

ผลของ N-acetyl-cysteine ต่อเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัส

The Effect of N-acetyl-cysteine on Dengue Virus Infection in HepG2 Cells

จินตนา บุตรกันหา (Jintana Bootkunha)* จุฑาทิพย์ พนอำพน (Jutatip Panaampon)**

เพทาย เชนิจิตโสมนัส (Pa-thai Yenchitsomanus)*** ถาวรชัย ลิ้มจินดาพร (Thawornchai Limjindaporn)****

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อเด็งกี (DENV) ทำให้ตับมีพยาธิสภาพและมีการอักเสบเกิดขึ้น โดยมีสาเหตุมาจากทั้งผลโดยตรงจากไวรัสต่อเซลล์ตับเองและเกิดจากความผิดปกติของ host immune response ต่อไวรัส การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีมีการลดลงของระดับแอนติออกซิแดนท์ ดังนั้น N-acetyl-cysteine (NAC) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนติออกซิแดนท์อาจช่วยบรรเทาอาการในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีได้ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อสำรวจผลของ NAC ต่อจำนวนไวรัสเด็งกีและผลของ NAC ในการปกป้องเซลล์ตับ HepG2 จากการถูกทำลายด้วยการติดเชื้อไวรัส ผลการทดลองพบว่า NAC ลดจำนวนไวรัสเด็งกี (DENV production) และช่วยเพิ่มระดับความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ตับ (Cell viability)

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) causes liver dysfunction by the direct effect of the virus to the cells, and by disorders of host immune response to the virus. Patients infected with DENV shows low levels of antioxidant. Therefore, N-acetyl-cysteine (NAC), which is an antioxidant, may have a benefit to DENV patients. The purpose of this research was to explore whether NAC reduced DENV infection and protected HepG2 cells from DENV-induced cell death. The result showed that NAC reduced DENV infection, virion production and increased viability of HepG2 cells.

คำสำคัญ: โรคติดเชื้อเด็งกี สารเอ็นอะเซทิลซิสเตอีน ภัยอันตรายของตับ

Key Words: Dengue virus infection, N-acetyl-cysteine, Liver injury

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

** ผู้ช่วยนักวิจัย หน่วยอนุเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

*** ศาสตราจารย์ หน่วยอนุเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

**** รองศาสตราจารย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

โรคติดเชื้อไวรัสเด็งกีจัดเป็นปัญหาด้านสาธารณสุข- สุขที่สำคัญของประเทศในแถบเอเชียอาคเนย์รวมทั้งประเทศไทย (Tavodova et al., 2012) ไวรัสเด็งกีจัดเป็น Mosquito-Borne hemorrhagic fever คือเกิดจากเชื้อไวรัสที่มียุงเป็นพาหะนำโรค โดยมียุงลายสายพันธุ์ *Aedes aegypti* เป็นพาหะ ในแต่ละปีจะมีประชากรประมาณ 2,500 ล้านคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ โดยมีจำนวนผู้ติดเชื้อ 50-100 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 10,000 รายต่อปี (McBride et al., 2000) เชื้อไวรัสเด็งกีมีสายพันธุกรรมเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยวแบบสายตรงชนิดบวก (Linear, positive single-stranded RNA) มีอนุภาครูปทรงกลมขนาดประมาณ 50 nm. มีเปลือก (envelope) หุ้ม เชื้อไวรัสเด็งกีมีทั้งหมด 4 ซีโรไทป์ ประกอบด้วย เด็งกีไวรัสซีโรไทป์ -1,2,3 และ 4 (Weaver et al., 2009) ปัจจุบันเชื้อเด็งกีไวรัสชนิดยังไม่พบยาด้านไวรัส และวัคซีนในการรักษา (Whitehorn et al., 2011)

วงจรการแพร่เชื้อของไวรัสเริ่มจาก เชื้อไวรัสจับกับ host cell receptor โดยใช้ E protein หลังจากนั้นก็จะเกิดกระบวนการ endocytosis ทำให้ไวรัสสู่เซลล์เกิดการ fusion ของไวรัสและ host endosomal membrane กระตุ้นให้มี low pH dependent ทำให้ nucleocapsid ถูกปล่อยเข้าไปอยู่ใน cytoplasm จากนั้นเชื้อไวรัสเด็งกีจะเพิ่มจำนวน (DENV replication) ตัวเอง และไป mature ที่ Golgi compartment ก่อนที่จะ exocytosis เป็นไวรัสตัวใหม่ต่อไป (Clyde et al., 2006)

โรคติดเชื้อไวรัสเด็งกีสามารถแบ่งลักษณะอาการและการดำเนินโรคเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ กลุ่มแรกคือไข้เด็งกี (Dengue fever: DF) เป็นกลุ่มที่มีความรุนแรงน้อยอัตราการตายต่ำ ในทารกและเด็กเล็กอาจมีไข้ทำนองเดียวกับไขอื่นๆ แต่ในเด็กโตหรือผู้ใหญ่มีอาการรุนแรงกว่า คือ มีไข้ ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อและข้อ ต่อมน้ำเหลืองโต ต่อมากลุ่มที่สองคือไข้เลือดออก มีอาการรุนแรงกว่ากลุ่มแรก สามารถแบ่ง

ต่อไปได้อีกสองกลุ่มคือ กลุ่มที่มีอาการช็อค (Dengue shock syndrome) กับไม่มีอาการช็อค (Dengue hemorrhagic fever) อาการของโรคสามารถแบ่งได้ 3 ระยะ คือ ระยะไข้ ระยะวิกฤตและระยะฟื้นโรค การติดเชื้อไวรัสเด็งกีซ้ำครั้งที่สอง ทำให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงมากกว่าครั้งแรก เรียกว่า ปฏิกิริยาการเสริม "Antibody dependent enhancement" (Weaver et al., 2009)

ตับเป็นอวัยวะภายในที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายมนุษย์ โดยคิดเป็น 2.5% ของน้ำหนักตัว ตับมีหน้าที่หลากหลาย เช่น ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันและการล้างพิษ (Couinaud et al., 1999) ตับประกอบด้วย parenchymal cells คือ hepatocyte คิดเป็นประมาณ 80% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด และ non-parenchymal cells ประกอบด้วย Kupffer cells, endothelial cells (Vrba et al., 2002) และ stellate cell (Ito cells) (Tso et al., 2003.) Kupffer cells ทำหน้าที่เป็น macrophages เมื่อตับเกิดกระบวนการการอักเสบเกิดขึ้น เกิดการผลิต collagen โดย stellate เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดในพยาธิสภาพของ liver disease (Tso, 2003.) ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายหนึ่งของโรคติดเชื้อเด็งกี (Hadinegoro et al., 2012) ทั้งในคนและหนูทดลอง ตับที่ติดเชื้อเด็งกีไวรัสจะทำให้เกิดอันตรายของตับ (liver injury) และพบลักษณะของ hepatocyte necrosis, micro vesicular steatosis และ councilman body เกิดขึ้นในเซลล์ตับ (Martins et al., 2012) เมื่อเซลล์ตับเกิด injury จะทำให้มีระดับเอนไซม์ตับ alanine transaminase (ALT) และ aspartate transaminase (AST) เพิ่มขึ้น และเมื่อตรวจดูทาง อิมมูโนพยาธิวิทยาพบว่า Kupffer cell และ hepatocyte cell พบว่ามี viral antigen (Huerre et al., 2001) โดยกลไกของเซลล์ตับเกิด injury พบว่ามีสาเหตุมาจากทั้งผลโดยตรงจากไวรัสต่อเซลล์ตัวเองและเกิดจากภูมิคุ้มกันของ host immune responses ต่อไวรัสของเซลล์ตับ (Vrba et al., 2002)

ที่ผ่านมา NAC เป็นสารที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆในปัจจุบัน เช่น โรคมะเร็ง, โรคหัวใจและหลอดเลือด

เลือด, HIV, acetaminophen-induced liver, toxicity, and metal toxicity เป็นต้น โดย NAC มีหน้าที่ในการรักษาระดับของ cysteine ในกระแสโลหิตเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ลูตาไธโอน ซึ่งเป็นสารประเภทแอนติออกซิแดนท์ในร่างกาย (Zafarullah et al., 2003) NAC เป็นสารตั้งต้นของ glutathione (Zafarullah et al., 2003) จึงมีส่วนช่วยเพิ่มระดับของ glutathione ในเซลล์ตับ (hepatocytes) (Tian et al., 2010) โดย glutathione ในร่างกายจัดเป็นแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) ช่วยกำจัด reactive oxygen species (ROS) (Lim et al., 2011) ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะเซลล์ตับถูกทำลาย (hepatocellular injury) (Tso, 2003)

การศึกษาที่ผ่านมาได้ศึกษาผลของ NAC ในการลด profibrotic agent (methlmitrosamine) ในหนูทดลอง (Zafarullah et al., . , 2003) โดยหนูเกิดพยาธิสภาพที่ hepatic stellate cells (HSCs) ทำให้เกิด chronic liver damage และ hepatic fibrosis การทดลองในระดับโมเลกุลพบว่า NAC ช่วยยุติกระบวนการ chronic liver damage ผ่าน Raf-1, MEK and ERK signaling protein (Itha et al., 2005)

ในโรคติดเชื้อเด็งเก้ NAC เคยถูกนำมาใช้ในเด็กที่ติดเชื้อเด็งเก้ร่วมกับมีภาวะ liver failure ร่วมด้วย โดยให้ NAC ทางหลอดเลือดดำ (intravenous N-acetyl-cysteine) โดยพบว่าผลการรักษาประสบความสำเร็จ (Vendemiale et al, 2001) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อต้องการศึกษาผลของ NAC ต่อการเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์, ลดการติดเชื้อ DENV และลดการผลิตไวรัสในเซลล์ตับ HepG2

ระเบียบวิธีการศึกษาวิจัย

1. เซลล์, ไวรัส และ สารเคมี (cells, virus and reagents)

Human hepatocarcinoma cell line หรือ HepG2 (ATCC) ถูกเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM, Gibco)

ร่วมกับ 10% fetal bovine serum (FBS), African monkey kidney cell (Vero) ถูกเลี้ยงใน minimum essential medium (MEM, Gibco), Dengue virus serotype 2 (strain 16881) จากหน่วยอนุเวชศาสตร์สถานส่งเสริมงานวิจัย (DMM) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, N-acetyl-cysteine (NAC) สั่งซื้อจาก Sigma USA, Molecular Weight 163.19

2. การติดเชื้อไวรัส (DENV2 infection)

เซลล์ HepG2 ถูกเลี้ยงใน 96-well plates จำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำให้เซลล์ติดเชื้อไวรัสเด็งเก้ด้วย multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 5 แล้วนำเข้า incubator อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. Treatment of HepG2 cells with NAC

หลังจาก DENV2 infection เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย stock media 1 ครั้ง จากนั้นใช้ สารละลาย N-acetyl-cysteine (NAC) ที่เจือจางด้วยวิธี 2-fold dilution ที่ความเข้มข้น 2.5 mM, 5 mM, 10 mM และ 20 mM โดยใช้ปริมาณ 100 μ l/หลุม จากนั้น incubation ที่อุณหภูมิ 37 ° C, 5% CO₂, เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการวัดระดับความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability assay) กับ การวัด เปรอร์เซนต์การติดเชื้อ (ELISA assay) และเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับการหาจำนวนของไวรัส (focus-forming unit) โดยแต่ละการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 3 รอบการทดลอง และในแต่ละรอบการทดลองจะทำซ้ำ 3 sample

4. การวัดระดับความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability assay)

PrestoBlue® cell viability reagent ถูกนำมาใช้ในการทดสอบ cell viability ของเซลล์ HepG2 โดยใช้หลักการลดพลังงานของเซลล์ที่มีชีวิต เพื่อจะประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยหลังจาก cell treatment เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วจะใส่ PrestoBlue® cell

viability reagent จำนวน 90 μ l/หลุม จากนั้นนำไปอ่านค่าด้วย ELISA reader ที่ 595,570 nm.

5. การวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (ELISA

assay)

ELISA assay ใช้วัดระดับ DENV-infected HepG2 cells โดยจะนำผลที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับ MOCK เริ่มต้นจากนำตัวอย่างที่ต้องการวัดมา media เดิมออกหมดแล้วล้างด้วย washing buffer 200 μ l/หลุม, 3.6% formaldehyde 100 μ l/หลุม จากนั้น incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง, 1% triton-X ทำให้เซลล์เกิด permeabilization จากนั้น incubate อีกเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง, ล้าง 3 ครั้งด้วย washing buffer, 3% hydrogen peroxide 200 μ l/หลุม เพื่อ block endogenous peroxidase จากนั้น incubate เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง, ใส่ Primary antibody ต่อ E-protein 50 μ l/หลุม และล้าง 3 ครั้งด้วย washing buffer, ใส่ Secondary antibody 50 μ l/หลุม จากนั้น incubate เป็นเวลา 1/2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 ° C, ล้าง 3 ครั้งด้วย washing buffer และใส่ TMB enzyme substrate 50 μ l/หลุม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอ่อน และใส่ 3M H₂SO₄ 25 μ l/หลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา สารละลายจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอ่อนเป็นสีเหลือง จากนั้นนำไปอ่านค่าด้วย ELISA reader ที่ 450 nm.

6. การหาจำนวนของไวรัส (focus-forming units)

Focus-forming units (FFU/ml) เป็นวิธีที่ใช้หาจำนวนของไวรัส (Virus production) เริ่มต้นจากนำตัวอย่างที่ต้องการวัดมา media เดิมออกหมด จากนั้นล้างด้วย 1XPBS 3 ครั้ง จำนวน 200 μ l/หลุม จากนั้น fix cells ด้วย 3.6% formaldehyde 100 μ l/หลุม incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ 1% triton-X ใน PBS เพื่อทำให้เซลล์เกิด permeabilization แล้ว incubate เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS, จากนั้นใส่ 4G2

primary antibody 50 μ l/หลุม incubate เป็นเวลา 30 นาที, ที่อุณหภูมิ 37 ° C, moist chamber จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS 200 μ l/หลุม, ใส่ secondary antibody Rabbit anti-Mouse IgS-HRP 50 μ l/หลุม ล้าง 3 ครั้งด้วย 1XPBS, จากนั้นใส่ DAB substrate และเก็บไว้ในที่มืด 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย 1XPBS 200 μ l/หลุม 3 ครั้ง จากนั้นนำไปนับ foci ได้กล้องจุลทรรศน์

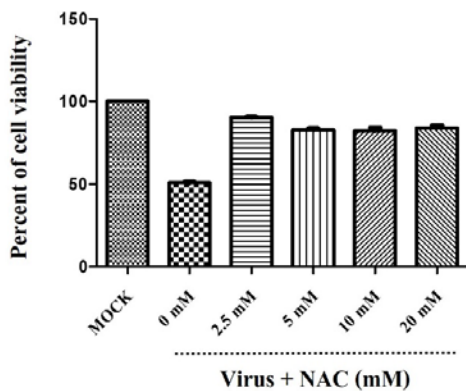
7. การวิเคราะห์สถิติ

การศึกษานี้ใช้สถิติในการวิเคราะห์ค่า ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มทดลองคือ Unpaired t-test โดยกำหนดค่านัยสำคัญ ทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการศึกษาวิจัย

1. การวัดระดับความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability assay)

PrestoBlue™ Cell Viability Reagent นำมาใช้ในการวัดผล cell viability ของ N-acetyl-cysteine (NAC) ต่อเซลล์ตับ HepG2 ที่ติดเชื้อเดงกีไวรัสพบว่า ที่ความเข้มข้น 2.5 mM, 5 mM, 10 mM และ 20 mM มี cell viability (%) เป็น 90.43%, 82.82%, 82.13% และ 84.06% ตามลำดับ และเซลล์ที่ไม่ได้ใส่ยา มี cell viability (%) เป็น 50.7% เมื่อเทียบกับ 100% ของเซลล์ที่ไม่ได้ติดเชื้อเดงกีไวรัส และไม่ได้ใส่ยา (MOCK) ดังนั้นสรุปได้ว่า N-acetyl-cysteine (NAC) สามารถเพิ่ม % cell viability ของเซลล์ตับ HepG2 ที่ติดเชื้อเดงกีไวรัสได้ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ treatment ด้วย N-acetyl-cysteine (NAC)

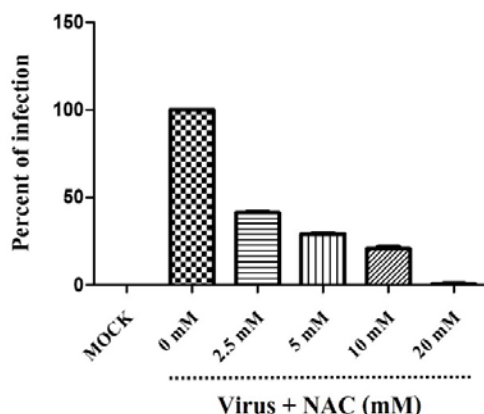


รูปที่ 1 NAC ลดการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ DENV ใน HepG2 cells

2. การวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (ELISA

assay)

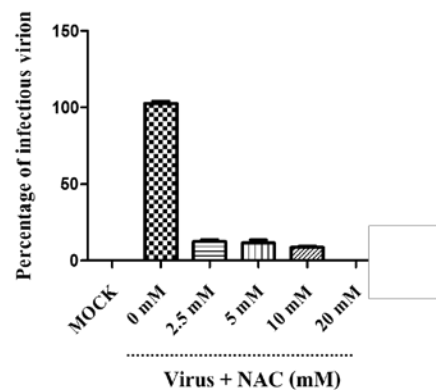
ผลเปอร์เซ็นต์ (%) การติดเชื้อของ N-acetyl-cysteine (NAC) ต่อเซลล์ตับ HepG2 ที่ติดเชื้อเด็งกีไวรัสพบว่า ที่ความเข้มข้น 2.5 mM, 5 mM, 10 mM และ 20 mM มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (%) เป็น 41.3%, 29.15%, 20.67% และ 0.51% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ 100 % ของเซลล์ที่ติดเชื้อแล้วไม่ได้ใส่ N-acetyl-cysteine (NAC) ดังนั้นสรุปได้ว่า N-acetyl-cysteine (NAC) สามารถลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเซลล์ตับ HepG2 ที่ติดเชื้อเด็งกีไวรัสได้



รูปที่ 2 NAC ลดการติดเชื้อ DENV ใน HepG2 cells

3. การหาจำนวนของไวรัส (focus-forming units, FFU/ml)

ผลการหาจำนวนของไวรัส (focus-forming units, FFU/ml) ของ N-acetyl-cysteine (NAC) ต่อเซลล์ตับ HepG2 ที่ติดเชื้อเด็งกีไวรัสพบว่า ที่ความเข้มข้น 2.5 mM, 5 mM, 10 mM และ 20 mM มีจำนวนของไวรัส (Virus production) เป็น 11.5%, 11.5%, 8.7% และ 0% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ติดเชื้อแล้วไม่ได้ใส่ N-acetyl-cysteine (NAC) ดังนั้นสรุปได้ว่า N-acetyl-cysteine (NAC) ช่วยลดจำนวนไวรัส (Virus production)



รูปที่ 3 NAC ลดจำนวนไวรัส DENV ใน HepG2 cells

การอภิปรายผล

โรคติดเชื้อเด็งกีเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขที่มีจำนวนผู้ติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี โดยมีความรุนแรงของโรคน้อย (Dengue fever; DF) ไปมาก (Dengue hemorrhagic fever; DHF และ Dengue shock syndrome; DSS) และยังไม่มียาในการรักษาโรค ด้เป็นอวัยวะเป้าหมายหนึ่งในโรคติดเชื้อเด็งกี ซึ่งเซลล์ในตับที่ติดเชื้อประกอบไปด้วย Kupffer cells, dendritic cells และ stellate cell นอกจากนี้ระดับเอนไซม์ Transaminase ในตับจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย

ในการศึกษานี้ผลของ NAC ต่อเซลล์ HepG2 ที่ติดเชื้อ DENV โดย viability ของเซลล์ได้รับการ

ประเมินจาก PrestoBlue® Reagent เปรียบเทียบการติดเชื้อ DENV ในเซลล์ HepG2 ศึกษาโดยใช้ cell base ELISA และปริมาณการผลิตไวรัสถูกประเมินโดย Foci focal unit (FFU) ผลการวิจัยที่พบว่า NAC ลดการตายของ HepG2 ที่ติดเชื้อ DENV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1) ประการที่สอง NAC ลดปริมาณการติดเชื้อ DENV ในที่เซลล์ HepG2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2) สุดท้าย NAC ลดปริมาณการผลิต DENV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใน HepG2 ที่ติดเชื้อ DENV (รูปที่ 3) การศึกษาของ NAC ในร่างกายมนุษย์ โดยในปี 2011, Grace Lim และคณะได้ทำการศึกษาในเด็กชายอายุหกขวบ ที่ติดเชื้อไวรัสแดงที่ร่วมกับมีภาวะตับล้มเหลว (liver failure) และรักษาด้วย NAC ได้ผล โดยพบว่ามีการลดระดับลงของ liver transaminases และ coagulation กลับมาเป็นปกติ (Grace Lim, 2011)

ในปี 2010, Yanping Tian และคณะได้ทำการศึกษา ผลของการติดเชื้อไวรัส DENV-2 ในเซลล์ตับ HepG2 กับระดับของ intracellular ของ host cell โดยใช้ Colorimetric Assay ในการวัดระดับของ glutathione พบว่าการติดเชื้อ DENV-2 ทำให้มีการลดลงของระดับ intracellular GSH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ Yanping Tian และคณะ ศึกษาโดยใช้ buthionine sulfoximine (BSO) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น intracellular glutathione (GSH) inhibitor ทำให้มีการลดลงของระดับ intracellular GSH มีผลทำให้การทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้นและมีการเพิ่มจำนวนของ virus production ทำให้มีการลดลงของระดับ intracellular GSH (Tian Y, 2010) จึงสอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ที่ผลของ NAC สามารถลดจำนวนของไวรัส (DENV production) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า NAC มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ แต่กลไกแอนติออกซิแดนท์ของ NAC ต่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสแดงที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตไวรัสแดงก็ต้องมีการศึกษาต่อไป

เมื่อร่างกายเราอยู่ในภาวะปกติในร่างกายจะมีสารกลุ่มแอนติออกซิแดนท์ในการช่วยกำจัดอนุมูลอิสระต่างๆ ที่จะทำลายให้เซลล์เกิดความเสียหาย อนุมูลอิสระดังกล่าวเกิดจากกระบวนการ Reactive oxygen species (ROS) (Prasad V, 2006)

Reactive oxygen species (ROS) หมายถึง สารก่อปฏิกิริยา ที่ประกอบด้วยอะตอมออกซิเจนที่เป็นสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) และที่ไม่ใช่อนุมูล แต่มีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์หรือถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl) และ ozone (O_3) เป็นต้น ROS ถูกผลิตขึ้นในกระบวนการเผาผลาญอาหาร ในขั้นตอนของปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย ROS ทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ในร่างกาย แต่ ROS สามารถกำจัดได้โดยสารกลุ่มแอนติออกซิแดนท์ในร่างกาย (Prasad V, 2006) เช่น superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione เป็นต้น ROS กระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ในตับ เช่น kupffer cell, hepatocyte และ endothelial cell ได้ (Vrba J, 2002)

โดยสรุป NAC อาจจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแดงที่ผลของ NAC ไม่เพียงลดการบาดเจ็บที่ตับ DENV แต่ยัง ลดผลของไวรัสแดงที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ ลดการผลิตไวรัสแดงที่ในเซลล์ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สนับสนุนโดย Mahidol University Grant แก่ รศ.ดร.นพ.ถาวรชัย ลิ้มจินดาพร ภาควิชากาย-วิภาคศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

- Clyde K, Kyle JL, Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 80: 11418–31.
- Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet M-T-R-S, Vachon F, Henin D, et al. 1999. Report of a fetal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Human Pathology*. 30(9):1-5.
- Geiler J, Michaelis M, Naczk. 2009. N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochem Pharmacol*. 79:413-20.
- Grace Lim. 2012. N-acetylcysteine in Children with Dengue-associated Liver Failure: A Case Report. *J Trop Pediatr*. 58 (5): 409-413.
- Hadinegoro SRS. 2012. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified?. *Paediatrics and International Child Health*. 32:33-8.
- Huerre MR, Lan NT, Marianneau P. 2001. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch*. 438:107–15
- Kerksick C, Willoughby D. 2005. The antioxidant role of glutathione and N-Acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Jissn*. 2:38-44.
- Klassen P, Biesalski HK, Mazariegos M. 2004. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidant. *Nutrition*. 20:542-7.
- Kumarasena RS, Senanayake M, Sivaraman K. 2010. Intravenous N-acetylcysteine in dengue-associated acute liver. *Hepatology Int*. 533-4.
- Lim G, Lee JH. 2011. N-acetylcysteine in Children with Dengue-associated Liver Failure: A Case Report. *J Trop Pediatr*. 1-5.
- Martins SdT, Silveira GF, Alves LR. 2012. Dendritic cell apoptosis and the pathogenesis of dengue viruses. 4:2736-53
- McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H. 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and Infection*. 2:1041-50
- Mumtaz K, Azan Z, Hamid S. 2009. Role of N-acetylcysteine in adults with non-acetaminophen-induce acute liver failure in a center without the facility of liver transplantation. *Hepatology Int*. 3:563-70.
- Prasad V, Chande A, Jagtap JC. 2006. ROS-triggered caspase 2 activation and feedback amplification loop in β -carotene-induce apoptosis. *j freeradbiomed*. 41:431-42
- Tavodova M. 2012. Dengue fever. *SSMJ*. 5:1-4.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agent: Mechanism and actions. *Mutation Research*. 579:200-13.
- Tso P, Mc J. The anatomy of the liver. The physiology of the liver p. 514-25.
- Tian Y, Jiang W, Gao N. Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. *BBRC*. 2010; 397: 420-4.
- Vrba J, Modrianský M. 2002. Oxidative burst of kupffer cells: target for liver injury treatment. *J Vrba, M Modrianský*. 146(2): 15–20

Weaver SC, Vasilakis N. 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contribution of phylogenetics to understanding to history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. 9:523-40.

Whitehorn J, Simmons CP. 2011. The pathogenesis of dengue. Vaccine. 29:7221-8.

Zafarullaha M, Lia WQ, Sylvestera J, M.Ahmadb. Molecular mechanisms of N- acetylcysteine actions. CMLS. 2003; 60:6-20.