

Terapijska vrijednost N-acetilcisteina u liječenju virusnih akutnih respiratornih infekcija

Musa, Petar

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:758738>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Petar Musa

**Terapijska vrijednost N-acetilcisteina u liječenju virusnih akutnih
respiratornih infekcija**

Diplomski rad



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Klinici za unutarnje bolesti, Zavodu za kliničku farmakologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora prof.dr.sc. Roberta Likića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

Popis kratica i pokrata

Kratice	CD4 ⁺ – pomogačka stanica T	IL-1β – interleukin 1β
dr. – doktor	Cl – plazmatski klirens (oteredba)	IL-2 – interleukin 2
itd. – i tako dalje	C _{max} – vršna koncentracija u plazmi	IL-6 – interleukin 6
npr. – na primjer	COVID-19 – koronavirusna bolest 2019	IL-8 – interleukin 8
prof. – profesor	CRP – C-reaktivna bjelančevina	IL-10 – interleukin 10
sc. – znanosti	CT – kompjutorizirana tomografija	IL-12 – interleukin 12
sur. – suradnici	CXCL2 – CXC-kemokinski ligand 2	IL-17 – interleukin 17
tj. – to jest	CXCL10 – CXC-kemokinski ligand 10	IL-18 – interleukin 18
tzv. - takozvani	DNA – deoksiribonukleinska kiselina	IRF3 – interferonski regulacijski čimbenik 3
Pokrate	fe – udio doze koji se neizmijenjen izlučuje u urin	LD ₅₀ – doza smrtonosna za 50% jedinki
ATP – adenzin-trifosfat	H ₂ O ₂ – vodikov peroksid	LDH – laktat-dehidrogenaza
ARDS – akutni respiratorni distresni sindrom	H ₂ S – sumporovodik	MAPK – bjelančevinska kinaza aktivirana mitogenom
ASK1 – kinaza koja regulira apoptotski signal 1	HO-1 – hem-oksigenaza 1	mRNA – glasnička RNA
AST – aspartat-aminotferaza	ICAM-1 – međustanična prijanjajuća molekula 1	NAC – N-acetilcistein
CCL4 – CC-kemokinski ligand 4	IκB – inhibitor NF-κB	Na ₂ S – natrijev sulfid
CCL5 – CC-kemokinski ligand 5		NF-κB – jezgrin čimbenik κB
		NLRP3 – član porodice NOD-u sličnih receptora koji sadrže pirinsku domenu 3

Nrf2 – čimbenik koji je povezan s jezgrinim čimbenikom eritroid-2 2

p38 – članovi porodice MAPK-a koji imaju 38kDa

p65 – podjedinica NF- κ B-a od 65kDa

pH – negativan dekadski logaritam množinske koncentracije vodikovih iona u otopini

pK_a – negativan dekadski logaritam disocijacijske konstante kiseline

PO₂/FiO₂ – omjer arterijskoga parcijalnog tlaka kisika i udjela kisika u udahnutom zraku

RIG-I – gen potaknut retinoičnom kiselinom I

RNA – ribonukleinska kiselina

RSV – respiratorni sincicijski virus

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze s reverznom transkriptazom

SARS-CoV-2 – koronavirus teškoga akutnog respiratornog sindroma 2

SOD – superoksid-dismutaza

SOFA – slijedna procjena organskoga zatajenja

t_{1/2} – vrijeme poluiščežavanja iz tijela (vrijeme poluživota)

T_H17 – pomagačke stanice T 17

TLR3 – Tollu sličan receptor 3

t_{max} – vrijeme potrebno da se dosegne vršna koncentracija u plazmi

TNF- α – čimbenik tumorske nekroze

T_{reg} – regulacijske pomagačke stanice T

V – obujam (volumen) raspodjele

Sadržaj

Sažetak

Summary

1.	Uvod	1
2.	Farmakokinetika	2
3.	Farmakodinamika	4
3.1.	Molekularni mehanizmi	4
3.1.1.	<i>Reducens disulfida</i>	4
3.1.2.	<i>Čistač oksidansa</i>	5
3.1.3.	<i>Obnavljač glutationa</i>	5
3.1.4.	<i>Izvor sumporovodika</i>	6
3.2.	Štetni učinci i sigurnost	7
3.3.	Učinak u virusnoj infekciji	9
3.3.1.	<i>Učinak na virusno umnažanje</i>	9
3.3.2.	<i>Učinak na stanične vjesničke putove i upalne posrednike</i>	10
3.3.3.	<i>Učinak na funkciju i novačenje leukocita</i>	12
3.3.4.	<i>Učinak na preživljenje stanica i tkivno oštećenje</i>	13
4.	Ispitivanja	15
4.1.	Ispitivanja na životinjama	15
4.2.	Klinička ispitivanja	16
4.2.1.	<i>Infekcije gornjeg respiratornog sustava</i>	16
4.2.2.	<i>COVID-19</i>	18
4.2.3.	<i>Infekcije respiratornog sustava u pedijatrijskoj populaciji</i>	20
5.	Rasprava	22
6.	Zaključak	24
7.	Zahvala	25
8.	Literatura	26

Sažetak

Naslov rada: Terapijska vrijednost N-acetilcisteina u liječenju virusnih akutnih respiratornih infekcija

Ime i prezime autora: Petar Musa

N-acetilcistein (NAC) stari je lijek koji se koristi i ispituje u liječenju brojnih bolesti i stanja, a između ostaloga i u liječenju virusnih akutnih respiratornih infekcija. Prolazi kroz opsežan metabolizam prvoga prolaska te ima nisku oralnu bioraspodivnost. Opsežno se veže za plazmatske bjelančevine, a udio doze koji se neizmijenjen izluči urinom je malen. Iako prvotno namijenjen kao mukolitik, pokazuje antioksidativna, citoprotektivna i antivirusna svojstva. Davatelj je sumporovodika (H_2S), odnosno povisuje unutarstanične razine H_2S -a te preko njega ostvaruje svoje djelovanje stvarajući sulfanske sumporne spojeve. U istraživanjima na kulturama stanica NAC je smanjio stvaranje kisikovih radikala i utjecao na aktivaciju transkripcijskih čimbenika, poput Nrf2, NF- κ B i IRF3. N-acetilcistein je tako djelovao kao imunomodulator, smanjujući lučenje proupalnih citokina, smanjujući kemotaksiju leukocita i potičući funkciju regulacijskih limfocita T, a uz to je ometao virusno umnažanje te je inhibirao apoptozu, promičući stanično preživljenje. Siguran je za populaciju stariju od dvije godine i dobro se tolerira, čak i pri visokim dozama. Ispitivanja na životinjama uglavnom pokazuju njegove povoljne učinke. Klinička ispitivanja, iako ukazuju na moguću korist NAC-a, pogotovo u liječenju blažih oblika upale pluća te u prevenciji akutnih infekcija gornjega respiratornog sustava, zasada ne daju konačan odgovor. Manjak je kvalitetnih istraživanja s velikim uzorcima koja bi nepobitno pokazala njegovu djelotvornost. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se ustvrdila vrijednost NAC-a u liječenju virusnih akutnih respiratornih infekcija.

Ključne riječi: N-acetilcistein, virusna infekcija, COVID-19, farmakokinetika, sumporovodik

Summary

Title: Therapeutic value of N-acetylcysteine in the treatment of viral acute respiratory infections

Author: Petar Musa

N-acetylcysteine (NAC) is an old drug that is used and studied in the treatment of many condition and illnesses, some of which are viral acute respiratory infections. It undergoes extensive first-pass metabolism and has a low oral bioavailability. It binds extensively to plasma proteins and the fraction of the dose excreted unchanged into urine is small. Tough initially intended as a mucolytic, it shows antioxidant, cytoprotective and antiviral properties. It is a hydrogen sulfide (H₂S) donor, that is, it raises intracellular H₂S levels by which it exerts its effects through the creation of sulfane sulfur species. In cell culture studies, NAC reduced reactive oxygen species generation and affected the activation of trascription factors, such as Nrf2, NF-κB and IRF3. It acted as an immunomodulator by reducing proinflammatory cytokine excretion, reducing leukocyte chemotaxis, and promoting the function of regulatory T lymphocytes. It also inhibited viral replication and apoptosis, promoting cell survival. It is safe in a population older than two years of age and is well tolerated, even at high doses. Trials on animals mostly show its beneficial effects. Clinical trials, although they indicate its possible use, especially in the treatment of milder forms of pneumonia and prevention of acute infections of the upper respiratory system, as of yet don't give a definitive answer. There is a lack of good quality studies with large samples that would undeniably show its effectiveness. Further research is needed to establish NAC's value in the treatment of viral acute respiratory infections.

Key words: N-acetylcysteine, viral infection, COVID-19, pharmacokinetics, hydrogen sulfide

1. Uvod

N-acetilcistein (u daljnjem tekstu NAC) acetilirani je derivat, a ujedno i prethodnik, cisteina [1]. Njegova je molekularna formula $C_5H_9NO_3S$, a ime po IUPAC-u (2R)-2-acetamid-3-sulfanilpropanska kiselina [2]. Male količine endogenoga NAC-a prisutne su u ljudskoj plazmi [3].

Patentiran je 28. svibnja 1963. godine kao mukolitik [4]. Američki ga je FDA odobrio, također kao mukolitik, 14. rujna iste godine [5]. Nalazi se na Osnovnoj listi lijekova Svjetske zdravstvene organizacije kao lijek za liječenje otrovanja paracetamolom [6].

Ispitivao se za liječenje i koristio u liječenju brojnih bolesti: kronična opstruktivna plućna bolest [7], cistična fibroza [8], akutni bronhitis [9], akutni rekurentni rinosinuzitis [10], akutni respiratorni distresni sindrom [11,12], otrovanje paracetamolom [13,14], sindrom policističnih jajnika [15], stabilna angina pectoris [16], ishemijsko-reperfuzijska ozljeda srca [17], nefropatija uzrokovana radiokontrastom [18,19] i dr. [20].

U Hrvatskoj je registriran kao mukolitik te je dostupan kao bezreceptni lijek, a dostupan je i kao dodatak prehrani [21,22]. U razdoblju od 2004. do 2015. godine bio je među 15 najčešćih peroralnih bezreceptnih lijekova u Hrvatskoj [23].

2. Farmakokinetika

N-acetilcistein posjeduje sulfhidrilnu skupinu te lako oksidira stvarajući spojeve s cisteinom i N-acetilcisteinom, N-acetilcistin i N,N-diacetilcistin [1,24,25]. N,N-diacetilcistin se za vrijeme prolaska tankim crijevom reducira pomoću cistin-reduktaze na NAC koji se onda posredstvom amino-acilaze cijepa na cistein i acetat [26]. Holdiness u svom radu navodi kako su DeCaro i sur. pokazali da oralno uzet NAC prolazi kroz brz i opsežan metabolizam u jetri i crijevnoj stijenci rezultirajući niskom bioraspoloživošću [27], a do istoga zaključka dolaze i drugi istraživači u svojim radovima [3,28,29]. Olsson i sur. pokazali su da se NAC opsežno veže za bjelančevine plazme. Četiri sata od davanja intravenske doze do 50% ukupnoga plazmatskog NAC-a prisutno je u obliku kovalentno vezanom za bjelančevine [29]. Osim s bjelančevinama, NAC reagira s endogenim tiolima i disulfidima niske molekularne težine stvarajući spojeve s njima, tzv. miješane disulfide [30].

U tri istraživanja koja su mjerila bioraspoloživost, prosječne vrijednosti kretale su se između 7 i 10% za ukupni lijek, dok Olsson i sur. još navode i prosječnu vrijednost bioraspoloživosti od 4% za reducirani oblik NAC-a [28-30]. Gabard i Mascher tvrde da bi bioraspoloživost NAC-a mogla biti još i niža temeljem nižih izmjerenih vrijednosti vršne koncentracije u plazmi te površine ispod krivulje koncentracija-vrijeme što oni pripisuju korištenju drugačije metode mjerenja koja je osjetljivija i specifičnija [3].

Prosječne vrijednosti vršne koncentracije NAC-a u plazmi (C_{max}) nakon uzimanja otopine NAC-a od 600mg kretale su se između 2,41 μ g/ml i 2,76 μ g/ml, a prosječne vrijednosti vremena potrebnoga da se dosegne C_{max} (t_{max}) bile su između 0,65h i 1,01h [28,31]. Prosječne vrijednosti t_{max} za formulacije NAC-a od 600mg s odgođenim otpuštanjem iznosile su 1,9h u oba istraživanja [28,32].

Kod obujma raspodjele (V) postoje razilaženja među autorima. Noviji radovi navode prosječne vrijednosti V -a (za referentnoga čovjeka od 70kg) od preko 1000L (1250-1720L) što govori da je lijek dospio do dubokih tkivnih odjeljaka [33,34]. Stariji pak radovi navode prosječnu vrijednost V manju od 50L (18,5-41L) što govori da se lijek uglavnom zadržava u odjeljku izvanstanične tekućine [28-30]. Autori novijih radova ne komentiraju neusuglašenost svojih rezultata s onima starijih radova. S obzirom na činjenicu da je NAC molekula male molekularne težine te da posjeduje i karboksilnu i sulfhidrilnu skupinu, za očekivati je izrazito hidrofilnu narav NAC-a što vrijednost V od preko 1000L čini malo vjerojatnom. Stvarna vrijednost V vjerojatno odgovara pronađenim vrijednostima starijih radova.

Kod vremena poluiščezavanja iz tijela ($t_{1/2}$) opet postoji nesuglasje među autorima. Papi i sur. te Greene i sur. pronalaze znatno dulje $t_{1/2}$ (15,4-18,1h) nego li prijašnja istraživanja, čije se prosječne vrijednosti kreću između 1,21h i 6,25h. Papi i sur. u raspravi svoga rada pretpostavljaju da bi to moglo

biti do duljine razdoblja prikupljanja uzoraka. Naime, Papi i sur. su prikupljali uzorke kroz 36 sati i taj podatak suprotstavljaju razdoblju prikupljanja Olssona i sur. te Borgströma i sur. od 12 sati, i razdoblju prikupljanja Liuja i sur. od 24 sata. Ne navode istraživanja Greenea i sur., koji su prikupljali uzorke kroz 48 sati i dobili prosječne vrijednosti $t_{1/2}$ od 17,5h i 18,1h, zatim Nolina i sur. koji su uzorkovali kroz samo 8 sati i dobili prosječnu vrijednost od 3,7h te ono Gabarda i Maschera koji su uzorkovali 12 sati i dobili prosječne vrijednosti od 1,9 i 1,92h. Podatci tih navedenih istraživanja isto govore u prilog pretpostavci Papija i sur. Kao dodatan mogući razlog razlika između svoga istraživanja i onoga Borgströma i sur., Papi i sur. također navode činjenicu da su plazmatske bjelančevine u Borgströmovom istraživanju precipitirane prije nego li su se disulfidne veze reducirale što bi potencijalno moglo utjecati na rezultate [3,29,31-34].

Kod plazmatskoga klierensa (Cl) uglavnom postoji slaganje svih radova. Prosječne vrijednosti Cl -a (za referentnoga čovjeka mase 70kg) uglavnom se kreću u rasponu od 56L/h do 65L/h, dok su Cotgreave i Moldéus na jednom zdravom ispitaniku dobili vrijednost od 44,1L/h za reducirani oblik NAC-a, no ta vrijednost ulazi u standardnu devijaciju vrijednosti drugih radova pa se može pripisati biološkoj raznolikosti. Olsson i sur. te Cotgreave i Moldéus u svojim su radovima zasebno računali klirens za reducirani (slobodni) oblik, a posebno za ukupni NAC, tj. onaj koji uključuje NAC vezan za plazmatske bjelančevine i druge spojeve disulfidnim vezama. Olsson i sur. dobili su prosječnu vrijednost Cl -a od 58,8L/h za reducirani NAC te 7,7L/h za ukupni NAC. Cotgreave i Moldéus dobili su vrijednost od 9,1L/h za ukupni NAC. Nalazi ovih dvaju istraživanja ukazuju na to da su istraživači u ostalim radovima zapravo mjerili Cl reduciranoga oblika NAC-a. Jedini rad koji odstupa jest onaj Borgströma i sur. koji navodi prosječnu vrijednost Cl -a od 14,5L/h. Taj bi se nalaz mogao objasniti time da Borgström i sur. u svom istraživanju ne razlikuju slobodni od vezanoga oblika NAC-a i činjenicom da su radili na deproteiniziranoj plazmi te tako precipitiranjem bjelančevina otplavili jedan dio NAC-a [28-30,32-34].

Papi i sur. u svojem istraživanju navode udio doze izlučene u urin (fe) od 3,66% za kineske ispitanike te 3,8% za bjelačke ispitanike, dok Borgström i sur. navode fe od 28%. Cotgreave i Moldéus izolirali su ekstremno niske količine slobodnoga NAC-a u urinu, manje od 1% intravenski dane doze, ali su izolirali čak 20% doze lijeka kao NAC u vezanom obliku. Vjerojatno objašnjenje razlika prva dva istraživanja jest da su Papi i sur. mjerili slobodni NAC u urinu, a Borgström i sur. ukupni NAC u urinu [28,30,34]. Cotgreave i Moldéus zaključuju, s obzirom na niski fe , da glavnu ulogu u klirensu lijeka igraju metabolički procesi [30].

3. Farmakodinamika

3.1. Molekularni mehanizmi

Dobro je poznato da NAC ima antioksidativno i citoprotektivno djelovanje, a prvobitno je bio registriran kao mukolitik te se još uspješno koristi i kao antidot za otrovanje paracetamolom. No, točni mehanizmi njegovoga djelovanja predmet su rasprave [35,36]. Pedre i sur. u svom preglednom radu postavljaju tri ustaljene teorije mogućega NAC-ovoga mehanizma: reducens disulfida, čistač oksidanasa i obnavljač glutaciona. Donose i alternativnu teoriju, naime, da je NAC izvor sumporovodika i sulfanskih sumpornih spojeva [35].

3.1.1. Reducens disulfida

N-acetilcistein ulazi u reakcije tiol-disulfidne razmjene reducirajući disulfidne veze bjelančevina i stvarajući pritom miješane disulfide s bjelančevinama. Tako bi NAC, primjerice, mogao reducirati međulančane disulfidne veze mukoznih bjelančevina te posljedično razvodniti bronhalnu sluz [1,37]. Pokusi su 60-ih godina prošloga stoljeća pokazali njegovo mukolitičko djelovanje *in vitro* [38] te *in vivo* kada je lokalno primijenjen u pluća kao 20%-tna (0,21g/ml) otopina u nebuliziranom obliku ili intratrahealnim kateterom [39].

Međutim, NAC je neučinkovit u redukciji disulfida jer je, zbog visoke vrijednosti pK_a sulfhidrilne skupine (9,43-9,85), pri fiziološkom pH vrlo malo NAC-a u obliku tiolata, tj. u aktivnom obliku [40-43]. Konstanta brzine te reakcije je niska [44]. U usporedbi s drugim fiziološkim tiolima, npr. cisteinom i glutationom, pK_a NAC-a je viši, a konstanta brzine reakcije je niža [42,45].

Potrebne su stoga visoke koncentracije NAC-a za zamjetljive reducirajuće učinke [43,44,46]. Ove činjenice objašnjavaju zašto skorašnja istraživanja nisu uspjela pokazati NAC-ovu učinkovitost na razvodnjavanje bronhalne sluzi [47,48].

3.1.2. Čistač oksidanasa

Pod ovim se pojmom podrazumijeva izravno, nekatalizirano čišćenje oksidansa. Istraživanja su 80-ih godina prošloga stoljeća pronašla njegove citoprotektivne i antioksidativne učinke na kulturama stanica što se onda objašnjavalo NAC-ovom sposobnošću čišćenja oksidanasa [49-51].

No, ispada da je NAC poprilično loš izravan čistač oksidansa. Sporo, ako uopće, reagira sa superoksidom, a također sporo reagira i s vodikovim peroksidom [42,53]. Brzo pak reagira s hidroksilnim radikalom, ali hidroksilni radikal je vrlo reaktivan pa s mnogim biomolekulama brzo reagira [52,54-57]. Brzo još reagira i s hipokloritnom kiselinom, no ipak sporije od cisteina, glutaciona i metionina [58]. U istraživanju Medveda i sur. zdravim su pojedincima davali intravensku infuziju NAC-a od 31,25mg/kg kroz 15 minuta, a nakon toga su davali konstantu infuziju od 25mg/kg/h te su postigli koncentraciju NAC-a u eritrocitima od 38,9µg/ml [59]. Međutim, prosječna koncentracija glutaciona u eritrocitima je više no 6 puta viša, otprilike 250µg/ml [60].

Stoga je, s obzirom na njegovu sporu kinetiku prema radikalima pri fiziološkom pH, a pogotovo kada se uspoređi s učinkovitim enzimskim sustavima [61,62], te na prenisku koncentraciju koju je moguće postići u terapijskim uvjetima, ideja da NAC može biti značajan izravan čistač oksidanasa pri terapijskim koncentracijama u potpunosti neutemeljena. Vjerojatnije je da su njegovi citoprotektivni i antioksidativni učinci prouzročeni nekim drugim mehanizmom.

3.1.3. Obnavljač glutaciona

Učinak NAC-a na sprječavanje jetrenoga oštećenja i drugih posljedica otrovanja paracetamolom dobro je poznat [6,13,14].

Toksični metabolit paracetamola, N-acetil-p-benzokinon-imin, smanjuje razine glutaciona u stanici vežući se za njega i oksidirajući ga [63,64]. U nedostatku glutaciona i njegovoga zaštitnog učinka dolazi do staničnoga oštećenja: N-acetil-p-benzokinon-imin veže se za tiolne skupine bjelančevina, remeteći njihovu funkciju, te dolazi do nastupa oksidativnoga stresa u hepatocitima [64-67]. Korištenjem tvari koje potiču stvaranje glutaciona sprječava se smanjenje njegovih razina te se tako sprječavaju štetni učinci predoziranja paracetamolom. Jedna od tih tvari je i NAC [68-70].

N-acetilcistein potiče stvaranje glutaciona pružajući cistein glutamat-cistein-ligazi, enzimu koji katalizira prvi korak u sintezi glutaciona, a upravo je dostupnost cisteina ograničavajući korak sinteze glutaciona [44,69,71]. Davanje NAC-a bilo oralno, bilo intravenski, povisuje plazmatske i stanične

razine cisteina, ali ne i glutaciona. No, ako se on da nakon primjene paracetamola, tada sprječava sniženje razina i cisteina i glutaciona [59,72,73].

Dva su moguća mehanizma kojima NAC može povisiti unutarstaničnu razinu cisteina. Prvi mehanizam jest izravan ulazak NAC-a u stanicu u kojoj je podvrgnut deacetilaciji aminoacilazom 1, posljedično oslobađajući cistein. No, ulazak NAC-a u stanice je spor te aminoacilaza ima i niski afinitet za NAC i nisku aktivnost pa su za jednaki učinak sinteze glutaciona potrebne otprilike 20 puta veće plazmatske koncentracije NAC-a nego li cisteina [74,75]. Drugi mehanizam jest neizravno povećanje koncentracije plazmatskoga cisteina oslobađanjem iz cistina i plazmatskih bjelančevina, poglavito albumina, putem reakcija tiol-disulfidne razmjene. Cistein onda ulazi u stanice i sudjeluje u sintezi glutaciona [44,45,76]. To je glavni mehanizam kojim NAC povisuje razinu cisteina u stanicama [77].

Iako obnavlja glutacion u uvjetima njegova manjka, NAC ne povisuje njegove razine pod normalnim okolnostima ili povisi tek neznatno [73,78-81]. Doduše, visoke doze NAC-a, iako u normalnim okolnostima ne povisuju razine glutaciona, mogu povećati udio reduciranoga oblika [82]. No, uočeno je da NAC ima povoljne učinke čak i kada je obnova glutaciona zaustavljena [83-86]. Prema tomu, molekularni mehanizam obnove glutaciona ograničen je na patološka stanja njegova manjka te se NAC-ovi antioksidativni i citoprotektivni učinci u uvjetima uredne stanične razine glutaciona moraju objasniti nekim drugim mehanizmom.

3.1.4. Izvor sumporovodika

U mnogim tkivima u tijelu H_2S se normalno stvara iz cisteina [87,88]. Davanje egzogenoga cisteina *in vivo* povećava proizvodnju H_2S -a [89]. Dodavanje pak cisteina i NAC-a, prekursora cisteina, kulturi stanica, povećava u njima proizvodnju H_2S -a [90,91].

Sumporovodik je fiziološka molekula uključena u mnoge bitne fiziološke procese u tijelu [92-94]. Ovo su neki od njegovih učinaka: potiče proizvodnju glutaciona (ovo bi mogao biti dodatan NAC-ov mehanizam povišenja glutaciona) [95], izravan je čistač oksidanasa [95-97], modulira ionske kanale [98], dilatator je krvnih žila [99], inhibira adheziju leukocita [100], inhibira učinke $TNF-\alpha$ [101], modulira djelovanje transkripcijskoga čimbenika $NF-\kappa B$ [102,103] te aktivira transkripcijski čimbenik Nrf2 [104].

Jedan od mehanizama kojim H_2S ostvaruje ove učinke jest putem njegovih oksidacijskih produkata, sulfanskih sumpornih spojeva [35]. Sulfanski sumporni spojevi su spojevi gdje je dvovalentni sumporni atom spojen s drugim sumporom: persulfidi, polisulfidi, tiosulfati, polisulfinati, politionati i elementarni sumpor [105]. Sumporovodik se oksidira te s cisteinskom sulfhidrilnom skupinom stvara

persulfid (-SSH) mijenjajući tako funkciju bjelančevina [106]. Neki primjeri učinka persulfidacije na bjelančevine uključuju persulfidaciju NF- κ B koja potiče njegovo antiapoptotičko djelovanje [103], te persulfidaciju kalijских kanala osjetljivih na ATP koja ih otvara, dovodeći tako do smanjenja leukocitne infiltracije te opuštanja glatkoga mišićja krvnih žila i posljedične vazodilatacije [100,107] (Zhao i sur. također navode kako H₂S otvara kalijске kanale, no ne spominju persulfidaciju [99]). Mnoge su još bjelančevine mete persulfidacije [94], a osim funkcionalne modulacije, H₂S persulfidacijom štiti bjelančevine od oksidativnoga djelovanja. Naime, oksidativna i elektrofilna promjena persulfida je povratna, za razliku od odgovarajuće promjene tiola koja je nepovratna [108].

Dodavanje NAC-a kulturi stanica, ne samo da povećava proizvodnju H₂S-a [90,91], već povisuje i razinu sulfanskih sumpornih spojeva [91,109]. U istraživanju Zanarda i sur. NAC-ov učinak na otvaranje kalijских kanala osjetljivih na ATP zaustavljen je inhibicijom cistationin- γ -liaze, enzima koji iz cisteina proizvodi H₂S [87,88], te glibenklamidom, antagonistom tih kanala [100], što, imajući na umu činjenice da NAC uzrokuje persulfidaciju u staničnoj kulturi te da persulfidacija kanala uzrokuje njihovo otvaranje [107], govori da je NAC-ovo aktivirajuće djelovanje na kanale upravo posredovano persulfidacijom. Ezeriņa i sur. u svom su istraživanju pokazali zaštitu od akutnoga peroksidnog stresa, izazvanoga ne samo NAC-om, već i drugim persulfidirajućim tvarima, cisteinom, 3-merkaptopiruvatom i Na₂S-om [91]. S obzirom na to da je NAC dokazani izvor H₂S-a i sulfanskih sumpornih spojeva u stanicama, da se inhibicijom proizvodnje H₂S-a mogu poništiti njegovi učinci te da jednaki učinak imaju i druge tvari koje su također izvori H₂S-a i sulfanskih sumpornih spojeva, pravo je dakle slutiti da je ovo glavni mehanizam NAC-ovih citoprotektivnih i antioksidativnih učinaka u stanicama.

3.2. Štetni učinci i sigurnost

N-acetilcistein je siguran i dobro se tolerira, čak i pri visokim dozama. Od nuspojava se navode gastrointestinalne i alergijske nuspojave, s tim da su gastrointestinalne češće pri oralnoj primjeni, a alergijske pri intravenskoj primjeni [110-112]. U istraživanju Greenea i sur. ispitivanicima je dana jednokratna oralna doza od 11g te je dostignuta prosječna vršna koncentracija u plazmi bila 26,5 μ g/ml u jednoj, te 28,4 μ g/ml u drugoj skupini. Zabilježene su nuspojave bile blage, uglavnom probavnoga sustava, poput nadutosti, proljeva, mučnine i povraćanja [33]. Slična oralna doza bila je u istraživanju Ferreira, Campbella i Reida i iznosila je 0,14mg/kg. Koncentracija NAC-a u plazmi nije bila mjerena, a zabilježene su nuspojave, poput istraživanja Greenea i sur., pretežno zahvaćale gastrointestinalni sustav te su bile blage, poput nelagode, nadutosti i mučnine, a zabilježen je i metalan okus. Zamjetno je manje nuspojava bilo pri primjeni doze od 0,07g/kg [82]. U istraživanju Medveda i sur.

intravenskom su primjenom postigli prosječnu plazmatsku koncentraciju NAC-a od 27,76mg/ml. Zabilježene su samo blage alergijske nuspojave, poput crvenila kože, oticanja te kašlja [59]. Siguran je u djece starije od dvije godine [9], no u djece mlađe od dvije godine može uzrokovati respiratorne simptome, poput zaduhe, bronhoreje, bronhospazma, kašlja i ARDS-a [113].

Ovakav sigurnosan profil (u starijih od dvije godine) je neočekivan s obzirom na to da je NAC izvor cisteina i H₂S-a. Sumporovodik je odavna prepoznat kao otrovan plin te pri visokim koncentracijama izaziva škodljive učinke, no tek relativno nedavno se spoznalo da pri niskim koncentracijama izaziva povoljne učinke [114,115]. Kada se primijeni u visokim koncentracijama, djeluje kao nekompetitivan inhibitor citokrom-c-oksidade [116,117]. Pri visokim tkivnim razinama cisteina dolazi do povećane proizvodnje H₂S-a i posljedične inhibicije citokrom-c-oksidade [118,119]. Neki od ozbiljnih simptoma trovanja sumporovodikom su sljedeći: plućni edem, anksioznost, glavobolja, ataksija, vrtoglavica, tahipneja, poremećaj svijesti, depresija središnjega živčanog sustava, respiratorna paraliza, aritmije, smrt [120]. Cistein, osim što povisuje H₂S, je neurotoksičan u visokim koncentracijama [121].

Sprince i sur. izvještavaju u svojem istraživanju vrijednost LD₅₀ od 1,9g/kg (15,7mmol/kg) pri oralnoj primjeni u odraslih štakora [122]. White i sur. u svojem su istraživanju izvijestili vrijednost LD₅₀ od 1,1g/kg (9mmol/kg) za intravensku primjenu u novorođenih štakora (2 dana) [123]. Karlsen i sur. u svom su istraživanju dali supkutanu injekciju cisteina u dozi od 1,2g/kg novorođenim štakorima (4 dana) te su imali približnu smrtnost od 50% u prvih 48 sati po injekciji. Od preživjelih štakora, 90% ih je imalo nekakvo oštećenje mozga [124]. U istraživanju Strubelta i sur. autori su pronašli vrijednost LD₅₀ za cistein od 0,7g/kg (5,8mmol/kg) pri intraperitonealnoj injekciji u muških miševa [125]. U „Registry of toxic effects of chemical substances” navodi se japansko istraživanje koje izvještava LD₅₀ vrijednosti kod intraperitonealne primjene od 1,4g/kg (11,6mmol/kg) za miševе i 1,6g/kg (13,2mmol/kg) za štakore te kod supkutane primjene, a navodi se još jedno istraživanje koje izvještava LD₅₀ vrijednost oralne primjene cisteina u štakora od 5,6g/kg (46,2mmol/kg) [126].

Vezano za toksičnost NAC-a, u registru se navodi jedno istraživanje koje je pokazalo LD₅₀ vrijednost od 7,9g/kg (48,4mmol/kg) u miševa za oralnu primjenu NAC-a, te se navodi još jedno istraživanje gdje je LD₅₀ vrijednost u miševa pri supkutanoj primjeni bila 0,4g/kg (2,5mmol/kg) [127]. U istraživanju Martina i sur. pronađen je LD₅₀ intravenski primjenjenoga NAC-a od 2,55g/kg (15,6mmol/kg) u odraslih muških štakora te 3,8g/kg (23,3mmol/kg) u odraslih muških miševa [128]. Pedre i sur. navode kako su Bonanomi i Gazzaniga u svom istraživanju pokazali da se u štakora toksični učinci NAC-a javljaju tek pri vrlo visokim dozama, iznad 6g/kg (36,8mmol/kg) nakon oralne primjene te iznad 2g/kg (12,3mmol/kg) nakon intravenske primjene [35]. Goldenthal u svojoj kompilaciji LD₅₀ vrijednosti navodi vrijednosti od 5g/kg (30,6mmol/kg) za oralnu primjenu u štakora starih između 80 i 100 dana te LD₅₀ >2,5g/kg (15,3mmol/kg) za oralnu primjenu u novorođenih štakora (1-2 dana) [129].

Dilger i sur. u svom su istraživanju hranili piliće krmivom s različitim udjelom cisteina. Pri koncentraciji cisteina u krmivu od 30 grama po kilogramu krmiva (30g/kg) nakon 5 dana uginulo je 50% (6/12) pilića. Pri koncentraciji cisteina od 40g/kg nakon 5 dana uginulo je 92% pilića (11/12). U drugom su istraživanju Dilger i Baker zamijenili cistein NAC-om u izomolarnim koncentracijama, i iako je pri tim visokim koncentracijama NAC-a zamijećeno smanjeno dobivanje tjelesne mase, NAC nije izazvao smrtni ishod u pilića [130,131].

Literatura po pitanju *in vivo* toksičnosti cisteina i NAC-a poprilično je slaba, pogotovo usporedna. Radova je malo, mnogi su teško dostupni, dobar dio ih je star, a gdje gdje su oprječni. Ipak, iz vrijednosti svih navedenih radova može se uočiti trend zamjetno manje toksičnosti NAC-a u usporedbi s cisteinom. Pedre i sur. objašnjavaju ovaj fenomen idejom da bi NAC mogao biti spor dostavljač cisteina, a time i H₂S-a, te bi tako visoke koncentracije NAC-a uzrokovale samo umjereno povišenje razine cisteina [35]. Tomu u prilog ide činjenica spore kinetike NAC-ove deacetilacije i reakcije tiol-disulfidne razmjene [45,75]. Iako i NAC i cistein oboje dovode do povišenja razina H₂S-a te do učinaka posredovanih H₂S-om, zbog boljšeg sigurnosnog profila, prednost bi se ipak trebala dati NAC-u u terapijskoj primjeni. Zaključno, NAC je siguran lijek te nema bojazni od ozbiljnih nuspojava pri terapijskim dozama kod pacijenata starijih od dvije godine.

3.3. Učinak u virusnoj infekciji

3.3.1. Učinak na virusno umnažanje

Brojna istraživanja izvještavaju značajan inhibitorni učinak NAC-a i drugih davatelja H₂S-a na virusno umnožanje u *in vitro* uvjetima i to na način ovisan o dozi [132-139]. Ispitivani su sljedeći virusi: virus influence tip A [133,135,136,138,139], virus influence tip B [133,136], respiratorni sincicijski virus [132,134,136,137], drugi paramiksovirusi (ljudski metapneumovirus i Nipahvirus) [132] te drugi RNA virusi (rekombinantni Zair ebolavirus, dalekoistočni tip virusa krpeljnoga meningoencefalitisa, virus krimsko-kongoanske hemoragijske vrućice, virus Rift Valley groznice) [133]. Svi navedeni odreda su negativni jednolančani RNA virusi, osim virusa krpeljnoga meningitisa kojega čini pozitivna jednolančana RNA [140]. Vrijedno spomena je i istraživanje Akhtera i sur. koji su pronašli da kombinacija NAC-a i bromelaina smanjuje umnažanje dvaju različitih sojeva SARS-CoV-2 virusa (+RNA [140]) na način ovisan o dozi, no nisu spomenuli učinak samoga NAC-a na virusno umnažanje bez bromelaina, [141]. Knobil i sur. u svom istraživanju pak tvrde da NAC nije imao učinka na zarazu i umnažanje virusa influence tip A, no nisu priložili podatke [142].

U istraživanjima Lija i sur. te Bazhanova i sur. iz 2018. istraživači su zarazili stanice RSV-om i uočili su da tretiranje kulture davateljem H₂S-a (u dva su istraživanja korištena dva različita davatelja koji nisu bili NAC) ne smanjuje broj genomskih kopija RSV-a niti utječe na izražaj virusnih bjelančevina u stanicama, no dramatično smanjuje broj infektivnih virusnih čestica u staničnom supernatantu te nešto manje kod staničnoga taloga. Temeljem toga Li i sur. zaključuju da H₂S utječe na virusno umnožavanje, dijelom na razini sastavljanja virusnih čestica, ali uglavnom na razini virusnoga izlaska iz stanica [132,134]. U istraživanju Bazhanova i sur. iz 2017. pronađeno je pak da tretman davateljem H₂S-a stanica zaraženih H1N1 podtipom virusa influence tip A podjednako smanjuje virusni titar u staničnom supernatantu i onaj vezan za stanice. Također smanjuje virusnu mRNA i posljedično izražaj virusnih bjelančevina, poput hemaglutinina i neuraminidaze [133]. Nadalje, istraživanje Minga i sur. također izvještava smanjeni izražaj virusnih gena influence u stanica tretiranih davateljem H₂S-a [139,143]. Ovo ukazuje na to da bi kod influence mehanizam inhibicije virusnoga umnažanja također mogao uključivati i ometanje sinteze virusnih bjelančevina.

N-acetilcistein bi također mogao inhibirati ulazak nekih virusa u stanice. U stanicama zaraženih RSV-om NAC je spriječio RSV-om uzrokovano povišenje izražaja ICAM-1, prijanjajuće molekule stanične membrane [137]. ICAM-1 podupire ulazak RSV-a u stanicu vezanjem za virusni glikoprotein F, primjena protutijela na ICAM-1 smanjuje zarazu [144]. Primjena pak davatelja H₂S-a prije virusne adsorpcije ili samo za vrijeme adsorpcije ne utječe na umnažanje virusa [132,134], stoga Bazhanov i sur. zaključuju da davatelji H₂S-a ne utječu na ulazak RSV-a u stanicu. Međutim, kako NAC sprječava povišenje izražaja u kontekstu zaraze, niti ne može imati učinak prije zaraze, pa to ne isključuje sprječavanje povišenja izražaja ICAM-1 kao mehanizam djelovanja na infekciju RSV-om. Valja spomenuti i jedno oprječno istraživanje Jornota i sur. u kojem je tretiranje stanica NAC-om pospješilo ulazak adenovirusnoga vektora i transkripciju ispitivanoga transgena te povisilo razine vektorove bjelančevine, kao i virusne DNA. Autori objašnjavaju pospješeni virusni ulazak povećanim izražajem receptora za Coxsackie B i adenovirus tip 2 i 5 (CAR) na stanicama prethodno tretiranim NAC-om, u usporedbi s netretiranim. Povećan ulazak virusa u stanice povisuje razine njegove DNA u stanicama pa time i prepisivanje te DNA i proizvodnju bjelančevinskih genskih produkata [145].

3.3.2. Učinak na stanične vjesničke putove i upalne posrednike

N-acetilcistein i davatelj H₂S-a spriječili su RSV-om potaknuto sniženje transkripcijskoga čimbenika Nrf2 [137,146]. Nrf2 važan je stoga što potiče prepisivanje mnogih antioksidativnih gena [147]. Izražaj jednoga od tih antioksidativnih gena prilikom zaraze RSV-om, HO-1, ne samo da je bio održan NAC-om, već je tretman NAC-a prouzročio višestruko više razine njegova izražaja u usporedbi s kontrolnim stanicama [137]. N-acetilcistein je također spriječio influencom potaknuto sniženje razina

SOD-a u mišjem plućnom tkivu [148]. Sukladno tomu, istraživanja pokazuju da NAC i davatelj H₂S-a sprječavaju povišenje razina oksidanasa u stanicama prilikom zaraze virusom influence i RSV-om [135-137,142,149]. Mata i sur. su u istraživanju iz 2012. mjerili ukupni antioksidativni status (TAS) zaraženih stanica te su ustanovili sniženje od 21% u usporedbi s kontrolnim stanicama, a koje je NAC u koncentraciji od 0,163mg/ml u potpunosti spriječio. Također je zabilježeno šesterostruko povišenje unutarstaničnih razina H₂O₂ koje je NAC, u koncentraciji od 1,63mg/ml, spriječio u potpunosti [137].

Zna se da kisikovi radikali preko ASK1 aktiviraju p38 MAPK [150,151]. No, dva rada koja izvještavaju o učinku NAC-a na p38 MAPK u kontekstu virusne zaraze su proturječna. Geiler i sur. u svom su istraživanju pronašli da NAC inhibira influencom potaknutu fosforilaciju p38, dok su Kujime i sur. pronašli da NAC nije imao utjecaja na fosforilaciju p38 u stanicama zaraženih influencom [135,152].

Vodikov peroksid također potiče nuklearnu translokaciju NF-κB fosforilacijom IκB i p65 [153,154]. NAC i drugi davatelj H₂S-a smanjili su RSV-om potaknutu fosforilaciju p65 (RelA) podjedinice NF-κB. U oba je istraživanja pak zabilježeno da nije bilo utjecaja na nuklearnu translokaciju NF-κB, no smanjeno je zauzeće promotorskih mjesta NF-κB-om za IL-8 i CCL5 [132,149]. Istraživanje Mate i sur. iz 2011. izvještava, suprotno prethodnim dvama istraživanjima, NAC-ovu inhibiciju translokacije NF-κB u stanica zaraženih RSV-om [136]. U istraživanjima sa stanicama zaraženima virusom influence (različiti podtipovi u sva tri) NAC i drugi davatelj H₂S-a pak pokazuju inhibiciju translokacije NF-κB [133,135,142].

Li i sur. izvještavaju da tretman davateljem H₂S-a u stanicama zaraženima RSV-om nije utjecao na nuklearnu translokaciju transkripcijskoga čimbenika IRF-3, ali je smanjio njegovo zauzeće promotorskih mjesta za IL-8 i CCL5 [132]. Bazhanov i sur. u istraživanju iz 2017. pak izvještavaju da je tretman davateljem H₂S-a u stanicama zaraženima virusom influence smanjio virusom potaknutu nuklearnu translokaciju IRF-3 [134]. Ming i sur. izvještavaju da je primjenom davatelja H₂S-a višestruko smanjen influencom povišen izražaj IRF-3. Osim toga su u svom istraživanju pronašli i višestruko smanjen izražaj influencom povišenoga RIG-I [139,143].

Respiratorni sincicijski virus je putem RIG-I i TLR3 aktivirao NF-κB i IRF-3 [155]. I u tom vjerojatno leži mogući razlog razlikama nuklearne translokacije NF-κB i IRF-3 između zaraze virusom influence i RSV-om. Istraživanja su većinom (osim [136]) pokazala da NAC i davatelji H₂S-a ne smanjuju količinu virusne RNA RSV-a, za razliku od virusa influence [132-139], pa bi smanjena količina virusne RNA u slučaju influence u manjoj mjeri aktivirala RIG-I i TLR3 koji su unutarstanični senzori virusne RNA [156], te bi tako nuklearna translokacija NF-κB i IRF-3 bila smanjena.

Transkripcijski čimbenici NF-κB i IRF-3 odgovorni su za poticanje prepisivanja brojnih proupalnih citokina i upalnih posrednika [156] pa bi se njihovom inhibicijom također inhibiralo prepisivanje i

izlučivanje citokina i posrednika, što istraživanja i pokazuju. Davatelj H₂S-a smanjili su virusima potaknuto povišenje razine mRNA i izlučivanje IL-6 [132,139]. Davatelj H₂S-a također je smanjio influencom potaknuto povišenje razina mRNA TNF- α i IFN β [139]. Davatelj H₂S-a je u jednom istraživanju smanjio RSV-om potaknuto izlučivanje IL-8 [132], a NAC je u dva istraživanja smanjio virusima potaknut izražaj IL-8 [142,149]. Oralno primijenjeni NAC također je smanjio lipopolisaharidom potaknutu limfocitnu proizvodnju TNF- α i IL-8 [157]. U istraživanju Zhanga i sur. NAC je snizio razine TNF- α , IL-1 β i IL-6 u bronhoalveolarnom lavatu miševa zaraženih virusom influence [148].

3.3.3. Učinak na funkciju i novačenje leukocita

N-acetilcistein spriječio je RSV-om potaknuto povišenje izražaja prijanjajuće molekule ICAM-1 na staničnim membranama [137]. Davatelj H₂S-a je u štakora smanjio aspirinom i N-formilmetionin-leucil-fenilalaninom, snažnim kemotatskim peptidom fagocita [158], potaknutu adheziju leukocita, dok je inhibicija endogenoga stvaranja H₂S-a pojačala adheziju. Isto tako, davatelj H₂S-a inhibirao je leukocitnu infiltraciju, dok ju je inhibicija endogenoga stvaranja H₂S-a pojačala [100]. Eylar i sur. pronašli su da je NAC u *in vitro* uvjetima također inhibirao adheziju ljudskih limfocita T [159]. Arranz i sur. davali su oralno NAC postmenopauzalnim ženama kroz dulje vrijeme te su zabilježili smanjenu adherenciju njihovih neutrofila i limfocita [157].

Li i sur. u svom istraživanju izvještavaju da davatelj H₂S-a smanjuje lučenje kemokina u stanicama zaraženima RSV-om, i to: CCL4, CCL5 i CXCL10 [132]. Kujime i sur. su pronašli da NAC smanjuje lučenje CCL5 u stanicama zaraženim influencom [152], a Zhang i sur. pronalaze da NAC smanjuje razine CXCL10 u influencom zaraženih miševa [148]. Jamaluddin i sur. pronalaze smanjeni izražaj CXCL2 kod primjene NAC-a u stanica zaraženih RSV-om [149]. Zaključno se može reći da davatelji H₂S-a smanjuju virusom inducirano lučenje kemokina. N-acetilcistein je također inhibirao kemotaksiju neutrofila i monocita u zasebnim staničnim suspenzijama [49]. Suprotno tomu, Arranz i sur. zabilježili su da oralno dan NAC pojačava kemotaksijsku sposobnost neutrofila i limfocita u postmenopauzalnih žena [157]. U kontekstu virusne infekcije NAC je smanjio broj leukocita u bronhoalveolarnom lavatu influencom zaraženih miševa [148].

U istraživanju Kharazmija i sur. NAC je smanjio kemoluminiscenciju, koja se javlja prilikom respiratornoga praska [160], u aktiviranih neutrofila i makrofaga [149]. Villagrasa i sur. pokazali su da NAC smanjuje proizvodnju superoksidnoga aniona u aktiviranih neutrofila [161]. N-acetilcistein je također smanjio temeljnu i aktiviranu proizvodnju H₂O₂ u neutrofilima i alveolarnim makrofazima

[162]. Oralno dani NAC snizio je temeljnu razinu superoksidnoga aniona u neutrofilima i pojačao je njihovu fagocitnu sposobnost u postmenopauzalnih žena [157].

N-acetilcistein je pojačao proizvodnju IL-2 u aktiviranih limfocita T [157,159,163] te je pojačao izražaj receptora za IL-2 (CD25) [163]. IL-2 potiče proliferaciju, preživljenje i diferencijaciju limfocita T aktiviranih antigenom te potiče diferencijaciju naivnih CD4⁺ limfocita T u regulacijske limfocite T, a bitan je i za održavanje regulacijskih limfocita [164,165]. Pokazano je da NAC pojačava proliferativni odgovor limfocita T na mitogene [157,159]. Osim što potiče proizvodnju IL-2, NAC potiče preživljenje limfocita T i drugim mehanizmom jer je pokazano veće preživljenje limfocita T kod inkubacije s IL-2 i NAC-om u usporedbi s inkubacijom samo s IL-2 [159,166]. Dagenais-Lussier i sur. pokazali su da kinurenin smanjuje preživljenje CD4⁺ memorijskih limfocita T remeteći vjesnički put IL-2 te izvještavaju NAC-ovu sposobnost, ne samo da sprječiči učinak kinurenina, već i da pospješi učinak IL-2, što govori da NAC posjeduje mehanizam djelovanja preko vjesničkoga puta IL-2 [166]. U skladu s povećanom proizvodnjom IL-2, Liu i sur. izvještavaju da oralno dani NAC potiskuje T_H17 stanice i promiče T_{reg} stanice u serumu bolesnika s KOPB-om. Također povisuje serumske razine IL-10, a snizuje razine IL-17 [167].

3.3.4. Učinak na preživljenje stanica i tkivno oštećenje

Zaraza citopatogenkim RNA virusima potiče aktivaciju inflamasma NLRP3 u zaraznim makrofazima [168]. Aktivacija inflamasma NLRP3 uključuje i aktivaciju kaspaze-1. Kaspaza-1 odgovorna je za stvaranje aktivnih oblika IL-1 β i IL-18, no njena aktivacija inflamasmom može izazvati programiranu staničnu smrt koja se zove piroptoza. Ta stanična smrt pospješuje oslobađanje IL-1 β [156]. U mišjim makrofazima tretiranimi poticateljima aktivacije inflamasma, NAC i davatelj H₂S-a snizili su razine NLRP3 inflamasma. Također su snizili povišene razine proizvoda kaspaze-1, IL-1 β i IL-18 [169,170]. Aktivacija transkripcijskoga čimbenika Nrf2 inhibira aktivaciju NLRP3 inflamasma, te bi NAC poticanjem Nrf2 mogao inhibirati aktivaciju inflamasma [137,170]. Ipak, kako izvještavaju Castelblanco i sur., davatelj H₂S-a inhibirao je aktivaciju inflamasma čak i uz prisutnost inhibitora HO-1, te je u jednakoj mjeri snizio razine IL-1 β u miševa divljega soja i u miševa s nedostatkom Nrf2. To bi govorilo da davatelji H₂S-a inhibiraju aktivaciju inflamasma i mehanizmom neovisnim o Nrf2 [170]. No, da Costa i sur. izvještavaju da RNA virusi svoj citopatogeni učinak ostvaruju i u makrofazima s delecijom gena za gasdermin D, važnoga činitelja u piroptozu, što govori da inhibicija inflamasma nije jedini mehanizam u sprječavanju virusom potaknute stanične smrti [168].

TNF- α , vezanjem za receptore za TNF tipa I, pokreće i proupalni i proapoptotski put, ovisno o staničnim uvjetima. Virusna zaraza pomiče ravnotežu prema apoptozi, tj. zaražene stanice postanu osjetljive na TNF-om izazvanu staničnu smrt. Osim toga, u virusnoj zarazi imunosne stanice luče velike količine TNF- α , pa bi ovo mogao biti važan mehanizam kojim virusi izazivaju apoptozu [156]. Transkripcijski čimbenik NF- κ B ima ulogu u sprječavanju apoptoze izazvane TNF-om [171]. Za H₂S je pokazano da izaziva sulfhidraciju p65 podjedinice NF- κ B kojom potiče prepisivanje antiapoptotskih gena [103]. N-acetilcistein bi tako mogao, osim inhibitornoga učinka na NF- κ B, imati i modulacijski učinak, tj. osim smanjenja NF- κ B-om posredovanoga prepisivanja proupalnih gena, mogao bi poticati NF- κ B-om posredovano prepisivanje antiapoptotskih gena. N-acetilcistein je uspio u potpunosti spriječiti TNF-om izazvanu staničnu smrt na kulturi stanica fibroblasta i endotelnih stanica krvnih žila [172,173].

U zaraženim stanicama stvaraju se virusne bjelančevine, a te bjelančevine mogu biti pogrešno smotane. Nakupljanje tih bjelančevina dovodi do odgovora nesmotanih bjelančevina koji, ako se ne može popraviti, vodi u apoptozu [156]. Kako davatelji H₂S-a u zarazi virusom influence smanjuju izražaj virusnih bjelančevina, NAC bi onda ovim mehanizmom, u nekih virusa, mogao potisnuti događaje povezane s nakupljanjem virusnih bjelančevina koji dovode do stanične smrti [133,139]. Također, kako je dobro poznata uloga kisikovih radikala u izazivanju stanične smrti, bilo apoptozom ili nekrozom, te kako NAC i davatelji H₂S-a sprječavaju virusima izazvano povišenje staničnih razina kisikovih radikala, čini se vjerojatnim da NAC štiti stanice od stanične smrti i ovim mehanizmom [135-137,142,149,174].

N-acetilcistein i anti-IL-18 protutijelo ublažili su upalu i ozljedu u mišjem plućnom tkivu nakon što su miševi prethodno bili tretirani lipopolisaharidom i cigaretnim dimom. Ovo navodi na zaključak da bi jedan od NAC-ovih djelovanja u plućnoj ozljedi mogao biti i snižavanje razine IL-18 [169]. N-acetilcistein bi mogao imati ulogu i u cijeljenju tkiva jer je u istraživanju Yilmeza i sur. pokazano kako NAC u miševa potiče cijeljenje nosne sluznice nakon mehaničke traume [175]. U kontekstu virusne zaraze NAC je u radu Geilera i sur. u potpunosti potisnulo citopatogene učinke influence [135] te su davatelji H₂S-a u dva istraživanja zamjetljivo povećali preživljenje stanica zaraženih različitim sojevima virusa influence [139,142].

4. Ispitivanja

4.1. Ispitivanja na životinjama

U istraživanje Zhanga i sur. NAC je ublažio kliničke simptome influence i smanjio je smrtnost u miševa. Bile su četiri skupine od po 50 miševa, od toga dvije kontrolne skupine, jedna zaražena, a druga nezaražena, te dvije testne skupine, jedna tretirana NAC-om, a druga davateljem H₂S-a. Virus influence podtipa H9N2 inokuliran je intranazalno. Davan je u dozi od 200mg/kg intraperitonealno svakih 4,5h, počevši 1h prije inokulacije, te je sveukupno dano 5 injekcija. N-acetilcistein je ublažio kliničke simptome i smanjio njihovu smrtnost, smanjio je gubitak na tjelesnoj masi i smanjio je plućni edem. Nije bilo značajne razlike između NAC-a i drugoga davatelja H₂S-a [148].

Ghezzi i Ungheri u svom su radu ispitivali učinak kombinacije NAC-a i ribavirina na zarazu virusom influence tip A u muških odraslih miševa. Miševi su raspodijeljeni u četiri skupine sa po 50 članova u svakoj skupini: kontrolna skupina koja je samo zaražena, skupina tretirana samo NAC-om, skupina tretirana samo ribavirinom, skupina tretirana kombinacijom NAC-a i ribavirina. N-acetilcistein je primijenjen kao jedna dnevna doza od 1g/kg oralno, a ribavirin je dan u jednoj dnevnoj dozi od 100mg/kg intraperitonealno. Tretman je započeo 4h nakon zaraze i nastavio se do 4. dana po zarazi, a preživljenje je bilo praćeno do 14. dana po zarazi. Tretman samim NAC-om nije polučio značajnu zaštitu miševa od smrti, preživljenje je bilo 25% u usporedbi s kontrolnom skupinom gdje je preživljenje bilo 17%. Preživljenje je naraslo na 58% u skupini liječenoj samo ribavirinom, te na 92% u skupini liječenoj kombinacijom NAC-a i ribavirinom. Autori još navode svoje prethodno istraživanje gdje su miševi zaraženi influencom tretirali samo NAC-om te su zabilježili značajno poboljšanje preživljenja. NAC su davali u drugačijem režimu nego u ovom istraživanju, dvaput dnevno u oralnoj dozi od 1g/kg kroz 8 dana uključujući i pretretman dan prije infekcije [176].

Istraživanje Garozza i sur. ispitivalo je učinak NAC-a i oseltamivira na miševima zaraženima influencom podtipa H1N1. Istraživanje je podijelilo miševi u 6 skupina od po 10 miševa: skupina tretirana samo NAC-om, skupina tretirana samo oseltamivirom, skupina tretirana kombinacijom NAC-a i oseltamivira, te tri zaražene, netretirane kontrolne skupine. N-acetilcistein je davan u jednoj oralnoj dozi dnevno od 1g/kg, počevši od 4h poslije zaraze pa kroz 4 naredna dana, dok je oseltamivir davan *per os* dvaput dnevno u ukupnoj dozi od 1mg/kg, počevši od 4h poslije zaraze pa kroz 5 narednih dana. Miševi su promatrani 21 dan. U tri je kontrolne skupine bio samo jedan preživjeli miš, prosječno je vrijeme preživljenja bilo 8,7 dana. Tretman samim oseltamivirom imao je prosječno preživljenje od 60% (6/10) te je prosječno preživljenje miševa bilo 21,7 dana. Liječenje samim NAC-om imalo je prosječno vrijeme preživljenja od 20% (2/10) te je prosječno vrijeme preživljenja miševa bilo 8,8

dana. Liječenje kombinacijom NAC-a i oseltamivira polučilo je 100%-tno preživljenje (10/10) te prosječno vrijeme preživljenja veće od 21 dan [177].

Garigliany i Desmecht su u svom istraživanju ispitivali učinak NAC-a na ženskim miševima starim 8 tjedana koji su zaraženi influencom podtipa H1N1. Bile su dvije skupine od po deset miševa. Objе skupine bile zaražene, prva je bila kontrola, a druga skupina je primila lijek. N-acetilcistein je dan oralno u dozi od 100mg/kg dnevno od 1. do 7. dana po zarazi. Miševi su bili promatrani kroz razdoblje od 14 dana. Nije bilo značajne razlike između kontrolne i pokusne skupine. Autori su uzeli dozu od 100mg/kg jer je ta doza korištena u liječenju teške upala pluća uzrokovane gripom u jednom prikazu slučaja [178].

4.2. Klinička ispitivanja

4.2.1. Infekcije gornjega respiratornog sustava

Randomizirano kontrolirano istraživanje Macchija i sur. uspoređivalo je terapijsku kombinaciju topikalne primjene NAC-a i flunizolida, kortikosteroida, s kombinacijom topikalne primjene ambroksola, mukolitika, i flunizolida u liječenju rekurentnoga akutnog rinosinuitisa. Kombinacija s NAC-om polučila je značajno bolje ishode od one s ambroksolom, kako koncem liječenja, tako i u praćenju, nakon tri te nakon šest mjeseci od kraja liječenja. Veći je udio pacijenata imao poboljšanje bolesti, kako ono simptomatsko, tako i endoskopsko i citološko. Kombinacija s NAC-om je također bila bolja i u smanjenju broja egzacerbacija i produljenju vremena remisije. Istraživanje je samo jednostruko zaslijepljeno. Randomizacija je spomenuta, no nisu dani detalji. Osipanje ispitanika se pratilo te je analiza vršena u originalnim skupinama. Istraživanje je zaradilo 2 boda po Jadadovom bodovanju [10,179]. Premda se u ovom istraživanju ne radi o akutnom virusnom rinitisu i sinusitisu, već o rekurentnom akutnom rinosinuitisu, svejedno govori u prilog moguće NAC-ove korisnosti u tim bolestima.

Randomizirano kontrolirano istraživanje ispitivalo je učinak češnjaka, namirnice čije tvari povisuju razinu H₂S-a u tijelu [180], na običnu prehladu. Znatno je smanjio pojavnost epizoda prehlada, kao i prosječno trajanje simptoma. Istraživanje je bilo dvostruko slijepo, no nije dalo detalje zaslijepljivanja. Randomizacija je dobro objašnjena te se osipanje ispitanika pratilo. Istraživanje je zaradilo 4 boda po Jadadovom bodovanju [179,181]. Cochraneov pregled učinka češnjaka na običnu prehladu našao je da samo to istraživanje [181] zadovoljava njihove kriterije, stoga autori nisu, temeljem samo jednoga istraživanja, donijeli konačan sud. Ostalih sedam istraživanja koje su autori pronašli ili nisu dosegla

zadovoljavajući standard ili su ispitivali učinak na širu skupinu bolesti (gripa, febrilni respiratorni katar itd.) ili je definicija obične prehlade bila neodgovarajuća, a jedno je istraživanje ispitivalo učinak preparata koji je uz češnjak sadržavao i druge aktivne sastojke [182]. Ipak, povoljan ishod tih sedam neuključenih istraživanja, kao i uključeno randomizirano kontrolirano istraživanje, ukazuje na mogući učinak davatelja H₂S-a.

Dvostruko slijepo multicentrično randomizirano kontrolirano istraživanje De Flore i sur. ispitivalo je učinak dugotrajnoga uzimanja NAC-a na učestalost razvoja epizoda nalik gripi i težinu njihovih simptoma u razdoblju sezone gripe. Istraživanje je trajalo 6 mjeseci, od jeseni do proljeća. Epizodama nalik gripi smatrale su se pojave dvaju ili više sljedećih simptoma: vrućica ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), slabost, smanjen apetit, glavobolja, bol u mišićima ili zglobovima, hunjavica (curenje iz nosa), grlobolja, sluzavi sekret i kašalj. Osim ovih simptoma, na početku istraživanja, kao i na kraju nakon 6 mjeseci terapije, pacijentima se je iz krvi mjerila količina protutijela na influencu H1N1. Četverostruko povećanje krajnjega titra u usporedbi s početnim uzorkom smatralo se specifičnom serokonverzijom. Svaki je ispitanik dobio dvije tablete dnevno; oni u kontrolnoj skupini su dobili placebo, dok su oni u ispitivanoj skupini dobili dvije tablete od po 600mg NAC-a, ukupno 1200mg dnevno. Ispitivana skupina imala je statistički značajno manje epizoda nalik gripi u mjesecima tipičnima za gripu. Učestalost serokonverzije bila je slična u objema skupinama, no zabilježen je upečatljiv zaštitni učinak na klinički vidljivu bolest. Samo 25% zaraženih ispitanika u skupini NAC-a razvilo je simptomatski oblik, za razliku od kontrolne skupine gdje je 79% ispitanika razvilo simptomatski oblik. Također, težina simptoma, kao i duljina boravka u krevetu, bili su značajno manji u skupini koja je dobivala NAC. Istraživanje je dvostruko slijepo i randomizirano, no detalji zaslijepijavanja i randomizacije nisu dani. Osipanje ispitanika se dobro pratilo. Istraživanje je zaradilo 3 boda po Jadadovom bodovanju [179,183].

Virusi influence mogu, između ostaloga, izazvati i običnu prehladu i febrilni respiratorni katar [184]. Također, u kontrolnoj su skupini 62 ispitanika prijavila epizode nalik gripi, a samo 29 ih je imalo serokonverziju, dok je u NAC-ovoj skupini 37 ispitanika imalo epizode nalik gripi, a 36 ispitanika je imalo serokonverziju [182]. Jedno od mogućih objašnjenja velike razlike omjera serokonvertiranih naspram simptomatskih ispitanika između skupina jest da NAC učinkovitije djeluje na suzbijanje simptoma drugih virusa nego li virusa influence. Osim toga, svi navedeni simptomi mogu se javiti u jeku infekcije gornjega respiratornog sustava, a niti jedan navedeni simptom nije specifičan za infekcije donjega respiratornog sustava, poput recimo prisutnosti hropaca ili zaduhe. Dakle, ovo istraživanje govori u prilog tomu da bi NAC mogao djelovati preventivno na razvoj akutne virusne infekcije gornjega respiratornog sustava općenito.

4.2.2. COVID-19

Randomizirano kontrolirano istraživanje bez zaslijepljivanja Panahija i sur. procjenjivalo je učinkovitost i sigurnost NAC-a u liječenju pacijenata s bolešću COVID-19. Glavni ishodi ovoga istraživanja bili su poboljšanje kliničkih parametara i smanjenje smrtnosti. Uključeni su pacijenti sa simptomatskom bolešću COVID-19 ako su zadovoljili uključujuće uvjete: dob ≥ 18 godina, pozitivan test RT-PCR-a na SARS-CoV-2 iz nazofaringealnoga obriska, COVID-19 upala pluća potvrđena nalazom CT-snimke prsišta te manje od sedam dana od početka simptoma. Isključeni su bili pacijenti koji su zahtijevali intenzivnu njegu. 250 pacijenata podjednako je raspodijeljeno u dvije skupine. Obje su skupine primile standardnu skrb po protokolu iranskoga ministarstva zdravstva [185], a intervencijska skupina je dobila inhalacijski sprej od 200 μ g NAC-a po udahu kojega su uzimali svakih 12 sati kroz sedam dana. Nakon intervencije je učestalost zaduhe i opće slabosti bila statistički značajno manja u intervencijskoj skupini. Statistički je značajna bila razlika u laboratorijskim nalazima; intervencijska je skupina imala niži CRP, AST, leukocite i hemoglobin. Poboljšanje nalaza CT-a također je bilo statistički značajno veće u intervencijskoj skupini. Istraživanje nije bilo slijepo. Randomizacija je vršena te su dani detalji randomizacije. Ne navodi se izričito, no iz rada se da iščitati da su svi uključeni pacijenti završili istraživanje. Istraživanje zarađuje 3 boda po Jadadovom bodovanju [179,186].

Dvostruko slijepo randomizirano kontrolirano istraživanje Tahera i sur. uključilo je pacijente s blagim do umjerenim ARDS-om koji je povezan s COVID-19. Promatrani ishodi učinkovitosti su bili: smrtnost kroz 28 dana, klinički status 28. dana, udio pacijenata koji zahtijevaju mehaničku ventilaciju, promjena u težini ARDS-a te SOFA bodovanje 48 i 96 sati nakon intervencije. Svi primljeni pacijenti s dijagnozom blagoga do umjerenoga ARDS-a povezanoga s COVID-19 su bili probrani i uključeni u istraživanje ako su zadovoljili uvjete: dob ≥ 18 godina, dijagnoza COVID-19 potvrđena RT-PCR-om i/ili radiološki nalaz sukladan COVID-19 s teškom upalom pluća, ispunjeni berlinski kriteriji blagoga do umjerenoga ARDS-a [187]. 92 pacijenta raspodijeljena su u dvije skupine, 45 u skupini placebo, a 47 u intervencijskoj skupini. N-acetilcistein je davan kroz tri dana u dozi 40mg/kg dnevno te je razvodnjen u otopini 5%-tne glukoze i primijenjen je u kontinuiranoj intravenskoj infuziji. Skupina placebo primila je infuziju 5%-tne glukoze u istom obujmu kao intervencijska skupina. Svi su pacijenti dobivali standardnu potpurnu terapiju i antioksidativne preparate (vitamin C, vitamin D3 i cink), a kortikosteroidna terapija bila je dostupna pacijentima ako je bila potrebna. Opća smrtnost nakon 28 dana bila je niža u intervencijskoj skupini, no to nije bilo statistički značajno. Također, zabilježeni su bolji klinički ishodi te udio pacijenata koji su se oporavili nakon 28 dana, no to nije bilo statistički značajno. Statistički značajna razlika nije pronađena ni za potrebu za invazivnom ventilacijom, prosječan broj dana bez ventilatora, SOFA zbroj, prosječno vrijeme provedeno u jedinici intenzivnog liječenja, kao ni za prosječno vrijeme hospitalizacije. Istraživanje je dvostruko slijepo i

randomizirano te su dani detalji zaslijepljivanja i randomizacije. Nije bilo osipanja ispitanika. Istraživanje je zaradilo svih 5 bodova po Jadadovom bodovanju [179,188].

Dvostruko slijepo randomizirano kontrolirano istraživanje de Alencara i sur. ispitivalo je NAC-ovu sposobnost da spriječi razvoj respiratornoga zatajenja u teškom ARDS-u koje je uzrokovao COVID-19. Primarni ishod je bila potreba za mehaničkom ventilacijom, a sekundarni ishodi su bili vrijeme mehaničke ventilacije, primitak u jedinicu intenzivne njege, boravak u jedinici intenzivne njege te smrtnost. Pacijenti od 18 godina i stariji kojima je dijagnostiran težak COVID-19 uključeni su u istraživanje. 67 pacijenata je bilo u skupini placeba, a 68 u intervencijskoj skupini. Pacijenti su primili NAC intravenski, otopljen u 5%-tnoj otopini glukoze, 14g u prva četiri sata te 7g u sljedećih 16 sati. Pacijenti u skupini placeba primili su jednaki obujam 5%-tne glukoze. Svi su pacijenti primili empirijski ceftriakson i azitromicin. Nije zamijećena statistički značajna razlika među skupinama kako u primarnom, tako i u sekundarnim ishodima. Istraživanje je dvostruko slijepo, i dani su detalji. Randomizacija je vršena te je dano dovoljno detalja o njoj. Pratilo se osipanje ispitanika te je analiza vršena na originalnim skupinama. Istraživanje je zaradilo svih 5 bodova po Jadadovom bodovanju [179,189].

Opažajno retrospektivno kohortno istraživanje Assimakopoulou i sur. ispitivalo je učinak NAC-a u hospitaliziranih pacijenata s COVID-19 upalom pluća. Ispitivani ishodi bili su napredovanje bolesti do teškoga zatajenja pluća i smrtnost. Uključeni su pacijenti zaprimljeni u bolnicu s umjerenom do teškom COVID-19 upalom pluća u razdoblju trećega pandemijskog vala između 1. veljače i 30. travnja 2021. godine. Dijagnoza je temeljena na potvrdi SARS-CoV-2 zaraze pozitivnim rezultatom RT-PCR-a iz nazofaringealnoga obriska. Klasifikacija umjerene i teške COVID-19 bolesti temeljena je na kriteriju američkoga „National institutes of Health” [190]. Uključena je serija uzastopnih odraslih pacijenata koji su primili NAC od 600mg oralno dvaputa dnevno kroz 14 dana ili do otpusta iz bolnice (štogod je prvo došlo) uz standardnu skrb. Usporedna skupina sastojala se od pacijenata koji su odabrani nasumičnim uzorkovanjem od pacijenata koji su u istom razdoblju zaprimljeni u bolnicu i to su bili upareni 1/1 s ispitivanom skupinom po dobi i spolu. Sveukupno je bilo 82 pacijenta, 42 u skupini s NAC-om, a 40 u kontrolnoj skupini. Značajno se više pacijenata u skupini NAC-a prezentiralo teškom bolešću. Tijekom vremena razlike u kliničko-laboratorijskim parametrima između skupina postale su statistički značajne; skupina NAC-a imala je viši omjer PO_2/FiO_2 te niže razine leukocita, CRP-a, D-dimera i LDH. Tretman oralnim NAC-om doveo je do značajno manjih stopa napredovanja u teško plućno zatajenje s potrebom mehaničke ventilacije u usporedbi s kontrolnom skupinom. Pacijenti u NAC-ovoj skupini također su imali manju četrnaestodnevnu i dvadesetiosmodnevnu smrtnost u usporedbi s kontrolnom skupinom [191].

Opažajno retrospektivno kohortno istraživanje Izquierda i sur. ispitivalo je učinak NAC-a u COVID-19. Ispitivani klinički ishodi su bili smrtnost, duljina boravka u bolnici, primitak u jedinicu intenzivne

njege i korištenje invazivne mehaničke ventilacije. Istraživanje je temeljeno na podacima elektroničnoga zdravstvenog kartona pacijenata dijagnosticiranih s COVID-19 u razdoblju od 1. ožujka 2020. do 24. siječnja 2021. godine. Svim pacijentima uključenima u ovo istraživanje klinički je dijagnosticiran COVID-19 RT-PCR-om. Uključeno je 19208 pacijenata s kliničkom dijagnozom COVID-19, od njih je 2071 liječeno NAC-om, oralno u dozi od 600mg svakih 8 sati. Iako je skupina koja je primala NAC u prosjeku starija te s više komorbiditeta, oralni tretman NAC-om bio je povezan s manjom smrtnošću. Nije bilo značajnih razlika u prosječnom trajanju boravka u bolnici, primitka u jedinicu intenzivne njege te korištenja invazivne mehaničke ventilacije [192].

4.2.3. Infekcije respiratornoga sustava u pedijatrijskoj populaciji

Cochraneov pregled istraživao je učinak NAC-a i karbocisteina na infekcije gornjega i donjega respiratornog sustava u pedijatrijskih pacijenata. Šest je istraživanja zadovoljilo uključujuće i nijedan od isključujućih kriterija, tri koja ispituju NAC, te tri koja ispituju karbocistein [9].

Prvo istraživanje (Bellomo 1972) uključilo je pacijente s akutnim bronhitisom ili bronhopulmonalnom infekcijem te je uspoređivalo kombinaciju NAC-a i tiamfenikola sa samim tiamfenikolom kao kontrolom. N-acetilcistein je primjenjen oralno u dozi od 14mg/kg dnevno. Potpuna remisija simptoma zbila se u obje skupine, no statistički značajno je ona bila brža u skupini s NAC-om. Istraživanje nije dalo dovoljno detalja o randomizaciji ni o zaslijepljivosti niti je pružilo potpune podatke o ishodu pacijenata. Istraživanje je zaradilo 2 boda po Jadadovom bodovanju [9,179].

Drugo istraživanje (Biscatti 1972) uključilo je pacijente s akutnom infekcijom gornjega i donjega respiratornog sustava. Pacijenti su bili raspoređeni u dvije skupine, jedna je primala NAC kroz šest dana u dozi od 100mg ili 300mg, ovisno o dobi, a druga je primala placebo. U svakoj je skupini bilo po 25 pacijenata. Klinički parametri postali su normalni u statistički značajno kraće vrijeme u skupini koja je primala NAC. Kašalj se povukao u potpunosti u liječenoj skupini, dok je zaostao u 16% sudionika u skupini placeba. Istraživanje nije pružilo dovoljno detalja o randomizaciji niti zaslijepljivanju, ali je pružilo podatke o ishodu te je analiza temeljena na podacima svih uključenih pacijenata. Zaradilo je 3 boda po Jadadovom bodovanju [9,179].

Treće istraživanje (Fiocchi 1989) uključilo je pacijente s bronhitisom i traheitisom. 50 ispitanika primalo je oralni NAC od 20mg/kg podijeljen u tri doze kroz 28 dana, dok je drugih 50 ispitanika primalo placebo. Obje su skupine imale kliničko poboljšanje. U pacijenata s bronhitisom uočene su statistički značajne razlike za kašalj i auskultacijske plućne fenomene u korist NAC-a. U pacijenata s traheitisom uočeno je statistički značajno poboljšanje kašlja, no ne i drugih kliničkih parametara. Poput prošloga istraživanja, nije pružilo dovoljno detalja o randomizaciji ni o zaslijepljivanju, ali su

podatci o ishodu pruženi te je analiza vršena na podacima svih uključenih pacijenata. Istraživanje je zaradilo 3 boda po Jadadovom bodovanju [9,179].

Autori pregleda vršili su skupnu analizu radova koja je uključivala istraživanja s NAC-om kao i ona s karbocisteinom. Rezultati skupne analize pokazuju da NAC i karbocistein imaju statistički značajan, no skroman učinak samo na simptom kašlja. Međutim, treba uzeti u obzir da uključena istraživanja s karbocisteinom u prosjeku imaju slabije rezultate od istraživanja s NAC-om [9].

Randomizirano kontrolirano istraživanje bez zaslijepljivanja Naza i sur. istraživalo je učinak NAC-a na bronhiolitis u populacije pedijatrijskih pacijenata između dva mjeseca od dvije godine starosti. 100 pacijenata ravnomjerno je raspodijeljeno u dvije skupine. U ispitivanoj skupini pacijenti su dobili u nebuliziranom obliku 20mg NAC-a otopljenoga u 3mL fiziološke otopine, dok su pacijenti u kontrolnoj skupini dobili, također u nebuliziranom obliku, 2,5mg salbutamola otopljenoga u 3mL fiziološke otopine. Pacijenti su dobivali tri tretmana svaki dan (intervali od osam sati) kroz pet dana. Za procjenu kliničkih parametara koristili su zbroj kliničke težine Wanga i sur. [193]. Terapija NAC-om bila je uspješnija od salbutamola u smanjenju kliničke težine bolesti i to je bilo statistički značajno. Prosječan boravak u bolnici bio je kraći u NAC-ovoj skupini, no to nije bilo statistički značajno. Izričito se navodi kako istraživači nisu bili zaslijepljeni. Pacijenti su randomizirani, no detalji nisu dani. Ne navodi se izričito, no iz rada se da iščitati da su svi uključeni pacijenti završili istraživanje. Istraživanje zarađuje 2 boda po Jadadovom bodovanju [179,194].

5. Rasprava

N-acetilcistein jedan je od najčešće korištenih bezreceptnih lijekova u Hrvatskoj, a uz to ga krasi i dobar sigurnosan profil te odsutnost težih nuspojava pri terapijskim dozama. Najčešće se koristi kao mukolitik, što je i bila njegova originalna indikacija, mada novija istraživanja ne pokazuju njegovu učinkovitost za tu indikaciju. S vremenom su otkrivena njegova antioksidativna i citoprotektivna svojstva, a tek se nedavno saznalo da je mehanizam tih učinaka posredovan NAC-ovim povišenjem razina H_2S -a u stanicama. Davno je otkrivena NAC-ova vrijednost u liječenju akutnoga otrovanja paracetamolom, pa se NAC počeo tako istraživati i za brojna stanja i bolesti, pa tako i za virusne akutne respiratorne infekcije. Nakon istraživanja De Flore i sur. koje je ukazalo na NAC-ovu možebitnu ulogu u virusnim akutnim respiratornim infekcijama, rađena su brojna istraživanja na kulturama stanica te na pokusnim životinjama koja su većinom pokazala povoljne rezultate.

Temeljem tih istraživanja nameću se moguća dva povoljna učinka NAC-a u virusnih akutnih respiratornih infekcija. Prvo, NAC ometa virusno umnažanje te tako ograničava širenje zaraze. Drugo, NAC sprječava tkivno oštećenje nekolicinom mehanizama: smanjuje oksidativni stres u stanicama, smanjuje lučenje proupalnih citokina, smanjuje kemotaksiju leukocita, potiče T_{reg} te inhibira apoptozu stanica.

Premda je nedostatak radova koja ispituju djelovanje NAC-a u akutnim virusnim infekcijama gornjega respiratornog sustava, postoje indicije da bi svakodnevna primjena NAC-a mogla djelovati preventivno na razvoj tih bolesti. Ipak, potrebno je više kvalitetnih istraživanja da bi se donio konačan sud.

Za sada dostupna istraživanja koja su ispitivala učinak NAC-a u COVID-19 su oprječna. Dva randomizirana kontrolirana istraživanja (RCT) ne nalaze statistički značajan učinak NAC-a, dok jedno randomizirano kontrolirano istraživanje, kao i dva kohortna istraživanja, pronalaze. Mogući razlog tomu jest da su dva negativna RCT-a ispitivali učinak NAC-a u ARDS-u te su uključili pacijente s blagim do umjerenim (Taher i sur.) i teškim ARDS-om (de Alencar i sur.), dok su pozitivan RCT i dva kohortna istraživanja ispitivali učinak NAC-a u simptomatskih bolesnika s potvrđenim COVID-19, s tim da je isključujući kriterij pozitivnoga RCT-a bio postojanje teže bolesti. Valja također spomenuti da su dva negativna RCT-a kvalitetna istraživanja koja imaju 5 bodova po Jadadovom bodovanju, a da je pozitivan RCT slabije kvalitete, s 3 boda po Jadadovom bodovanju. Samo je jedno istraživanje koje je ispitivalo NAC-ov učinak u akutnim virusnim infekcijama donjega respiratornog sustava druge virusne etiologije, a to je prikaz slučaja Laija i sur. u kojem je bolesnik pozitivan na virus influence podtipa H1N1 liječen NAC-om [178].

Iako postoje naznake da bi NAC mogao biti učinkovit u liječenju akutne virusne upale pluća, pogotovo ako se radi o blažoj kliničkoj slici, potrebno je još kvalitetnih istraživanja koja bi to i potvrdila. Nadalje, zasada nema kvalitetnih istraživanja temeljem kojih bi se mogao donijeti zaključak o NAC-om učinku na virusne akutne respiratorne infekcije u pedijatrijskoj populaciji.

6. Zaključak

Nema dobrih dokaza da je NAC učinkovit mukolitik pri terapijskim dozama. Koristan je u liječenju otrovanja paracetamolom jer obnavlja unutarstanične razine glutationa. Posjeduje antioksidativna i citoprotektivna svojstva koja su posredovana povišenjem unutarstaničnih razina H₂S-a. Na kulturama stanica pokazao je antivirusna svojstva, ometajući virusno umanažanje i ulazak virusa u stanice. Potrebna su daljnja istraživanja o učinku NAC-a u virusnim akutnim respiratornim infekcijama. Ima dobar sigurnosan profil i ne izaziva ozbiljne nuspojave u terapijskim dozama.

7. Zahvala

Najprvo zahvaljujem svomu mentoru, .prof. Robertu Likiću, koji mi je pomogao u pisanju ovoga rada svojim stručnim savjetima i prijedlozima. Zahvaljujem svojim roditeljima, Valentini i Zvonimiru, bakama, Zdenki i Lili, te djedovima, Otu i Vladimiru, koji su me ispravno i dobro odgojili te bez kojih ne bih sve ovo postigao. Zahvaljujem svojim trenerima, učiteljima, nastavnicima i profesorima koji su me inspirirali i poticali da dajem više. Zahvaljujem svojoj braći, Krešimiru, Hrvoju, Josipu i Roku, te svojim prijateljima što su bili uz mene u dobrim i lošim trenucima. Na koncu zahvaljujem svojoj ljubljenoj ženi Mirti i svomu sinu Vladimiru koji su me motivirali da završim ovaj fakultet.

8. Literatura

- [1] Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2013 Aug;1830(8):4117-29.
- [2] PubChem [internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for CID 12035, Acetylcysteine; 16. rujna 2004. [ažurirano 16. travnja 2023.; pristupljeno 22. travnja 2023.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Acetyl-L-cysteine/>
- [3] Gabard B, Mascher H. Endogenous plasma N-acetylcysteine and single dose oral bioavailability from two different formulations as determined by a new analytical method. *Biopharm Drug Dispos*. 1991 Jul;12(5):343-53.
- [4] Sheffner AL, izumitelj; Mead Johnson and Co LLC, podnositelj. Mucolytic-nu-acylated sulfhydryl compositions and process for treating animal mucus. United States patent US3091569A. 28. svibnja 1963.
- [5] Sjedinjene Američke Države, Food and Drug Administration. New drugs: approval of certain applications. U: Federal register Sv. 28 br. 241. Washington, D.C.: Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration; 13. prosinca 1963. Str. 13509.
- [6] Svjetska zdravstvena organizacija. World health organization model list of essential medicines. 22. izd. [internet] Ženeva: Svjetska zdravstvena organizacija; 2021 [pristupljeno 22. travnja 2023.]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>
- [7] Poole PJ, Black PN. Oral mucolytic drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review. *BMJ*. 2001 May 26;322(7297):1271
- [8] Duijvestijn YC, Brand PL. Systematic review of N-acetylcysteine in cystic fibrosis. *Acta Paediatr*. 1999 Jan;88(1):38-41.
- [9] Chalumeau M, Duijvestijn YCM. Acetylcysteine and carbocysteine for acute upper and lower respiratory tract infections in paediatric patients without chronic broncho-pulmonary disease. 31. svibnja 2013. [pristupljeno 22. travnja 2023.]. U: Cochrane Database of Systematic Reviews [internet]. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; c2013. doi: 10.1002/14651858.CD003124.pub4.
- [10] Macchi A, Terranova P, Castelnovo P. Recurrent acute rhinosinusitis: a single blind clinical study of N-acetylcysteine vs ambroxol associated to corticosteroid therapy. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012 Jan-Mar;25(1):207-17.

- [11] Kollef MH, Shuster DP. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1995 Jan 5;332(1):27-37
- [12] Bošnjak D, Milić M, Peršec J, Tudorić I, Husedžinović I. Pulmonary aspiration during intravenous propofol anaesthesia: treatment with N-acetylcysteine. *Neurologia Croatica.* 2003;52 Suppl 3:151-3.
- [13] Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Stewart MJ, Adam RD, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *BMJ.* 1979 Nov 3;2(6198):1097-100.
- [14] Verbić A, Lah Tomulić K, Butorac Ahel I, Milardović A. Paracetamol poisoning in children. *Medicina Fluminensis.* 2016;52(4):460-6.
- [15] Badawy A, State O, Abdelgawad S. N-Acetyl cysteine and clomiphene citrate for induction of ovulation in polycystic ovary syndrome: a cross-over trial. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(2):218-22.
- [16] Boesgaard S, Aldershville J, Pedersen F, Pietersen A, Madsen JK, Grande P. Continuous oral N-acetylcysteine treatment and development of nitrate tolerance in patients with stable angina pectoris. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991 Jun;17(6):889-93.
- [17] Khan SA, Campbell AM, Lu Y, An L, Alpert JS. N-Acetylcysteine for Cardiac Protection During Coronary Artery Reperfusion: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Nov 19;8:752939. doi: 10.3389/fcvm.2021.752939.
- [18] Zagler A, Azadpour M, Mercado C, Hennekens CH. N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Am Heart J.* 2006;151(1):140-145.
- [19] Vujaklija Brajković A, Križić M, Babel J, Rora M, Radonić R, Gornik I. A prospective study on prevention of contrast-induced nephropathy in Croatia. *Medicina Fluminensis.* 2019;55(1):72-8.
- [20] Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician.* 2009 Aug 1;80(3):265-9.
- [21] HALMED [internet]. Zagreb: Agencija za lijekove i medicinske proizvode; c2007. Baza lijekova; 15.11.2015. [ažurirano 28. siječnja 2023.; pristupljeno 23. travnja 2023.]. Dostupno na: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/>
- [22] Pablo - ljekarna za mene [internet]. Rijeka: Pablo zdravstvena ustanova za ljekarničku djelatnost; 27. svibnja 2009. LifeTime NAC N-acetilcistein 30 kapsula; 9. prosinca 2022. [pristupljeno 23. travnja 2023.]. Dostupno na: <https://ljekarna-pablo.hr/lifetime-nac-n-acetilcistein-30-kapsula-proizvod-5014/>

- [23] Vrcić Keglavić M, Nelken-Bestvina D, Vojvodić Ž. Petnaest najčešćih bezreceptnih lijekova koje uzimaju bolesnici: longitudinalna studija utemeljena na rutinski prikupljenim podacima. *Medicina familiaris Croatica: časopis Hrvatske udružbe obiteljske medicine*. 2016;24(1):30-41.
- [24] Jaworska M, Szulińska G, Wilk M, Tautt J. Capillary electrophoretic separation of N-acetylcysteine and its impurities as a method for quality control of pharmaceuticals. *J Chromatogr A*. 1999 Aug 20;853(1-2):479-85.
- [25] Sommer I, Schwebel H, Adamo V, Bonnabry P, Bouchoud L, Sadeghipour F. Stability of N-acetylcysteine (NAC) in standardized pediatric parenteral nutrition and evaluation of N,N-diacetylcysteine (DAC) formation. *Nutrients*. 2020 Jun 21;12(6):1849.
- [26] Böhler S, Neuhäuser-Berthold M, Wagner K, Virmani K, Bässler KH. Cystein in der parenteralen Ernährung: Vergleichende Studien über N-Acetylcystein und N,N-Diacetylcystin am Modell der Ratte. *Infusionstherapie*. 1988 Apr;15(2):89-92.
- [27] Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet*. 1991 Feb;20(2):123-34.
- [28] Borgström L, Kågedal B, Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986;31(2):217-22.
- [29] Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988;34(1):77-82.
- [30] Cotgreave IA, Moldéus P. Methodologies for the analysis of reduced and oxidized N-acetylcysteine in biological systems. *Biopharm Drug Dispos*. 1987 Jul-Aug;8(4):365-75.
- [31] Liu YM, Liu Y, Lu C, Jia JY, Liu GY, Weng LP, Wang JY, Li GX, Wang W, Li SJ, Yu C. Relative bioavailability of generic and branded acetylcysteine effervescent tablets: A single-dose, open-label, randomized-sequence, two-period crossover study in fasting healthy Chinese male volunteers. *Clin Ther*. 2010 Nov;32(12):2097-105.
- [32] Nolin TD, Ouseph R, Himmelfarb J, McMenamin ME, Ward RA. Multiple-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of N-acetylcysteine in patients with end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Sep;5(9):1588-94.
- [33] Greene SC, Noonan PK, Sanabria C, Peacock WF. Effervescent N-acetylcysteine tablets versus oral solution N-acetylcysteine in fasting healthy adults: an open-label, randomized, single-dose, crossover, relative bioavailability study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2016 Jun 27;83:1-7. doi: 10.1016/j.curtheres.2016.06.001.

- [34] Papi A, Di Stefano AFD, Radicioni M. Pharmacokinetics and safety of single and multiple doses of oral N-acetylcysteine in healthy Chinese and Caucasian volunteers: an open-label, phase I clinical study. *Adv Ther.* 2021 Jan;38(1):468-478.
- [35] Pedre B, Barayeu U, Ezeriņa D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): the emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther.* 2021 Dec;228:107916.
- [36] Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jan;60(1):6-20.
- [37] Freedman RB. How many distinct enzymes are responsible for the several cellular processes involving thiol:protein-disulphide interchange?. *FEBS Lett.* 1979 Jan 15;97(2):201-10.
- [38] Sheffner AL, Medler EM, Jacobs LW, Sarett HP. The in vitro reduction in viscosity of human tracheobronchial secretions by acetylcysteine. *Am Rev Respir Dis.* 1964 Nov;90:721-9.
- [39] Webb WR. Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetyl-cysteine. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1962 Sep;44(3):330-43.
- [40] Fazary AE, Awwad NS, Ibrahim HA, Shati AA, Alfaifi MY, Ju YH. Protonation equilibria of N-acetylcysteine. *ACS Omega.* 2020 Aug 3;5(31):19598-19605. doi: 10.1021/acsomega.0c02080.
- [41] Noszál B, Visky D, Kraszni M. Population, acid-base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers. *J Med Chem.* 2000 Jun 1;43(11):2176-82.
- [42] Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, Sergio F. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res.* 2018 Jul;52(7):751-762.
- [43] Ehre C, Rushton ZL, Wang B, Hothem LN, Morrison CB, Fontana NC, Markovetz MR, Delion MF, Kato T, Villalon D, Thelin WR, Esther CR Jr, Hill DB, Grubb BR, Livraghi-Butrico A, Donaldson SH, Boucher RC. An improved inhaled mucolytic to treat airway muco-obstructive diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Jan 15;199(2):171-180.
- [44] Whillier S, Raftos JE, Chapman B, Kuchel PW. Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. *Redox Rep.* 2009;14(3):115-24.
- [45] Harada D, Anraku M, Fukuda H, Naito S, Harada K, Suenaga A, Otagiri M. Kinetic studies of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and human serum albumin through a mixed-disulfide using a N-methylpyridinium polymer-based column. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004 Aug;19(4):297-302.

- [46] Chen J, Reheman A, Gushiken FC, Nolasco L, Fu X, Moake JL, Ni H, López JA. N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice. *J Clin Invest.* 2011 Feb;121(2):593-603.
- [47] Rogers DF. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. *Respir Care.* 2007 Sep;52(9):1176-93; discussion 1193-7.
- [48] Tam J, Nash EF, Ratjen F, Tullis E, Stephenson A. Nebulized and oral thiol derivatives for pulmonary disease in cystic fibrosis. 12. lipnja 2013. [pristupljeno 5. svibnja 2023.]. U: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [internet]. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; c2013. doi.org/10.1002/14651858.CD007168.pub3
- [49] Kharazmi A, Nielsen H, Schiøtz PO. N-acetylcysteine inhibits human neutrophil and monocyte chemotaxis and oxidative metabolism. *Int J Immunopharmacol.* 1988;10(1):39-46.
- [50] Junod AF, Jornot L, Grichting G. Comparative study on the selenium- and N-acetylcysteine-related effects on the toxic action of hyperoxia, paraquat and the enzyme reaction hypoxanthine-xanthine oxidase in cultured endothelial cells. *Agents Actions.* 1987 Oct;22(1-2):176-83.
- [51] Moldéus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration.* 1986;50 Suppl 1:31-42.
- [52] Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7.
- [53] Winterbourn CC, Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1999 Aug;27(3-4):322-8.
- [54] Pryor WA. Why is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermochemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radic Biol Med.* 1988;4(4):219-23.
- [55] Michaels HB, Hunt JW. Reactions of the hydroxyl radical with polynucleotides. *Radiat Res.* 1973 Oct;56(1):57-70.
- [56] Nakken KF. The action of x-rays on dilute solutions of p-aminobenzoic acid. *Radiat Res.* 1964 Mar;21:446-61.
- [57] Mezyk SP. Determination of the rate constant for the reaction of hydroxyl and oxide radicals with cysteine in aqueous solution. *Radiat Res.* 1996 Jan;145(1):102-6.

- [58] Storkey C, Davies MJ, Pattison DI. Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCl) with cysteine, methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach. *Free Radic Biol Med.* 2014 Aug;73:60-6.
- [59] Medved I, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, Petersen AC, Sostaric S, Gong X, McKenna MJ. N-acetylcysteine enhances muscle cysteine and glutathione availability and attenuates fatigue during prolonged exercise in endurance-trained individuals. *J Appl Physiol* (1985). 2004 Oct;97(4):1477-85.
- [60] van 't Erve TJ, Wagner BA, Ryckman KK, Raife TJ, Buettner GR. The concentration of glutathione in human erythrocytes is a heritable trait. *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:742-749.
- [61] Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 2013;528:3-25.
- [62] Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2013 May 1;18(13):1623-41.
- [63] Coles B, Wilson I, Wardman P, Hinson JA, Nelson SD, Ketterer B. The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. *Arch Biochem Biophys.* 1988 Jul;264(1):253-60.
- [64] van de Straat R, de Vries J, Debets AJ, Vermeulen NP. The mechanism of prevention of paracetamol-induced hepatotoxicity by 3,5-dialkyl substitution. The roles of glutathione depletion and oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 1987 Jul 1;36(13):2065-70.
- [65] Högberg J, Kristoferson A. A correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1977 Mar 15;74(1):77-82.
- [66] Streeter AJ, Dahlin DC, Nelson SD, Baillie TA. The covalent binding of acetaminophen to protein. Evidence for cysteine residues as major sites of arylation in vitro. *Chem Biol Interact.* 1984 Mar;48(3):349-66.
- [67] James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2003 Dec;31(12):1499-506.
- [68] Pickering G, Macian N, Papet I, Dualé C, Coudert C, Pereira B. N-acetylcysteine prevents glutathione decrease and does not interfere with paracetamol antinociceptive effect at therapeutic dosage: a randomized double-blind controlled trial in healthy subjects. *Fundam Clin Pharmacol.* 2019 Jun;33(3):303-311.

- [69] Miners JO, Drew R, Birkett DJ. Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice in vivo. *Biochem Pharmacol.* 1984 Oct 1;33(19):2995-3000.
- [70] Williamson JM, Boettcher B, Meister A. Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(20):6246-9.
- [71] Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830(5):3143-53.
- [72] Ventura P, Panini R, Abbati G, Marchetti G, Salvioli G. Urinary and plasma homocysteine and cysteine levels during prolonged oral N-acetylcysteine therapy. *Pharmacology.* 2003 Jun;68(2):105-14.
- [73] Burgunder JM, Varriale A, Lauterburg BH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 1989;36(2):127-31.
- [74] Uttamsingh V, Keller DA, Anders MW. Acylase I-catalyzed deacetylation of N-acetyl-L-cysteine and S-alkyl-N-acetyl-L-cysteines. *Chem Res Toxicol.* 1998 Jul;11(7):800-9.
- [75] Raftos JE, Whillier S, Chapman BE, Kuchel PW. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(9):1698-706.
- [76] Radtke KK, Coles LD, Mishra U, Orchard PJ, Holmay M, Cloyd JC. Interaction of N-acetylcysteine and cysteine in human plasma. *J Pharm Sci.* 2012 Dec;101(12):4653-9.
- [77] Zhou J, Coles LD, Kartha RV, Nash N, Mishra U, Lund TC, Cloyd JC. Intravenous administration of stable-labeled N-acetylcysteine demonstrates an indirect mechanism for boosting glutathione and improving redox status. *J Pharm Sci.* 2015 Aug;104(8):2619-26.
- [78] De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, Mitra D, Watanabe N, Nakamura H, Tjioe I, Deresinski SC, Moore WA, Ela SW, Parks D, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest.* 2000 Oct;30(10):915-29.
- [79] Lizzo G, Migliavacca E, Lamers D, Frézal A, Corthesy J, Vinyes-Parès G, Bosco N, Karagounis LG, Hövelmann U, Heise T, von Eynatten M, Gut P. A Randomized Controlled Clinical Trial in Healthy Older Adults to Determine Efficacy of Glycine and N-Acetylcysteine Supplementation on Glutathione Redox Status and Oxidative Damage. *Front Aging.* 2022 Mar 7;3:852569.
- [80] Roes EM, Raijmakers MT, Peters WH, Steegers EA. Effects of oral N-acetylcysteine on plasma homocysteine and whole blood glutathione levels in healthy, non-pregnant women. *Clin Chem Lab Med.* 2002 May;40(5):496-8.

- [81] Trewin AJ, Petersen AC, Billaut F, McQuade LR, McInerney BV, Stepto NK. N-acetylcysteine alters substrate metabolism during high-intensity cycle exercise in well-trained humans. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013 Dec;38(12):1217-27.
- [82] Ferreira LF, Campbell KS, Reid MB. N-acetylcysteine in handgrip exercise: plasma thiols and adverse reactions. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2011 Apr;21(2):146-54.
- [83] Gleixner AM, Hutchison DF, Sannino S, Bhatia TN, Leak LC, Flaherty PT, Wipf P, Brodsky JL, Leak RK. N-Acetyl-L-Cysteine Protects Astrocytes against Proteotoxicity without Recourse to Glutathione. *Mol Pharmacol*. 2017 Nov;92(5):564-575.
- [84] Steenvoorden DP, Beijersburgen van Henegouwen GM. Glutathione synthesis is not involved in protection by N-acetylcysteine against UVB-induced systemic immunosuppression in mice. *Photochem Photobiol*. 1998 Jul;68(1):97-100.
- [85] Konarkowska B, Aitken JF, Kistler J, Zhang S, Cooper GJ. Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity. *FEBS J*. 2005 Oct;272(19):4949-59.
- [86] Yan CY, Ferrari G, Greene LA. N-acetylcysteine-promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26827-32.
- [87] Vitvitsky V, Kabil O, Banerjee R. High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jul 1;17(1):22-31.
- [88] Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982 Aug 15;206(2):267-77.
- [89] Elsej DJ, Fowkes RC, Baxter GF. L-cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010 Mar;15(1):53-9.
- [90] Kartha RV, Zhou J, Hovde LB, Cheung BW, Schröder H. Enhanced detection of hydrogen sulfide generated in cell culture using an agar trap method. *Anal Biochem*. 2012 Apr 1;423(1):102-8.
- [91] Ezeriņa D, Takano Y, Hanaoka K, Urano Y, Dick TP. N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H₂S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chem Biol*. 2018 Apr 19;25(4):447-459.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.01.011.
- [92] Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:169-87.

- [93] Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jul 1;17(1):119-40.
- [94] Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev*. 2018 Feb 14;118(3):1253-1337.
- [95] Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jan;12(1):1-13.
- [96] Pei J, Wang F, Pei S, Bai R, Cong X, Nie Y, Chen X. Hydrogen Sulfide Promotes Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration via ROS Scavenging. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 May 21;2020:1412696.
- [97] Nagy P, Winterbourn CC. Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. *Chem Res Toxicol*. 2010 Oct 18;23(10):1541-3.
- [98] Tang G, Wu L, Wang R. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Jul;37(7):753-63.
- [99] Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001 Nov 1;20(21):6008-16.
- [100] Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2118-20.
- [101] Pan LL, Liu XH, Gong QH, Wu D, Zhu YZ. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- α -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells. *PLoS One*. 2011 May 10;6(5):e19766. doi: 10.1371/journal.pone.0019766.
- [102] Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jul 1;41(1):106-19.
- [103] Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, Kim S, Snyder SH. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*. 2012 Jan 13;45(1):13-24.
- [104] Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res*. 2009 Aug 14;105(4):365-74.

- [105] Iciek M, Bilska-Wilkosz A, Górny M. Sulfane sulfur - new findings on an old topic. *Acta Biochim Pol.* 2019 Dec 28;66(4):533-544.
- [106] Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal.* 2009 Nov 10;2(96):ra72.
- [107] Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res.* 2011 Nov 11;109(11):1259-68.
- [108] Millikin R, Bianco CL, White C, Saund SS, Henriquez S, Sosa V, Akaike T, Kumagai Y, Soeda S, Toscano JP, Lin J, Fukuto JM. The chemical biology of protein hydropersulfides: studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radic Biol Med.* 2016 Aug;97:136-147.
- [109] Jurkowska H, Wróbel M. Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation by N-acetyl-L-cysteine as a result of increased sulfane sulfur level. *Anticancer Res.* 2018 Sep;38(9):5109-5113.
- [110] Calverley P, Rogliani P, Papi A. Safety of N-acetylcysteine at high doses in chronic respiratory diseases: a review. *Drug Saf.* 2021 Mar;44(3):273-290.
- [111] Koppen A, van Riel A, de Vries I, Meulenbelt J. Recommendations for the paracetamol treatment nomogram and side effects of N-acetylcysteine. *Neth J Med.* 2014 Jun;72(5):251-7.
- [112] Rhodes K, Braakhuis A. Performance and Side Effects of Supplementation with N-Acetylcysteine: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 2017 Aug;47(8):1619-1636.
- [113] Mallet P, Mourdi N, Dubus JC, Bavoux F, Boyer-Gervoise MJ, Jean-Pastor MJ, Chalumeau M. Respiratory paradoxical adverse drug reactions associated with acetylcysteine and carbocysteine systemic use in paediatric patients: a national survey. *PLoS One.* 2011;6(7):e22792. doi: 10.1371/journal.pone.0022792.
- [114] Szabo C. A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem Pharmacol.* 2018 Mar;149:5-19.
- [115] Szabo C, Ransy C, Módis K, Andriamihaja M, Murches B, Coletta C, Olah G, Yanagi K, Bouillaud F. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2014 Apr;171(8):2099-122.
- [116] Petersen LC. The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1977 May 11;460(2):299-307.

- [117] Khan AA, Schuler MM, Prior MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, Lillie LE. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990 May;103(3):482-90.
- [118] Roman HB, Hirschberger LL, Krijt J, Valli A, Kožich V, Stipanuk MH. The cysteine dioxygenase knockout mouse: altered cysteine metabolism in nonhepatic tissues leads to excess H₂S/HS(-) production and evidence of pancreatic and lung toxicity. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Oct 20;19(12):1321-36.
- [119] Ueki I, Roman HB, Valli A, Fieselmann K, Lam J, Peters R, Hirschberger LL, Stipanuk MH. Knockout of the murine cysteine dioxygenase gene results in severe impairment in ability to synthesize taurine and an increased catabolism of cysteine to hydrogen sulfide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Oct;301(4):E668-84. doi: 10.1152/ajpendo.00151.2011.
- [120] Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1992;32:109-34.
- [121] Janáky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS. Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochem Res.* 2000 Oct;25(9-10):1397-405.
- [122] Sprince H, Parker CM, Smith GG, Gonzales LJ. Protection against acetaldehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-2-methylthiazolidine-4-carboxylic acid. *Agents Actions.* 1974 Apr;4(2):125-30.
- [123] White RD, Wilson DM, Glosson JA, Madsen DC, Rowe WB, Goldberg DI. Toxicity evaluations of L-cysteine and Procysteine, a cysteine prodrug, given once intravenously to neonatal rats. *Toxicol Lett.* 1993 Jul;69(1):15-24.
- [124] Karlsen RL, Grofova I, Malthe-Sørensen D, Fonnum F. Morphological changes in rat brain induced by L-cysteine injection in newborn animals. *Brain Res.* 1981 Mar 9;208(1):167-80.
- [125] Strubelt O, Siegers CP, Schütt A. The curative effects of cysteamine, cysteine, and dithiocarb in experimental paracetamol poisoning. *Arch Toxicol.* 1974;33(1):55-64.
- [126] Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. 1985-86 izd. Sv. 2. Sweet DV, ur. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health; 1987. Cysteine, L-; str. 1826-7.
- [127] Registry of Toxic Effects of Chemical Substances. 1985-86 izd. Sv. 2. Sweet DV, ur. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health; 1987. Cysteine, N-acetyl, L-; str. 1827.

- [128] Martin TA, Causey DH, Sheffner AL, Wheeler AG, Corrigan JR. Amides of N-acylcysteines as mucolytic agents. *J. Med. Chem.* 1967;10(6):1172-6.
- [129] Goldenthal EI. A compilation of LD50 values in newborn and adult animals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1971 Jan;18(1):185-207.
- [130] Dilger RN, Toue S, Kimura T, Sakai R, Baker DH. Excess dietary L-cysteine, but not L-cystine, is lethal for chicks but not for rats or pigs. *J Nutr.* 2007 Feb;137(2):331-8.
- [131] Dilger RN, Baker DH. Oral N-acetyl-L-cysteine is a safe and effective precursor of cysteine. *J Anim Sci.* 2007 Jul;85(7):1712-8.
- [132] Li H, Ma Y, Escaffre O, Ivanciuc T, Komaravelli N, Kelley JP, Coletta C, Szabo C, Rockx B, Garofalo RP, Casola A. Role of hydrogen sulfide in paramyxovirus infections. *J Virol.* 2015 May;89(10):5557-68.
- [133] Bazhanov N, Escaffre O, Freiberg AN, Garofalo RP, Casola A. Broad-Range Antiviral Activity of Hydrogen Sulfide Against Highly Pathogenic RNA Viruses. *Sci Rep.* 2017 Jan 20;7:41029.
- [134] Bazhanov N, Ivanciuc T, Wu H, Garofalo M, Kang J, Xian M, Casola A. Thiol-Activated Hydrogen Sulfide Donors Antiviral and Anti-Inflammatory Activity in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Viruses.* 2018 May 10;10(5):249.
- [135] Geiler J, Michaelis M, Naczek P, Leutz A, Langer K, Doerr HW, Cinatl J Jr. 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.* 2010 Feb 1;79(3):413-20.
- [136] Mata M, Morcillo E, Gimeno C, Cortijo J. N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibit mucin synthesis and pro-inflammatory mediators in alveolar type II epithelial cells infected with influenza virus A and B and with respiratory syncytial virus (RSV). *Biochem Pharmacol.* 2011 Sep 1;82(5):548-55.
- [137] Mata M, Sarrion I, Armengot M, Carda C, Martinez I, Melero JA, Cortijo J. Respiratory syncytial virus inhibits ciliogenesis in differentiated normal human bronchial epithelial cells: effectiveness of N-acetylcysteine. *PLoS One.* 2012;7(10):e48037. doi: 10.1371/journal.pone.0048037.
- [138] Garigliany MM, Desmecht DJ. N-acetylcysteine lacks universal inhibitory activity against influenza A viruses. *J Negat Results Biomed.* 2011 May 9;10:5.
- [139] Ming L, Li Z, Li X, Tang L, He G. Antiviral activity of diallyl trisulfide against H9N2 avian influenza virus infection in vitro and in vivo. *Virol J.* 2021 Aug 19;18(1):171.
- [140] Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija.* Zagreb: Medicinska naklada;2013.

- [141] Akhter J, Quéromès G, Pillai K, Kepenekian V, Badar S, Mekawy AH, Frobert E, Valle SJ, Morris DL. The combination of bromelain and acetylcysteine (BromAc) synergistically inactivates SARS-CoV-2. *Viruses*. 2021 Mar 6;13(3):425.
- [142] Knobil K, Choi AM, Weigand GW, Jacoby DB. Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1):L134-42.
- [143] Hu X, Xiao Y, Sun J, Ji B, Luo S, Wu B, Zheng C, Wang P, Xu F, Cheng K, Hua H, Li D. New possible silver lining for pancreatic cancer therapy: Hydrogen sulfide and its donors. *Acta Pharm Sin B*. 2021 May;11(5):1148-1157.
- [144] Behera AK, Matsuse H, Kumar M, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):188-95.
- [145] Jornot L, Morris MA, Petersen H, Moix I, Rochat T. N-acetylcysteine augments adenovirus-mediated gene expression in human endothelial cells by enhancing transgene transcription and virus entry. *J Gene Med*. 2002 Jan-Feb;4(1):54-65.
- [146] Haas de Mello A, Liu T, Garofalo RP, Casola A. Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 Rescues NRF2 Activation in Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jul 21;11(7):1410.
- [147] Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, von Knethen A. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 20;18(12):2772.
- [148] Zhang RH, Li CH, Wang CL, Xu MJ, Xu T, Wei D, Liu BJ, Wang GH, Tian SF. N-acetyl-l-cysteine (NAC) protects against H9N2 swine influenza virus-induced acute lung injury. *Int Immunopharmacol*. 2014 Sep;22(1):1-8.
- [149] Jamaluddin M, Tian B, Boldogh I, Garofalo RP, Brasier AR. Respiratory syncytial virus infection induces a reactive oxygen species-MSK1-phospho-Ser-276 RelA pathway required for cytokine expression. *J Virol*. 2009 Oct;83(20):10605-15.
- [150] Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem*. 2004 Sep;136(3):261-5.
- [151] Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):191-205.

- [152] Kujime K, Hashimoto S, Gon Y, Shimizu K, Horie T. p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3222-8.
- [153] Canty TG Jr, Boyle EM Jr, Farr A, Morgan EN, Verrier ED, Pohlman TH. Oxidative stress induces NF-kappaB nuclear translocation without degradation of IkappaBalpha. *Circulation.* 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II361-4.
- [154] Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):24233-41.
- [155] Liu P, Jamaluddin M, Li K, Garofalo RP, Casola A, Brasier AR. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol.* 2007 Feb;81(3):1401-11.
- [156] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Urođena imunost. U: Batinić D, Lukinović-Škudar V, ur. Stanićna i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 51-86.
- [157] Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med.* 2008 Nov 1;45(9):1252-62.
- [158] Panaro MA, Mitolo V. Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999 Aug;21(3):397-419.
- [159] Eylar E, Rivera-Quinones C, Molina C, Báez I, Molina F, Mercado CM. N-acetylcysteine enhances T cell functions and T cell growth in culture. *Int Immunol.* 1993 Jan;5(1):97-101.
- [160] Allen RC. Neutrophil Leukocyte: Combustive Microbicidal Action and Chemiluminescence. *J Immunol Res.* 2015;2015:794072.
- [161] Villagrasa V, Cortijo J, Martí-Cabrera M, Ortiz JL, Berto L, Esteras A, Bruseghini L, Morcillo EJ. Inhibitory effects of N-acetylcysteine on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Pharm Pharmacol.* 1997 May;49(5):525-9.
- [162] Dent G, Rabe KF, Magnussen H. Augmentation of human neutrophil and alveolar macrophage LTB4 production by N-acetylcysteine: role of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol.* 1997 Oct;122(4):758-64.

- [163] Miller TW, Wang EA, Gould S, Stein EV, Kaur S, Lim L, Amarnath S, Fowler DH, Roberts DD. Hydrogen sulfide is an endogenous potentiator of T cell activation. *J Biol Chem*. 2012 Feb 3;287(6):4211-21.
- [164] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Aktivacija limfocita T. U: Batinić D, Lukinović-Škudar V, ur. Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 199-212.
- [165] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunotolerancija i autoimunost. U: Batinić D, Lukinović-Škudar V, ur. Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. Str. 315-37.
- [166] Dagenais-Lussier X, Aounallah M, Mehraj V, El-Far M, Tremblay C, Sekaly RP, Routy JP, van Grevenynghe J. Kynurenine Reduces Memory CD4 T-Cell Survival by Interfering with Interleukin-2 Signaling Early during HIV-1 Infection. *J Virol*. 2016 Aug 12;90(17):7967-79.
- [167] Liu X, Hu Z, Zhou H. N-Acetylcysteine Improves Inflammatory Response in COPD Patients by Regulating Th17/Treg Balance through Hypoxia Inducible Factor-1 α Pathway. *Biomed Res Int*. 2021 Jun 29;2021:6372128.
- [168] da Costa LS, Outlioua A, Anginot A, Akarid K, Arnoult D. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through cytopathogenic effect-induced potassium efflux. *Cell Death Dis*. 2019 Apr 25;10(5):346.
- [169] Liu X, Lu X, Hu Z. N-Acetylcysteine (NAC) Inhibits Synthesis of IL-18 in Macrophage by Suppressing NLRP3 Expression to Reduce the Production of IFN- γ from NK Cells. *Comput Math Methods Med*. 2021 Dec 3;2021:7596343.
- [170] Castelblanco M, Lugrin J, Ehrchiou D, Nasi S, Ishii I, So A, Martinon F, Busso N. Hydrogen sulfide inhibits NLRP3 inflammasome activation and reduces cytokine production both in vitro and in a mouse model of inflammation. *J Biol Chem*. 2018 Feb 16;293(7):2546-2557.
- [171] Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, Dean K, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):712-29.
- [172] Xia Z, Liu M, Wu Y, Sharma V, Luo T, Ouyang J, McNeill JH. N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression. *Eur J Pharmacol*. 2006 Nov 21;550(1-3):134-42.

- [173] Mayer M, Noble M. N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 2;91(16):7496-500.
- [174] Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jan;9(1):49-89.
- [175] Yilmaz B, Türkçü G, Şengül E, Gül A, Özkurt FE, Akdağ M. Efficacy of N-Acetylcysteine on Wound Healing of Nasal Mucosa. *J Craniofac Surg*. 2015 Jul;26(5):e422-6. doi: 10.1097/SCS.0000000000001880.
- [176] Ghezzi P, Ungheri D. Synergistic combination of N-acetylcysteine and ribavirin to protect from lethal influenza viral infection in a mouse model. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004 Jan-Apr;17(1):99-102.
- [177] Garozzo A, Tempera G, Ungheri D, Timpanaro R, Castro A. N-acetylcysteine synergizes with oseltamivir in protecting mice from lethal influenza infection. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007 Apr-Jun;20(2):349-54.
- [178] Lai KY, Ng WY, Osburga Chan PK, Wong KF, Cheng F. High-dose N-acetylcysteine therapy for novel H1N1 influenza pneumonia. *Ann Intern Med*. 2010 May 18;152(10):687-8.
- [179] Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials*. 1996 Feb;17(1):1-12.
- [180] Yagdi E, Cerella C, Dicato M, Diederich M. Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: Friend or foe? *Food Chem Toxicol*. 2016 Sep;95:219-33.
- [181] Josling P. Preventing the common cold with a garlic supplement: a double-blind, placebo-controlled survey. *Adv Ther*. 2001 Jul-Aug;18(4):189-93.
- [182] Lissiman E, Bhasale AL, Cohen M. Garlic for the common cold. 11. studenoga 2014. [pristupljeno 15. lipnja 2023.] U: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [internet]. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; c2014. doi: 10.1002/14651858.CD006206.pub4.
- [183] De Flora S, Grassi C, Carati L. Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J*. 1997 Jul;10(7):1535-41.
- [184] Kuzman I. Akutna respiratorna bolest. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A. *Klinička infektologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 106-10.

- [185] Rahmanzade R, Rahmanzadeh R, Hashemian SM, Tabarsi P. Iran's Approach to COVID-19: Evolving Treatment Protocols and Ongoing Clinical Trials. *Front Public Health*. 2020 Sep 4;8:551889.
- [186] Panahi Y, Ghanei M, Rahimi M, Samim A, Vahedian-Azimi A, Atkin SL, Sahebkar A. Evaluation the efficacy and safety of N-acetylcysteine inhalation spray in controlling the symptoms of patients with COVID-19: An open-label randomized controlled clinical trial. *J Med Virol*. 2023 Jan;95(1):e28393. doi: 10.1002/jmv.28393.
- [187] ARDS Definition Task Force; Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526-33.
- [188] Taher A, Lashgari M, Sedighi L, Rahimi-Bashar F, Poorolajal J, Mehrpooya M. A pilot study on intravenous N-Acetylcysteine treatment in patients with mild-to-moderate COVID19-associated acute respiratory distress syndrome. *Pharmacol Rep*. 2021 Dec;73(6):1650-1659.
- [189] de Alencar JCG, Moreira CL, Müller AD, Chaves CE, Fukuhara MA, da Silva EA, Miyamoto MFS, Pinto VB, Bueno CG, Lazar Neto F, Gomez Gomez LM, Menezes MCS, Marchini JFM, Marino LO, Brandão Neto RA, Souza HP; COVID Register Group. Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial With N-acetylcysteine for Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Caused by Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2021 Jun 1;72(11):e736-e741. doi: 10.1093/cid/ciaa1443.
- [190] COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment guidelines [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 21. travnja 2021. [ažurirano 27. travnja 2023.; prisutpljeno 18. lipnja 2023.]. Dostupno na: <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>.
- [191] Assimakopoulos SF, Aretha D, Komninos D, Dimitropoulou D, Lagadinou M, Leonidou L, Oikonomou I, Mouzaki A, Marangos M. N-acetyl-cysteine reduces the risk for mechanical ventilation and mortality in patients with COVID-19 pneumonia: a two-center retrospective cohort study. *Infect Dis (Lond)*. 2021 Nov;53(11):847-854.
- [192] Izquierdo JL, Soriano JB, González Y, Lumbreras S, Ancochea J, Echeverry C, Rodríguez JM. Use of N-Acetylcysteine at high doses as an oral treatment for patients hospitalized with COVID-19. *Sci Prog*. 2022 Jan-Mar;105(1):1-12.
- [193] Wang EE, Milner RA, Navas L, Maj H. Observer agreement for respiratory signs and oximetry in infants hospitalized with lower respiratory infections. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Jan;145(1):106-9.

[194] Naz F, Raza AB, Ijaz I, Kazi MY. Effectiveness of nebulized N-acetylcysteine solution in children with acute bronchiolitis. J Coll Physicians Surg Pak. 2014 Jun ;24(6):408-11.