다. 왜냐하면 모든 면역세포에서의 세포막 지질, 단백질, 핵산, 신호전달 및 유전자발현 등의 안정성과 기능성이 그 항산화 상태에 따라 결정되기 때문이다 (Meydani *et al*., 1995). 또한 몇 종류의 면역세

[†]Corresponding author: Kwan Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

포는 방어기전의 하나로서 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 생산하며 이들 세포내에는 방어기전으로써 자체의 세포내에는 항산화분자가 고농도로 존재하고 있다 (Coquette *et al*., 1986).

산소를 구성성분으로 포함하는 ROS이 동물체내 면역반응과의 관련성은 다양한 측면에서 알려져 있다 (Knight, 2000). 예를 들면 호중구나 대식세포는 호흡폭발(respiratory burst) 과정에서 산소를 이용하여 hydrochlorous나 hydroxy raidical (OH) 같은 강력한 살균작용을 발휘하는 분자물질을 생성한다. 또한 대식세포에서 생성되는 nitric oxide는 superoxide와 반응하여 peroxinitrite와 같은 살균작용을 발휘하는 분자를 생산할 수 있다고 알려져 있다. 이와는 반대로 산화성스트레스 (oxidative stress) 환경 자체는 면역기능의 유지에 필요한 cytokine, chemokine 또는 세포 부착성 분자 (cell adhesion molecule) 등의 유전자 발현을 억제함으로써 면역기능에 부정적 영향을 미치게 된다. 동물이나 인간에서 항산화 물질의 공급은 면역세포의 분열 촉진, interleukin 생산 증대, 항체 생성능 증대 등을 통해 면역능을 강화시키는 것으로 알려져 있다. 특히 항산화 물질에 의한 지질과산화(lipid peroxidation) 과정의 저감으로 인해 면역능의 유지에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 추정되고 있다.

이러한 관련성 때문에 양식 어류에 항산화물질을 투여하면 면역기능, 특히 비특이적 면역능이 증강됨이 vitamin E (Kiron *et al*., 2004; Ortuno *et al*., 2000), vitamin C (Ai *et al*., 2004; Eo and Lee, 2008), 천연 항산화물질 (Thawonsuwan, 2010; Enis Yonar *et al*., 2011) 등을 이용한 연구에서 무지개송어, 유럽청돔 (gilthead seabream), 농어 등의 어류에서 증명된 바가 있다.

합성 저분자물질인 *N*-acetylcysteine (NAC)은 세포내에서 cysteine으로 가수분해된 후 glutathione (GSH) 생합성의 전구물질로 작용함으로써 GSH의 생성을 도울 뿐 아니라, 간접적으로는 GSH의 재생(산화형 GSSG에서 환원형 GSH로의 변환)에 필요한 효소인 glutathione reductase의 활성화도 촉진한다 (Banaclocha, 2001). 따라서 이 두 가지 기전은 NAC의 투여 후 세포내의 환원형 GSH농도를 증가시키게 된다 (Issels *et al*., 1988; Phelps *et al*., 1992). 이때 생성된 GSH는 항산화 물질로서 ROS를 포함한 여러 가지 산화반응성 독성물질에 대한 방어물질로서 작용한다 (Bakker *et al*., 1994; Hoffer *et al*., 1996; Palevsky *et al*., 2006; Prescott *et al*., 1977).

GSH는 3종의 아미노산 γ-glutamate, cysteine 및 glycine으로 구성된 tripeptide로서, 동물 세포내에서 풍부하게 존재하는 α-glutamate와 glycine을 활용하여 합성할 수 있는 반면 나머지 하나의 전구체인 cysteine은 농도가 불충분하기 때문에 GSH의 합성에 있어서 제한기질(rate-limiting factor)로 작용한다 (Kerksick and Willoughby, 2005). N-acetyl형태의 cysteine 구조물질인 NAC는 인간에서도 건강식품으로 활용되고 있다.

다양한 종류의 항산화물질이 어류의 면역기능을 증강시킴이 부분적으로 증명되어 있을 뿐 아니라 NAC가 간접적으로 GSH의 생성을 촉진하여 면역증강효과를 발휘할 수 있을 가능성을 시사한다. 실제로 NAC의 면역증강효과가 포유류를 이용한 실험동물과(Ferrandez *et al*., 1999; Puerto *et al*., 2002; Victor *et al*., 2003)와 인간(Arranz *et al*., 2008; Venketaraman *et al*., 2008)에서는 보고되어 있다. 어류에서의 NAC를 이용한 연구결과는 거의 없으나 Xie 등 (2016)은 틸라피아의 선천성 면역능이 증강됨을 보고하였다. 또한 본 연구팀은 국내에서 양식중인 8 종의 어류에서 항산화물질인 NAC가 비특이적 면역지표인 lysozyme와 CL반응을 증강시킴을 보고한 바 (안재영 등, 2012)가 있다. 본 연구에서는 한국 메기에서 다양한 투여조건의 NAC가 어떤 용량에서 비특이적 면역지표의 하나인 chemiluminescence (CL) 반응을 증강시키는지, 또한 그 효과의 지속시간은 얼마나 되는지를 평가하였다. 추가적으로 NAC의 효과가 자신의 직접적인 효과에 의한 것인지 아니면 간접적으로 glutathione (GSH)을 합성함으로써 나타나는 현상인지도 검토하였다.

재료 및 방법

실험용 어류 및 *N*-acetylcysteine의 투여

실험어는 인근 메기 양식장에서 공급받아 사용하였다(체중 1050-1500 g, 체장 23-33 cm). 메기는 실험실에서 1주간 순치시킨 후 외관상 질병의 증세가 없는 건강한 개체만을 사용하였다. 어류는 수온 22.1±1.0℃로 일정하게 유지하였으며 지속적으로 폭기하여 산소를 공급하였다. *N*-acetylcysteine (NAC)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 녹여서 사용하였다. 이 시험은 이전의 연구에서 확인한 용량 (안재영 등, 2012)을 근거로 시험을 수행하였다. NAC는 복강내로 마리당 0.1㎖씩 투여하였으며, 대조군의 어류에는 동일양의 PBS를 투여하였다. *In vitro* 시험에 사용한 백혈구는 시험물질이나 saline을 메기에는 투여하지 않고, 신장에서 분리한 백혈구 부유액에 직접 NAC를 가하여 반응을 측정하였다. *In vivo* 시험에 사용한 동물 수 시험결과를 제시한 그래프에서, *in vitro*시험에서는 3 마리의 메기로부터 백혈구를 분리하여 합한 후 시험에 사용하였다.

메기 두신 백혈구의 chemiluminescence (CL) 반응

MS-222로 마취하에서 메기의 두신을 무균적으로 분리하였다. 분리한 신장에 heparin (10 U/ml, Sigma), streptomycin (100 U/ml, Sigma)과 penicillin G (100 μg/ml, Sigma)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 넣고 가는 nylon망을 이용하여 세포들을 분리하였다. 선별적인 분리를 위해 두신 세포는 34-51% Percoll 밀도구배 (Sigma) 용액에 중층하고 4℃에서 400×*g*로 30분간 원심 분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 분리하였다. DMEM으로 400×*g*에서 5분간 원심분리 과정을 2번 반복함으로써 MS-222 등 불순물을 제거하였다. 세포의 생존율 판정은 0.5% trypan blue (Sigma) 용액를 이용하였으며, 모든 시험군에서 분리된 세포들의 생존율은 98.0%이상 이었다. CL 반응의 시험에 사용할 백혈구 현탁액의 세포수를 최종적으로 0.5×10^6 cell/ml로 조정하였다. 분리한 백혈구 세포는 불투명 백색 바탕의 96-well plate에 200 ㎕씩 넣은 후 2시간 동안 25℃에서 미리 안정화를 시켰다. 검출시약인 형광 luminol은 10 mM의 농도로 조제(붕산에 용해한 후 NaOH로 pH 조절, 서정수 등, 2004)하여 25㎕를 백혈구 현탁액이 든 plate에 가하고 10분간 25℃에서 배양하였다. CL반응의 야기를 위해 옵소닌화된 10 mg/ml의 zymosan (Sigma) 25 μl을 백혈구에 첨가한 직후 automatic photoluminometer (MPL2 model, Berthold Detection Systems, Hamburg, Germany)를 사용하여 40분간 연속적으로 CL반응을 측정하였다(Stolarek, 2002). CL 반응의 크기는 relative luminescence unit (RLU)/sec의 단위로 산출하였다. 별도로 zymosan의 opsonin화를 위해 미리 시험에 사용할 종류와 동일한 각 어종으로부터 혈청을 분리하고 zymosan을 10 mg/㎖이 되도록 혼합하여 4℃에서 30분간 반응시켰다. 이 과정을 통해 옵소닌화된 zymosan을 원심분리과정을 통해 PBS로 3회 세척(600×*g*, 5분) 후 다시 10 mg/ml 되도록 재희석 하여 사용하였다(Rodriguez *et al*., 2008).

통계처리

Data는 mean ± S.D.로 표현하였으며, ANOVA 분석 후 전체 시험군 중 차이가 있는 시험군이 있는 것으로 판단되면, 개별군간의 차이는 Newman-Keuls t-test (Primer v. 7, Primer-e, Plymouth, UK, 2015)를 이용하여 검정하였다. 이 때 $P < 0.05$인 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

*In vivo*에서 NAC의 용량에 따른 메기의 화학발광 반응(chemiluminescence)의 크기

Fig. 1은 복강 내로 1, 10 및 100 mg/kg의 NAC를 메기에 복강 투여한 후 분리한 백혈구에서 나타나는 CL반응의 크기를 측정한 결과를 보여주고 있다. 1 mg/kg에서는 대조군과 차이가 나타나지 않지만 10 mg/kg와 100 mg/kg에서는 대조군에 비해 유의성 있게 현저히 증강된 화학발광 반응을 보여준다. 이 시험에서는 1과 10 mg/kg 사이의 용량이나 10-100 mg/kg 사이의 중간 용량에 대해서는 시험하지 않아 명확하지는 않지만 10 mg/kg 부근에서 최대의 효과가 나타나는 것은 분명하다.

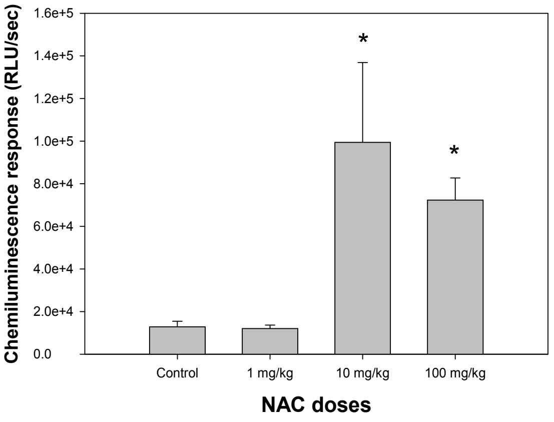

Fig. 1. Effects of different N-acetylcysteine (NAC) doses on chemiluminesence (CL) responses in isolated catfish leucocytes after intraperitoneal injection. CL activity was examined 48 hr after NAC injections. CL was expressed as peak responses obtained from 40 min continuous monitoring. Mean ± S.D. of 6 fish for each group. *Significantly different from control at $p < 0.05$ with Newman-Keuls t-test.

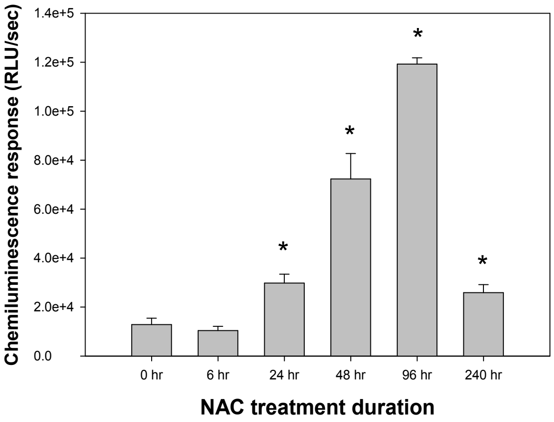

Fig. 2. Effects of different treatment period of N-acetylcysteine (NAC) on chemiluminesence (CL) responses in isolated catfish leucocytes after intraperitoneal injection. CL activity was examined 48 hr after NAC injections. CL was expressed as peak responses obtained from 40 min continuous monitoring. Mean ± S.D. of 6 fish for each group. *Significantly different from control at $p < 0.05$ with Newman-Keuls t-test.

_In vivo_에서 메기에 NAC의 투여 후 반응 유도시간에 따른 화학발광 반응의 크기변화

NAC 투여 후 화학발광 반응의 발현이 최대로 나타나는 데 필요한 시간을 평가하기 위해 10 mg/kg의 투여 후, 6시간으로부터 240시간 사이의 여러 다양한 시점에서 화학발광 반응의 크기를 측정하였다. Fig. 2 에서 그 결과를 보여주고 있다. 이 결과에 의하면 적어도 NAC 투여 24시간 이후에 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 그 증가현상은 96시간(4일)에 이르기까지 점차적으로 증가되지만 10일 후에 측정하였을 때에는 상당부분 NAC 투여 이전의 상태로 전환되는 것이 관찰되었다.

_In vitro_에서 NAC가 메기 백혈구세포의 화학발광 반응에 미치는 영향

앞에서 보여준 결과들은 메기에 NAC를 투여하고 체내에서 작용이 일어난 일정시간 후의 반응을 평가한 *in vivo*에서의 효과이다. 여기에서의 시험에서는 NAC가 체내에서 작용하여야만 화학발광 반응을 유도하는 지, 아니면 분리한 백혈구에 직접 NAC를 가하는 *in vitro*에서의 시험계에서도 효과를 발휘하는 지를 평가하고자 하였다. 화학발광 반응의 결과를 Fig. 3에서 보여준다. 이 결과를 보면 NAC는 낮은 농도(1~10 μM)에서 반응을 저하시키는 반면 매우 높은 농도(10,000 μM)에서는 자극하는 효과를 발휘하였다.

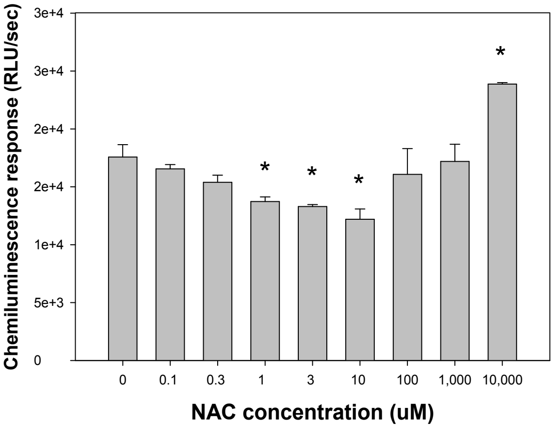

Fig. 3. *In vitro* effects of N-acetylcysteine (NAC) on chemiluminesence (CL) responses in isolated catfish leucocytes. CL was expressed as peak responses obtained from 40 min continuous monitoring. Mean ± S.D. of N=10 replicates. *Significantly different from control at $p < 0.05$ with Newman-Keuls t-test.

항산화물질 glutathione (GSH)이 메기의 백혈구 화학발광 반응에 미치는 영향

앞의 시험들에서는 NAC를 어체내 (*in vivo*)로 투여하면 메기 백혈구의 화학발광반응을 증가시키지만 직접 분리한 백혈구 세포에 노출시키는 상태(*in vitro*)에서 약리학적인 범위의 농도에서는 반응을 증강시키는 효과는 없고 오히려 저하하는 작용만 발휘하였다. 따라서 다음 단계의 연구에서는 NAC가 체내에서 생성하는 것으로 가정하고 있는 glutathione (GSH)을 투여하였을 때에는 어떤 효과를 발휘하는지를 평가하였다.

Fig. 4는 GSH를 메기에 직접 투여한 후 분리한 메기 백혈구에서의 화학발광반응 (*in vivo* 효과, Fig. 4a) 및 분리한 백혈구 세포에 GSH를 가하여 평가한 시험결과 (*in vitro* 효과, Fig. 4b)를 각각 보여주고 있다. 이 결과는 GSH가 *in vivo* 및 *in vitro* 양자에서 공히 유효함을 보여준다.

고 찰

호흡폭발(respiratory burst)반응은 어류에서 비특이적 면역능(innate immunity)의 척도로서 사용되어 왔다(Bols *et al*., 2001). 호흡폭발반응은 탐식세포(ganulcytes, monocytes 및 macrophages)가 산소분자(O_2)를 환원하여 superoxide radical($\cdot O_2^-$)을 생성하는 반응을 지칭하며, 본 연구에서는 CL 반응의 크기를 측정하여 그 수준을 평가하였다. 이 반응은 세포내에 존재하는 HADPH oxidase에 의해 수행되며 반응의 결과 생성된 superoxide는 자발적으로 또는 추가적인 효소에 의해 과산화수소(H_2O_2), hydrochlorous acid (HOCl), hydoxy radical ($\cdot OH$) 및 singlet oxygen ($^1O_2$) 등 통칭 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)를 생성한다. ROS는 생분자와의 강력한 반응성 때문에 어류 병원성 기생생물을 용이하게 살상하며 이 또한 lysozyme과 더불어 비특이적인 항병성의 지표로 사용된다 (Babior, 1999). ROS와 luminol을 반응시켜 생성되는 형광물질의 양을 측정하는 CL 반응법은 민감도가 매우 높고 연속적으로 측정할 수 있는 장점이 있기 때문에 비특이적 면역능의 평가에 많이 활용되고 있다 (Roszell and Anderson, 1994).

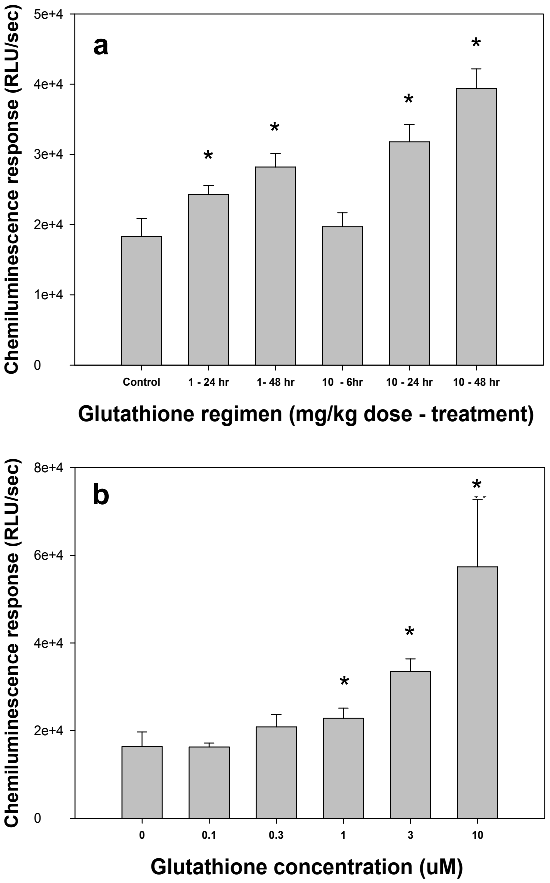

Fig. 4. *In vivo* (a) and *in vitro* (b) effects of glutathione (GSH) on chemiluminesence (CL) responses in isolated catfish leucocytes. GSH was injected intraperitoneally 48 hr before CL response assessment for *in vivo* experiment (a), while GSH was added directly into isolated leucocyles for *in vitro* tests (b). CL was expressed as peak responses obtained from 40 min continuous monitoring. Mean ± S.D. of 6 fish for *in vivo* and 10 replicates for *in vitro*. *Significantly different from control at $p < 0.05$ with Newman-Keuls t-test.

ROS는 세포내에서 방어작용을 위해 꾸준히 형성되고 있으며 이러한 ROS의 축적이나 해로운 산화작용을 막기 위해서 세포내에서는 ROS 물질 제거 시스템도 동시에 작동하고 있다. Thiol기(-SH)를 함유하는 GSH는 환원력을 가지고 있어서 ROS에 전자를 제공함으로써 ROS를 제거한다 (Winterbourn and Hampton, 2008). 또한 대표적인 free radical scavenger 들인 vitamin E, ascorbic acid, β-

carotene 및 uric acid등은 GSH와 세포내에서 상호 보완하는 작용을 발휘함으로 인해 한 물질의 존재는 다른 물질의 소모를 방지하는 작용(reserve effect)도 있다 (Ghiselli *et al*., 2000).

본 연구에서 발견한 것은 NAC 투여로 메기의 백혈구 CL반응이 용량 의존적으로 증가됨을 발견하였다. 또한 그 반응은 비교적 오랜 기간 동안 유지(>4일 이상)되며 10일 이후에도 상당히 NSC 투여 이전의 수순에 가깝게 소실되어 가지만 여전히 통계적으로는 대조군 보다 유의성 있게 활성화 되어 있음이 관찰되었다. 그러나 NAC를 메기에 투여하지 않고, 백혈구를 먼저 분리한 후 NAC를 가하였을 때 극단적으로 높은 NAC (10,000 μM)를 제외하고는 CL 반응이 불변이거나 오히려 저해되는 현상이 발견되었다. 이 현상은 배양세포에 NAC를 직접 가하면 *in vitro*에서는 오히려 CL 반응을 억제되는 현상과 유사하다 (Stolarek *et al*., 2002). GSH가 감소하는 조건이나 산화적 stress가 높아지는 병리적 상황 및 ROS의 증가가 관련된 질환들에 효과가 있음이 보고되었다 (Ferrari *et al*., 1995; Sener *et al*., 2003). 본 연구를 통해서 NAC가 *in vivo*에서 투여하였을 때는 비특이적 면역능의 지표인 식세포의 ROS 생산능을 증강시킴을 발견하였으나 *in vitro* 시험계에서는 오히려 감소하는 현상이 발견되었으므로 NAC에 의한 면역능 증강을 위해서는 *in vivo* 상태에서처럼 백혈구 뿐만이 아니라 다른 세포계의 역할도 필요함을 의미한다고 해석될 수 있을 것이다.

항산화작용을 가진 NAC가 다른 생물 시험계에서 비특이적 면역능 지표들을 증강시키는 것이 보고(Ferrandez *et al*., 1999; Puerto *et al*., 2002; Victor *et al*., 2003, Arranz *et al*., 2008; Venketaraman *et al*., 2008)되어 있지만, 어류에서 이 지표들을 변화시키는 현상에 대한 발견은 중요한 의미를 갖는 것으로 생각된다. 특히 이 연구에서는 NAC가 항산화물질인 GSH로 전환되어 나타난 현상이며 NAC 자체가 발휘하는 작용이 아님을 규명하였다.

이 결과를 종합하면 NAC가 양식 메기에서 비특이적 면역능을 증강시킬 수 있으므로 질병에 대한 저항성을 증강시키는 효과를 발휘할 가능성을 시사하기 때문에, 이미 인간에서 사용되어 안전성과 흡수성이 확보(De Caro *et al*., 1989; Tsikas *et al.,* 1998)된 이 저분자 물질을 어류양식에서도 기능성 성분으로서의 활용성을 고려해 볼 가치가 있을 것이다. 최근 틸라피아에서 NAC를 투여하면 *Streptococcus iniae*에 기인한 치사반응을 억제함이 보고 (Xie *et al*., 2016)된 바 있어 그 가능성을 높혀 준다. 물론 메기에서 유사한 작용이 발휘되는지를 병원성생물을 사용한검증이 필요하다.

References

서정수, 정소정, 이상환, 김나영, 엄혜경, 허민도, 정현도, 정준기: 양식산 넙치, *Paralichthys olivaceus* 식세포의 식작용 활성에 미치는 chloramphenicol의 영향. 한국어병학회지, 17:217-222, 2004

안재영, 이한나, 박경일, 김종연, 이정열, 박관하: N-acetylcysteine(NAC)이 어류의 비특이적 면역 parameter인 호흡폭발 및 lysozyme활성에 미치는 영향. 한국어병학회지 25:1-10, 2012

Ai, Q.H., Mai, K.S., Zhang, C.X., Xu, W., Duan, Q.Y., Tan, B.P. and Liufu, Z.G.: Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonica*. Aquaculture, 242: 489-500, 2004

Arranz, L., Fernández., C, Rodríguez, A., Ribera, J.M. and De la Fuent,e M.: The glutathione precursor *N*-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. Free Rad. Biol. Med., 45: 1252-1262, 2008.

Babior, B.M.: NADHP oxidase: an uptake. Blood, 93: 1464-1476, 1999.

Bakker, J., Zhang, H., Depierreux, M., Van Asbeck, S. and Vinvent, J.L.: Effects of *N*-acetylcysteine in endotoxic shock. J. Crit. Care, 9: 236-243, 1994.

Banaclocha, M.M.: Therapeutic potential of *N*-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. Med. Hypoth., 56: 472-477, 2001.

Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C. and Lee, L.E.J:. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Dev. Com. Immunol., 25: 853-873, 2001.

Coquette, Å., Vray, B. and Vanderpas, J.: Role of vitamin E in the protection of the resident macrophage membrane against oxidative damage. Arch. Int. Physiol. Biochem., 94: 529-534, 1986.

De Caro, L., Ghizzi, A, Costa, R., Longo, A., Ventresca, G.P. and Lodola, E.: Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. Arzneimittelforschung, 39:382-386, 1989.

Enis Yonar, M., Mise Yonar, S. and Silici, S.: Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). Fish Shellfish Immunol., 31: 318-325, 2011.

Eo, J. and Lee, K.J.: Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Tagifugu rubripes*. Fish Shellfish Immunol.,, 25: 611-616, 2008.

Ferrandez, M..D., Correa, R., Del Rio, M. and De la Fuente, M.: Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. Exp. Gerontol., 34: 675-685, 1999.

Ferrari, G., Yan, C.Y. and Greene, L.A.: N-Acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. J. Neurol. Sci., 15: 2857-66. 1995.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. and Scaccini, C.: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Rad. Biol. Med., 29:1106-1114, 2000.

Hoffer, E., Baum, Y., Tabak, A. and Taitelman, U.: *N*-acetylcysteine increases the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. Toxicol. Lett., 84: 7-12. 1996.

Issels, R.D., Nagele, A., Eckert, K.G. and Wilmanns, W.: Promotion of cysteine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and *N*-acetylcysteine. Biochem. Pharmacol., 37: 881-888, 1988.

Kerksick, C. and Willoughby, D.: The antioxidant role of glutathinone and N-acetylcysteine supplements and exerce-induced oxidative stress. J. Int. Soc. Sports Nutr. 2: 38-44, 2005.

Kiron, V., Puangkaew, K., Ishizaka, K., Satoh, S. and Watanabe, T.: Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. Aquaculture, 234: 361-379, 2004.

Knight, J.A.: Review: free radicals, antioxidants, and the immune system. Ann. Clin. Lab. Sci. 30: 145-158, 2000.

Meydani, S.N., Wu, D., Santo, M.S. and Hayek, M.: Antioxidants and immune response in aged persons: overview of the present evidence. Am. J. Clin. Nutr., 62:S1462-S1476, 1995.

Ortuno J., Esteban, M.A. and Mesegue, J.: High dietary intake of α-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol., 10: 293-307, 2000.

Palevsky, P. and Murray, P.: Acute kidney injury and critical care nephrology. Nephrol. Self Assess Program, 5: 81-84. 2006.

Phelps, D.T., Deneke, S.M., Daley, D.L. and Fanburg, B.L:. Elevation of glutathione levels in bovine pulmonary artery endothelial cells by NAC. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7: 293-299. 1992.

Prescott, L.F., Ballantyne, A., Proudfoot, A.T., Park, J. and Adriaenssens, P.: Treatment of paracetamol (acetpaminophen) poisoning with *N*-acetylcysteine. Lancet, 310: 432-434, 1977.

Puerto, M., Guayerbas, N., Víctor, V.M. and De la Fuente M.: Effects of *N*-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing. Pharmacol. Biochem. Behav., 73: 797-804, 2002.

Rodriguez, I., Novoa, B., Figueras, A.: Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol, 25: 239-249. 2008.

Roszell. L.E. and Anderson, R.S.: Inhibition of phagocytosis and superoxide production by pentachlorophenol in two leukocyte subpopulations from *Fundulus heteroclitus*. Mar. Environ. Res., 38: 195-206, 1994.

Sener, G., Tosun, O., Sehirli, A., Kacmaz, A., Arbak, S. and Ersoy, Y.: Melatonin and *N*-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life Sci., 72:7-18. 2003.

Stolarek, R.: *N*-acetylcysteine effect on the luminol-dependent chemiluminescence pattern of reactive oxygen species generation by human polymorphonuclear leukocytes. Pulmon. Pharmacol. Ther., 15: 385-392. 2002.

Thawonsuwan, J,M., Kiron, V., Satoh, S., Panigrahi, A. and Verlhac, V.: Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiol. Biochem., 36: 87-697, 2010.

Tsikas, D., Sandmann, J., Ikie, M., Fauler, J., Stichtenoth, D.O. and Frolich, J.C.: Analysis of cysteine and *N*-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of *N*-acetylcysteine. J. Chromatogr. B.: Biomed. Sci. Appl., 708: 55-60, 1998.

Venketaramen, V., Millman, A., Salman, M., Swaminathan, S., Goetz, M., Lardizabal, A., Hom, D. and

Connel, N.D.: Glutathione levels and immune responses in tuberculosis patients. Microb. Pathogen., 44: 255-261, 2008.

Víctor, V.M., Rocha, M. and De la Fuente, M.: Regulation of macrophage function by the antioxidant *N*-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. Int Immunopharmacol., 3: 97-106, 2003.

Winterbourn, C.C. and Hampton, M.B.: Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Dad. Biol. Med., 45: 549-561, 2008.

Xie, A., Zhou, W., Tian, L., Niu, J. and Liu, Y.: Effect of N-acetyl cysteine and glycine supplement on growth performance, glutathione synthesis, anti-oxidative and immune ability of Nile tilapia. *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 55: 233-241, 2016.

Manuscript Received : Jun 6, 2019
Revised : Jun 18, 2019
Accepted : Jun 18, 2019