

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Terapeutické a toxické účinky paracetamolu

Ondřej Kačerovský

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Acetaminophen – therapy and toxicity

Ondřej Kačerovský

Bachelor thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ondřej Kačerovský**
Osobní číslo: **C17168**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Terapeutické a toxické účinky paracetamolu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis paracetamolu jako běžného léčiva. V rámci tohoto tématu se nejprve zaměřte na popis terapeutického využití tohoto léčiva s popisem účinků. Následně stručně popište příčiny předávkování a patofyziologické děje při něm probíhající. Nakonec se zaměřte na analýzu dat pocházejících z klinických studií.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60odst.1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s §47 b zákonač.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019. Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28.6. 2020

Ondřej Kačerovský

Poděkování :

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu práce doc. RNDr. Tomášovi Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas při zpracování této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována popisu paracetamolu jako běžného léčiva. První část bakalářské práce se zabývá popisem terapeutického využití tohoto léčiva s popisem účinků. Následně jsou popsány příčiny předávkování a patofyziologické děje při něm probíhající. Závěr bakalářské práce se zaměřuje na analýzu dat pocházejících z klinických studií.

Klíčová slova

Paracetamol, toxicita paracetamolu, hepatotoxicita.

ANNOTATION

The bachelor thesis focuses on the description of acetaminophen as a common drug. The first part of the bachelor thesis deals with the description of therapeutic use of the drug. Subsequently, the causes of overdose and ongoing pathophysiological processes are described. The conclusion of the bachelor thesis focuses on the analysis of clinical studies.

Klíčová slova

Acetaminophen, toxicity of acetaminophen, hepatotoxicity.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	14
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1	PARACETAMOL	15
2.1.1	Chemická struktura paracetamolu	15
2.2	METABOLISMUS PARACETAMOLU	16
2.2.1	N-acetylcystein	16
2.2.2	Cytochrom P450 2E1	18
2.2.3	N-acetyl-p-benzochinonimin.....	19
2.2.4	Transport APAP	20
2.2.4.1	Transportéry ABC	20
2.2.4.2	Transportéry SLC	21
2.3	TERAPEUTICKÉ VYUŽITÍ A ÚČINEK APAP	21
2.3.1	Mechanismus účinku paracetamolu	22
2.3.1.1	Analgetický účinek.....	25
2.3.1.2	Antipyretický účinek	28
2.4	UŽÍVÁNÍ A DÁVKOVÁNÍ PARACETAMOLU	29
2.4.1	Intravenózní podání APAP.....	31
2.5	TOXICKÉ ÚČINKY PARACETAMOLU	31
2.5.1	Hepatotoxicita	32
2.5.1.1	Tvorba mitochondriálních proteinových aduktů	33
2.5.1.2	Mitochondriální oxidační stres.....	33
2.5.1.3	Mitochondriální JNK translokace	34
2.5.2	Terapie při APAP hepatotoxicitě	35
2.5.2.1	4-methylpyrazol.....	35
2.5.2.2	Calmagafodipir.....	36

2.5.2.3	Metformin.....	37
2.5.2.4	Methylenová modř	37
2.5.2.5	Nrf2 aktivátory	38
2.6	KAZUISTIKY APAP PŘEDÁVKOVÁNÍ	39
2.6.1	Úmyslné předávkování pomocí APAP v těhotenství.....	39
2.6.1.1	Předávkování těhotné ženy po požití 30 g APAP	40
2.6.2	Opakované podání terapeutických dávek APAP u dětí.....	41
2.6.2.1	Fatální otrava po opakovaném podání terapeutických dávek ...	41
2.7	KLINICKÉ STUDIE – VZTAH APAP A NEUROLOGICKÝCH ZMĚN.....	43
2.7.1	Vztah mezi užíváním APAP a vznikem ADHD u potomků	43
2.7.2	Užívání APAP a riziko možného vzniku poruchy autistického spektra u mužů	46
3.	ZÁVĚR	49
4.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázky

Obr. 1: <i>Chemická struktura paracetamolu</i>	15
Obr. 2: <i>Metabolismus paracetamolu</i>	17
Obr. 3: <i>Úloha signálních drah kinázy P38 a JNK buněk</i>	19
Obr. 4: <i>Prostaglandin H syntáza</i>	24
Obr. 5: <i>Schématické znázornění účinku APAP</i>	27
Obr. 6: <i>Mechanismus horečky</i>	28
Obr. 7: <i>Účinky APAP při hepatotoxicitě a možnosti terapie</i>	39
Obr. 8: <i>Histologické znaky v jaterní biopsii</i>	43

Tabulky

Tab. 1: <i>Dávkování APAP u dětí</i>	31
Tab. 2: <i>Spojení mezi nepřestnostmi a prevalencí ADHD pro analýzu zkreslení</i>	45
Tab. 3: <i>PAF spojený s postnatálním užíváním APAP u mužů podle vrstev</i>	48

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

4MP	4-methylpyrazol
5-HT3	serotoninové receptory
AA	kyselina arachidonová
ABC	kazetové transportéry
ADHD	porucha hyperaktivity s deficitem pozornosti
ALF	akutní selhání jater (<i>acute liver failure</i>)
ALT	alaninaminotransferáza
AM404	<i>N</i> -arachidonoylfenolamin
AMAP	<i>N</i> -acetyl-meta-aminofenol
APAP	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -aminofenol, paracetamol
ASD	porucha autistického spektra
ASK	kináza regulující signál apoptózy
AST	aspartátaminotransferáza
CB1	receptor pro kanabinoidy
CI	interval spolehlivosti
CMFP	calmangafodipir
COX	cyklooxygenáza
COX-1	cyklooxygenáza 1
COX-2	cyklooxygenáza 2
CYP	cytochrom P450
CYP2E1	cytochrom P450 2E1
FAAH	amidová hydroláza mastných kyselin
GSH	glutathion
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
JNK	c-jun <i>N</i> -terminální kináza
MAP	mitogenem aktivované proteinkinázy
MLB	methylenová modř
mPGES-1	mikrosomální syntáza prostaglandinu E2
MTFN	metformin
NAC	<i>N</i> -acetylcystein
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin

Nf-KB	transkripční faktor
NSAID	nesteroidní antirevmatika (<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
OATPs	polypeptidy transportující organický anion
OCT	transportéry organických kationtů
OR	míra pravděpodobnosti
PAF	zlomek připisatelný k populaci
PAG	periakvaduktální šedá hmota
PGE₂	prostaglandin E2
PGH₂	prostaglandin H
PGHS	prostaglandin H syntáza
ROS	reaktivní druhy kyslíku (<i>reactive oxygen species</i>)
RR	relativní riziko
RVM	rostroventrální medulla
SHP1	protein tyrosin fosfatázy
SLC	transportéry solutních nosičů (<i>solute carrier</i>)
TLR4	<i>toll-like</i> receptor
TRPV1	vaniloidní receptor
TXA2	tromboxan

1. ÚVOD

Paracetamol, také znám jako acetaminofen (*N*-acetyl-*p*-aminofenol, APAP) je celosvětově nejčastěji používaným léčivem s analgetickým a antipyretickým účinkem.

Toxicita APAP představuje 46 % případů akutního selhání jater (ALF) ve Spojených státech amerických a mezi 40 a 70 % ze všech případů ve Velké Británii a v Evropě. Toxicita APAP zapříčiňuje několikanásobně více úmrtí související s ALF než všechny léky na předpis dohromady. Užívání APAP je bezpečné pouze, pokud je APAP užíván v předepsaných terapeutických dávkách.

Zároveň APAP zůstává důležitým nástrojem pro vědecké zkoumání, které se snaží lépe porozumět jaternímu metabolismu a mechanismu poškození jater.

2. TEORETICKÁ ČÁST

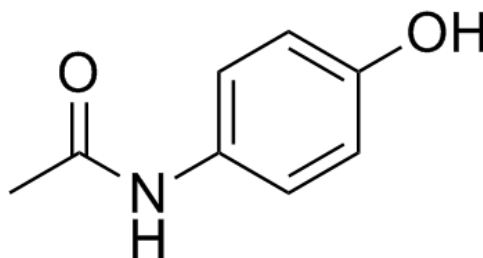
2.1 Paracetamol

APAP jako standardní analgetikum a antipyretikum se hojně používá ke snížení horečky bakteriálního nebo virového původu, kašle a nachlazení, je též účinně a bezpečně používáno po celém světě k úlevě od mírné až střední bolesti spojené s bolestmi zad, svalů, hlavy, zubů, artritidy a pooperačními bolestmi. APAP je běžně volně prodejné léčivo, které je přítomno v mnoha lécích (*Criado et al., 2000*).

Světová zdravotnická organizace jej uvádí jako základní lék a klinické pokyny v mnoha zemích jej doporučují jako lék první linie pro analgezií kvůli jeho dobré účinnosti a snášenlivosti (*McQuay, 2007*). APAP má nižší riziko nežádoucích účinků, jako je dysfunkce trávicího systému, poškození ledvin, zvýšená tendence ke krvácení a kardiovaskulárním problémům ve srovnání s nesteroidními antirevmatiky (NSAID) (*Zhang, 2010*).

2.1.1 Chemická struktura paracetamolu

Molekula APAP (Obr.1) se skládá z aromatické skupiny (benzenový kruh), amidové skupiny (R-CO – N (R1, R2)) a hydroxylové skupiny (R-OH) (*Kulo et al., 2012*).



Obr. 1: Chemická struktura paracetamolu

2.2 Metabolismus paracetamolu

U lidí je APAP metabolizován játry a vylučován močí jako acetaminofen glukoronid (47-62 %), acetaminosulfát (25-36 %), 3-hydroxy-paracetamol a *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) (8–10 %) a nezměněný acetaminofen (1–4 %) (*Kulo et al., 2012*).

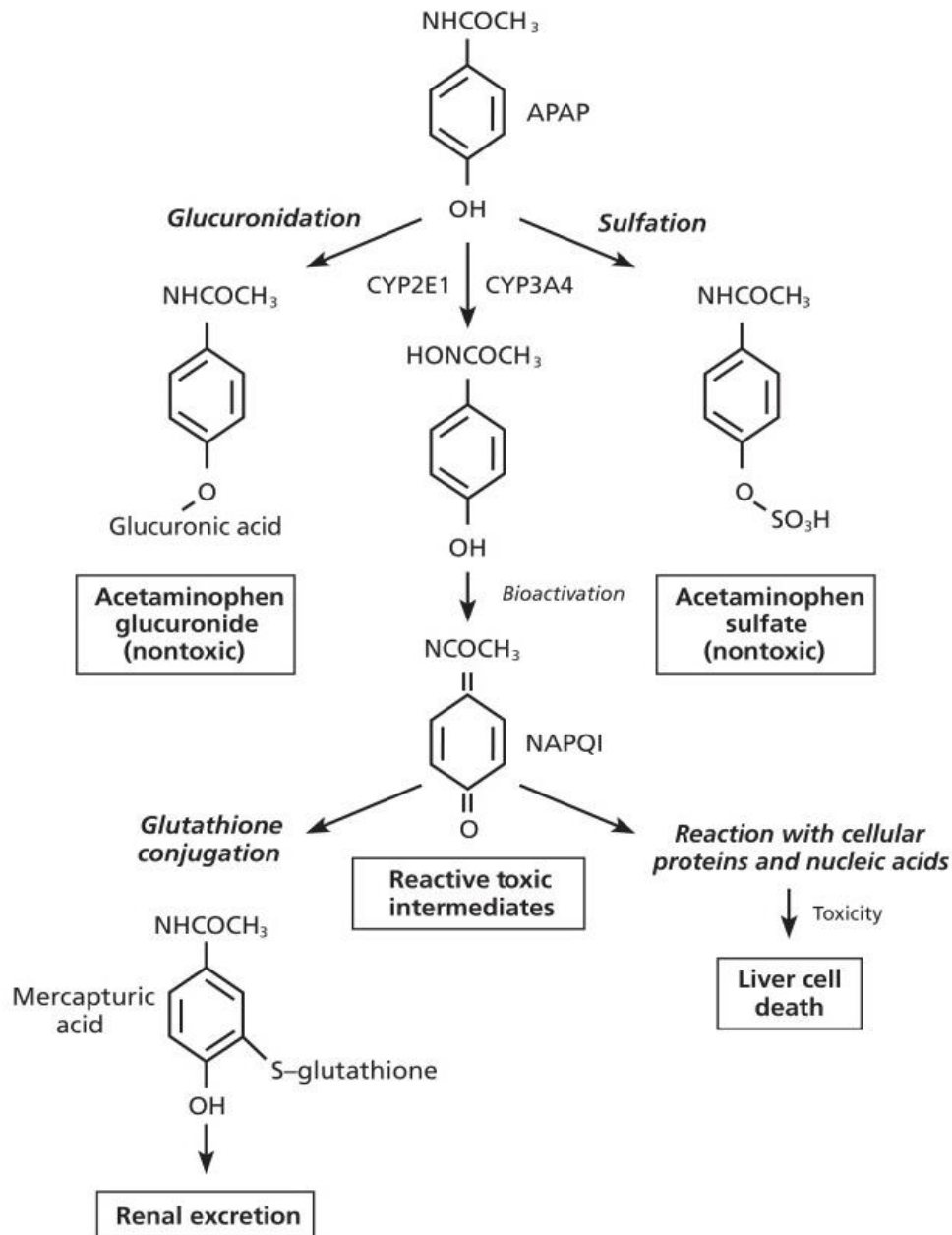
Předpokládá se, že k metabolismu v játrech dochází dvěma různými způsoby. Metabolismem fáze I a fáze II. Reakce fáze I jsou často zprostředkovány enzymy cytochromu P450, jako je CYP2E1 v případě APAP. Reakce fáze II zahrnují konjugací cesty, jako je glukuronidace, sulfatace a konjugace glutathionu (*Ogilvie et al., 2012*).

Glukuronidace a sulfatace produkují netoxické konečné produkty, které jsou vyloučeny močovým systémem. U normálních jedinců je přibližně 5 % APAP metabolizováno prostřednictvím cytochromu P450 za vzniku toxického metabolitu NAPQI. NAPQI je normálně metabolizován glutathionem (GSH) na cysteinový konjugát a merkapturát. (*McGill et al., 2013*).

Nicméně po vyšší dávce APAP se sulfonační reakce stává nasycenou a dochází k hromadění NAPQI, který vyčerpává GSH v játrech, což způsobuje další hromadění NAPQI. Metabolit může zcela vyčerpat jaterní GSH a modifikovat buněčné proteiny. Nekonjugovaný NAPQI se váže na proteiny a subcelulární struktury. Vazba na proteiny vede k oxidačnímu stresu a poškození mitochondrií hepatocytů, což může vést až k jaternímu selhání (*Schilling et al., 2010*). Hlavní biochemické dráhy jsou znázorněny na (Obr. 2).

2.2.1 N-acetylcystein

N-acetylcystein (NAC) je přímým substrátem syntézy GSH. Tento lék je výživový doplněk, který doplňuje intracelulární GSH. Je to antidotum, které se používá pro nedostatek GSH v celé řadě metabolických poruch, plicních onemocnění, neurotoxicity, hepatotoxicity a imunotoxicity. Obecně se uznává pro svou roli antidota (2,0–2,4 g perorální dávky NAC/den) při předávkování APAP. Při terapii intoxikace APAP je proto nutné ho dodat co nejdříve (do 10 hodin po požití látky) jako donátor -SH skupin (*Akturi et al., 2007*).



Obr. 2: *Metabolismus paracetamolu, (NAPQI-N-acetyl-benzochinonimin, CYP2E1- Cytochrom P450 2E1) (Ogilvie et al., 2012).*

2.2.2 Cytochrom P450 2E1

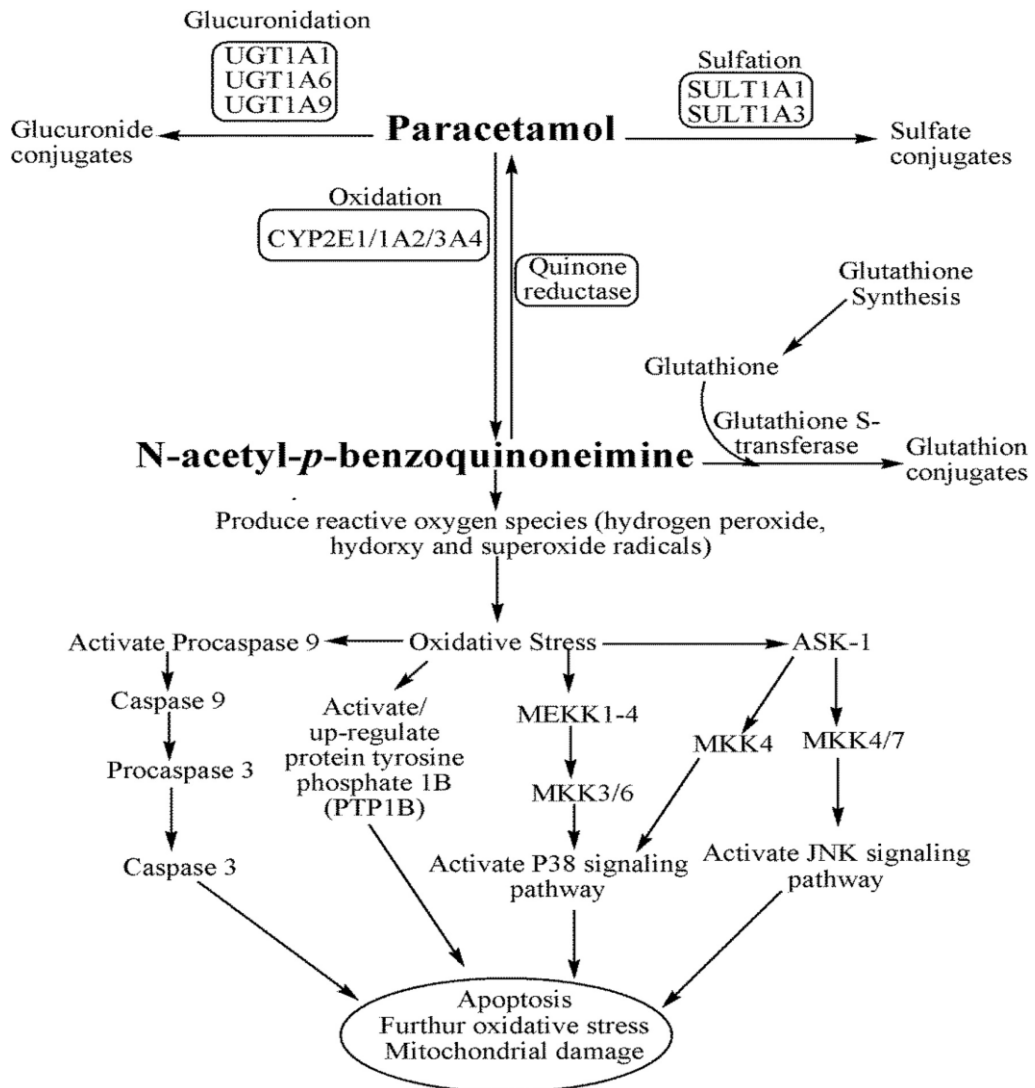
Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy fáze I podílející se na metabolismu četných endogenních a exogenních sloučenin. Enzymy CYP1 až CYP3 se většinou podílejí na biotransformaci xenobiotik a dlouho se předpokládalo, že se nacházejí výhradně v endoplazmatickém retikulu (ER). Během posledních dvou desetiletí však bylo několik těchto enzymů, jako je CYP1A1, CYP2B1, CYP2D6, CYP2E1, také nalezeno ve významných množstvích v jiných buněčných kompartmentech, a to zejména v mitochondriích (*Sangar et al., 2009*).

CYP2E1 metabolizuje četné malé toxikologické molekuly včetně ethanolu, APAP, halothanu, chloridu uhličitého a karcinogenů, jako jsou nitrosaminy. Hladina CYP2E1 může mít význam pro rychlost oxidace léčiv, zejména APAP. Enzymy CYP jsou odpovědné za cca 95 % oxidací a redukci chemikálií. Tyto enzymy byly studovány, protože jsou hlavními katalyzátory podílejícími se na metabolismu léčiv, steroidů, vitamínů rozpustných v tucích, chemických karcinogenů, průmyslových chemikálií a dalších entit. U lidí existuje 57 genů CYP. Lidský CYP2E1 je demetyláza *N*-nitrosodimethylaminu a patří do rodiny CYP. Je vysoce exprimován v játrech a hladiny se zvyšují při patofyziologických stavech, jako je hladovění, cukrovka, obezita a konzumace alkoholu. Gen CYP2E1 je lokalizován na chromozomu 10q26.3, skládá se z 9 exonů a 8 intronů (*Rendic, 2015*).

Pravděpodobně kvůli své preferenci malých molekul CYP2E1 nepřispívá k metabolismu mnoha léků. Kromě toho CYP2E1 generuje velké množství reaktivních druhů kyslíku (ROS), které mohou poškodit buněčné a mitochondriální složky, jako je mitochondriální DNA a cytochrom c oxidáza. Dále se například halothan a APAP pomocí CYP2E1 transformují na trichloracetylchlorid a NAPQI. Posledně uvedený reaktivní metabolit je schopen vyvolat hlavní oxidační stres, mitochondriální dysfunkci a zánik buněk (*Hinson et al., 2010*).

2.2.3 *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin

N-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) je toxický metabolit APAP tvořený primárně metabolickou dráhou CYP2E1 a CYP3A4 při podávání vyšších dávek APAP, ale i při užívání terapeutických dávek. Metabolická aktivace APAP na NAPQI pomocí CYP2E1 enzymem je kritická iniciační událost hepatální toxicity (Obr.3) (Saito *et al.*, 2010).



Obr. 3: Úloha signálních drah kinázy P38 a JNK buněk v APAP indukované hepatotoxicitě. (JNK-*c-jun* (NH₂) terminální kináza, NAPQI-*N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, ROS- druhy reaktivního kyslíku, CYP2E1- cytochrom P450-2E1, CYP3A4-cytochrom P450-3A4, CYP1A2-cytochrom P450-1A2, MEKK-MEK kináza, ASK-kináza regulující signál apoptózy, MKK-proteinkináza aktivovaná mitogenem) (Pingili, *et al.*, 2019).

2.2.4 Transport APAP

Dispozice a eliminace APAP závisí na jeho transportu různými typy buněk. Vyžaduje pohyb metabolitů přes APAP transportéry. Interakce APAP s běžnými nosiči léčiv byla řešena v kontextu dvou skupin transportérů, transportérů solutních nosičů (SLC) a kazetových transportérů (ABC) vázající ATP (*Kidron et al., 2012*). Transportéry ABC zprostředkovávají tok substrátů z buněk, zatímco transportéry SLC jsou zodpovědné za příjem substrátů do buněk.

2.2.4.1 Transportéry ABC

Vylučování APAP-gluc a APAP-sul do žluči zahrnuje nosiče ABCC2 a ABCG2, které se nacházejí v kanalikulární membráně hepatocytů. Pohyb APAP-gluc do krve závisí na transportéru ABCC3, zatímco transport APAP-sul závisí na ABCC3 a ABCC4, které jsou umístěny na sinusové straně jaterních buněk. Kromě toho mohou být transportéry ABCB1, ABCC1 a ABCC5 zapojeny do exkrece APAP u lidí, což je zřejmé ze změn v jejich expresi po požití vyšší dávky APAP. Játra od pacientů, kteří se předávkovali APAP, vykazují zvýšenou regulaci mRNA ABCC1 a ABCC4 a zvýšené hladiny proteinů ABCB1, ABCG2, ABCC4 a ABCC5 (*Barnes et al., 2007*).

Zvýšená exprese efluxních transportérů může být adaptivní změnou, která zastaví hromadění toxických metabolitů v buňkách a zabrání dalšímu poškození jater. V souladu s touto hypotézou je zvýšená proliferace hepatocytů a lokalizace regulovaných transportérů v místech rychle se replikujících jaterních buněk (*Barnes et al., 2007*). Tyto adaptivní reakce na toxické hladiny APAP mají za následek získanou rezistenci vůči opakovanému poškození jater. Tento jev připomíná autoprotekci pozorovanou u experimentálních zvířat, kde počáteční subtoxické dávky APAP chránily hlodavce před následnou smrtící dávkou léčiva (*Rudraiah et al., 2014*). Jednotlivé případy naznačují, že u lidských subjektů se může vyvinout tolerance vůči opakovaným a vysokým dávkám APAP bez poškození jater. I když mechanismus takové rezistence na hepatotoxicitu v důsledku předávkování APAP nebyl u těchto pacientů zcela objasněn, za vývoj tolerance vůči chronickým a letálním dávkám tohoto léku může být odpovědná autoprotekce prostřednictvím regulace efluxních transportérů (*Khamdang et al., 2002*).

2.2.4.2 Transportéry SLC

Transportéry SLC se skládají ze dvou genových skupin, skupiny SLC22A, která obsahuje transportéry organických kationtů (OCT) a transportéry organických anionů (OAT), a skupiny SLCO, které zahrnují polypeptidy transportující organický anion (OATPs). OATP převážně transportují velké hydrofobní organické anionty, zatímco OAT transportují malé a hydrofilní molekuly. OCT zprostředkovávají pohyb kationtů (*Roth et al., 2012*).

2.3 Terapeutické využití a účinek APAP

V padesátých letech 20. století byly analgetické a antipyretické vlastnosti APAP objeveny Brodiem a Axelrodem a prokázali, že APAP byl ve skutečnosti aktivním metabolitem fenacetinu. V té době byl APAP uveden na trh USA jako náhrada léku za fenacetin, jehož užívání bylo přerušeno kvůli jeho nefrotoxickému působení. Vzhledem k přijetí APAP jako bezpečnější alternativy k fenacetinu se APAP stal jedním z nejpopulárnějších a široce používaných volně prodejných, ale i předepisovaných analgetických a antipyretických léků na světě (*Ghanem et al., 2016*).

Od osmdesátých let se APAP stal první volbou pro léčbu bolesti a horečky u dětí, protože byl zaznamenán vysoký výskyt Reyeova syndromu spojeného s používáním aspirinu. V USA přibližně 79 % obecné populace užívá APAP pravidelně. Mnoho receptů na předpis i bez předpisu obsahuje APAP samotný nebo v kombinaci s jinými léky. Nadměrná samoléčba je převládající příčinou odpovědnou za mnoho případů intoxikace APAP (*Wilcox et al., 2005*).

Historicky byl APAP původně kategorizován jako NSAID. Několik výzkumů porovnávalo mechanismus účinku APAP s účinky mechanismu klasických NSAID, jako je kyselina acetylsalicylová, která inhibuje cyklooxygenázovou (COX) cestu. Ukázalo se však, že APAP je jako protizánětlivý lék neúčinný. Je dobře známo, že NSAID inhibuje produkci prostaglandinů závislou na COX (*Bertolini et al., 2006*).

APAP do značné míry postrádá periferní protizánětlivé vlastnosti, což naznačuje, že místo jeho farmakologického působení je v centrálním nervovém systému (CNS). APAP ve skutečnosti prochází přes hematoencefalickou bariéru a je distribuován homogenně v CNS při nízkých, terapeutických nebo toxických dávkách. Klinické studie prokázaly přítomnost APAP v mozkomíšním moku. Ukázalo se, že APAP v mozku

zapřičiňuje selektivní inhibici dráhy COX, zatím co tato inhibice APAP chybí v periferních tkáních, jako je například žaludek (*Kumpulainen et al., 2007*).

Tato tkáňová selektivita pro inhibici COX vysvětluje nepříznivé účinky vyvolané klasickými NSAID, včetně žaludečních vředů a změn v hemostáze, které nejsou pozorovány při krátkodobém ani dlouhodobém terapeutickém užívání APAP. Mechanismus inhibice COX neprobíhá přímou vazbou APAP na aktivní místo enzymu. Na druhou stranu se zdá, že APAP snižuje aktivní formu COX. Tento mechanismus inhibice také vysvětluje, proč se COX inhibice APAP vyskytuje pouze v oblastech, kde jsou hladiny peroxidů velmi nízké, jako je mozek (*Boutaud et al., 2002*). Tato peroxidem zprostředkovaná inhibice aktivity COX může také vysvětlit, proč APAP není aktivní v periferních místech zánětu, kde je koncentrace peroxidu větší než koncentrace v mozku. Podobně byly navrženy nízké dávky APAP ke snížení oxidačního stresu, který se podílí na uvolňování prostaglandinu a horečce (*Hou et al., 2011*).

APAP kromě svých antipyretických vlastností také vyvolává analgezií. Několik studií naznačuje, že k těmto dvěma farmakologickým účinkům dochází prostřednictvím odlišných mechanismů. Nejpozději poznáný mechanismus účinku pro analgetické působení APAP, který zahrnuje modulaci endogenního kanabinoidního systému, je popsán v kap. 2.3.1.1. Tento mechanismus může poskytnout vysvětlení „relaxačního“ nebo „uklidňujícího“ efektu, který byl hlášen u některých pacientů, kteří užívají APAP. Tento účinek je charakterizován zvláštním pocitem pohody, relaxace a klidu (*Piomelli et al., 2000*).

2.3.1 Mechanismus účinku paracetamolu

Po mnoho let byl mechanismus účinku paracetamolu nejistý a i v dnešní době není zcela objasněn. Všechny běžné NSAID inhibují přeměnu kyseliny arachidonové (AA) na prostaglandin H (PGH₂). Stupeň přeměny je katalyzován prostaglandin H syntázou (PGHS), označovanou jako cyklooxygenáza (COX), u níž se vyskytují izoenzymy COX-1 a COX-2 (*Hinz, 2002*). PGHS je bifunkční enzym a má dvě různé enzymatické aktivity: cyklooxygenázovou a peroxidázovou. Konverze AA → PGH₂ zahrnuje dvě reakce. Cyklizaci AA na nestabilní 15-hydroxyperoxid (PGG₂) se zapojením cyklooxygenázové složky a dvojitou oxidací v poloze 9 a 11 a redukcí molekuly PGG₂ na její 15-hydroxy-analog, nestabilní struktura PGH₂ nastává v důsledku peroxidázové aktivity PGHS. PGH₂ je substrátem pro specifické syntázy, tkáňově závislé izomerázy

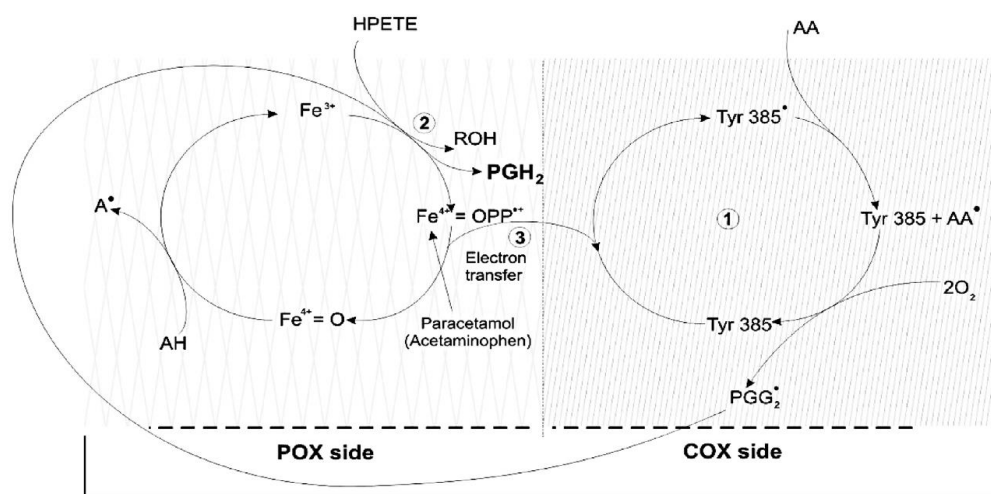
katalyzující jeho další přeměny na různé endogenní regulátory, jmenovitě: prostaglandiny řady D (PGD₂), E (PGE₂), F (PGF₂) prostacyklin (PGI₂) a tromboxany (TXA₂ a TXB₂) (Nowak *et al.*, 2012). Zatímco tradiční NSAID a selektivní inhibitory COX-2 inhibují COX prostřednictvím soutěžení s AA o aktivní místo enzymu, tak APAP působí jako redukující faktor radikálového kationtu ferryprotoporfyriu IX v místě peroxidázy PGHS (Obr. 4) (Hinz, 2012).

Na rozdíl od NSAID APAP neinhibuje COX v periferních tkáních a nemá tedy žádné periferní protizánětlivé účinky. Studie zjistily, že APAP nepřímo inhibuje COX, a že tato inhibice je v přítomnosti peroxidů neúčinná. To by mohlo vysvětlit, proč je APAP účinný v CNS a v endoteliálních buňkách, ale nikoliv v krevních destičkách a imunitních buňkách, kde se vyskytují vysoké hladiny peroxidů. Bylo pozorováno, že účinky APAP *in vivo* jsou podobné účinkům selektivních inhibitorů COX-2. Navíc, zatímco APAP je slabým inhibitorem syntézy prostaglandinů v nefunkčních buněčných systémech, terapeutické koncentrace APAP inhibují syntézu prostaglandinů v intaktních buňkách *in vitro*, když jsou hladiny AA nízké. Za těchto podmínek jsou prostaglandiny syntetizovány převážně COX-2. Bylo tedy navrženo, že účinky APAP mohou být způsobeny selektivní inhibicí drah závislých na COX-2, které postupují nízkými rychlostmi (Graham *et al.*, 2005).

Před několika lety byla sestřihová varianta COX-1, odvozená od stejného genu, objevena v mozku psa, který byl citlivý na inhibici APAP. Tato varianta byla označena jako COX-3 a zdálo se, že analgezie a hypotermie způsobené APAP jsou zprostředkované inhibicí COX-3. Pozdější studie však ukázaly, že zatímco COX-3 může být u psů aktivní, jeho nízká úroveň exprese a nepříznivá kinetika naznačují nepravděpodobný klinický význam. U hlodavců a lidí kóduje COX-3 proteiny se zcela odlišnými aminokyselinovými sekvencemi než COX-1 nebo COX-2 a bez aktivity COX, takže je nepravděpodobné, že COX-3 u těchto druhů hraje roli při horečce, nebo bolesti zprostředkované prostaglandiny (Chandrasekhar *et al.*, 2002). V posledních desetiletích se tedy předpokládalo, že APAP svůj analgetický a antipyretický účinek zprostředkovává pomocí centrálního působení a inhibičním účinkem na COX-1 a COX-2 a následným snížením produkce PGH₂.

Studie provedené Grahamem a Scottem ukázaly, že APAP skutečně inhiboval syntézu prostaglandinů v dobře fungujících buňkách, avšak nevykazoval stejný účinek v homogenátu tkáně či buněk, kde byla koncentrace AA nízká (Graham *et al.*, 2005). Dále bylo zjištěno, že APAP má inhibiční dopad na aktivitu COX-1 a COX-2 v periferních

tkáních, i když ne ve stejném rozsahu, protože ve vztahu k COX-2 byl vždy pozorován silnější účinek, zejména v buňkách vaskulárního endotelu. Hinz a kol. naznačuje, že orálně podávaný APAP v dávce 1 g inhiboval 80 % aktivity COX-2 v lidských krevních monocyttech. Z výsledků rozsáhlých studií Hinze a Bruna zveřejněných v letech 2006–2012 vyplývá, že APAP je preferenčním inhibitorem izoenzymu COX-2, jeho účinek však do značné míry závisí na stavu oxidace/redukce prostředí (Hinz *et al.*, 2008).



Obr. 4: Prostaglandin H syntáza, (AA-kyselina arachidonová, AA*-radikál kyseliny arachidonové, A*-oxidovaný kosubstrát, AH–redukovaný kosubstrát, Fe^{3+} -enzym v klidu, Fe^{4+} =protoporfyrin IX (hem), Fe^{4+} =OPP*-protoporfyrinový radikál IX, HPETE-hydroperoxydy mastných kyselin; PGG_2^* -prostaglandinový G_2 obsahující peroxidový radikál, PGH_2 -prostaglandin H, ROH–alkohol, Tyr385* -tyrosinový radikál) (Anderson *et al.*, 2008).

2.3.1.1 Analgetický účinek

APAP zvyšuje práh bolesti inhibicí dvou izoforem COX, tj. COX-1 a COX-2, které se podílejí na syntéze PGH₂. PGH₂ je zodpovědný za vyvolání pocitů bolesti.

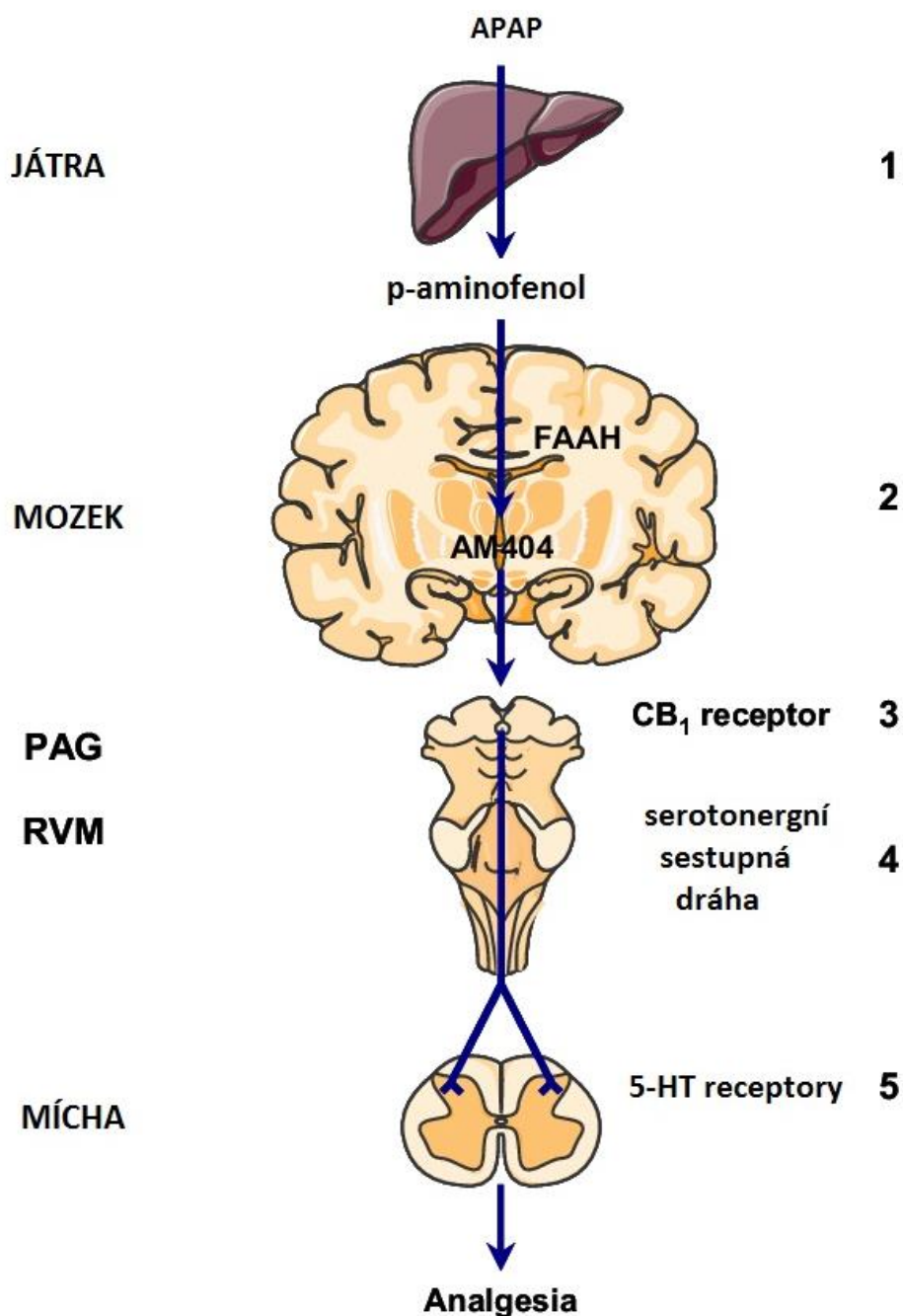
Mezi dalšími možnostmi centrálního působení APAP byl diskutován jeho stimulační účinek na sestupné serotoninergické dráhy, které se podílejí na inhibici pocitů bolesti. Tato teorie byla potvrzena studii *in vivo* na zvířatech i na lidech. Alloui a kol. provedli studii analgetického a protizánětlivého účinku APAP u potkanů, kterým byl podán karagenin. Protizánětlivý účinek APAP nebyl pozorovaný, avšak byl detekován centrální antinociceptivní účinek tohoto léku s účastí podtypu 5-HT₃ serotoninových receptorů (Alloui *et al.*, 2002). Studie na zdravých dobrovolnících, u nichž byla bolest vyvolána elektrickou stimulací středního nervu, ukázala, že analgetický účinek APAP byl zcela inhibován ve skupině subjektů léčených APAP kombinovaným s tropisetronem nebo granisetronem (antagonisté receptoru 5HT₃). Údaje týkající se centrálního působení APAP prostřednictvím jeho účinku na sestupné serotoninergní dráhy nevylučují hypotézu předpokládající přítomnost (nebo koexistenci) inhibice syntézy prostaglandinů. Prostaglandin PGE₂ moduluje četné fyziologické procesy a může také ovlivňovat nociceptivní a autonomní procesy prostřednictvím svého antinociceptivního vlivu na sestupný serotoninergní systém (Pickering *et al.*, 2008).

Studie o mechanismu účinku APAP jej považují za prekurzor léčiva, který díky svým aktivním metabolitům prokazuje asociaci s endokanabinoidním systémem. Bylo pozorováno, že v mozku a míše u myší je APAP podroben deacetylaci na *p*-aminofenol, který reaguje s AA ovlivněnou amidhydrolázou mastných kyselin (FAAH), což vede k tvorbě aktivního metabolitu léčiva, amidu mastných kyselin *N*-arachidonoylfenolaminu (AM404) (Ottani *et al.*, 2006). AM404 nepůsobí přímo na kanabinoidní receptory, zvyšuje však nepřímo aktivitu endokanabinoidního systému. Na jedné straně je tato sloučenina silným aktivátorem vaniloidního receptoru podtypu 1 (TRPV1), který je ligandem receptorů pro kanabinoidy CB1, a na druhé straně vede ke zvýšení endogenní zásoby těchto sloučenin jako inhibitoru zpětného vychytávání endogenního kanabinoidu (anandamid). Endogenní kanabinoidy, např. anandamid, působí antinociceptivně jak na úrovni míchy, tak i mozku. Studie na potkanech provedená Bertolinim a kol. uvádí, že dřívější podávání receptoru CB1 inhibovalo aktivitu AM404 a úplně inhybovalo analgetické působení APAP u zvířat. Kromě toho kanabinoidy výrazně snižují tělesnou teplotu aktivací receptorů CB1 v preoptické oblasti. Je známo, že analgetické deriváty

anilinu mají podobný účinek jako kanabinoidy, jako je zlepšení nálady, psychická relaxace a sedace. Dále bylo zjištěno, že různé koncentrace AM404 inhibují enzymy COX-1 a COX-2. Tento mechanismus může být důležitý zejména v takových oblastech mozku, ve kterých lze pozorovat vysokou koncentraci enzymu FAAH, např. v mezencefálním trigeminálním jádru, kde se nacházejí primární smyslové neurony. V těchto oblastech mozku lze nalézt zvýšenou produkci aktivního metabolitu AM404, což může vysvětlit inhibiční účinek APAP vůči COX v CNS (*Bertolini et al., 2006*). Inhibice tvorby oxidu dusnatého (NO) může být také alternativním mechanismem analgetického účinku APAP. L-arginin/NO dráha aktivovaná látkami P a NMDA receptory vede k syntéze NO, což je důležitý neurotransmitter v nociceptivních procesech míchy.

Existuje mnoho způsobů, jak inhibovat degradaci endokanabinoidů, z nichž nejvíce je zkoumána inhibice FAAH. Nicméně v poslední době se zaměřila pozornost na látky, které působí na více cílů. Tyto látky mohou být účinnější díky svému působení na další cíle mimo endokanabinoidní systém, jako jsou TRPV1, PGF₂ receptory a enzymy COX-2. Takový účinek by mohl inhibovat nežádoucí účinky endokanabinoidů, jejich metabolitů nebo sloužit jako další synergický mechanismus (*Toczek, 2018*).

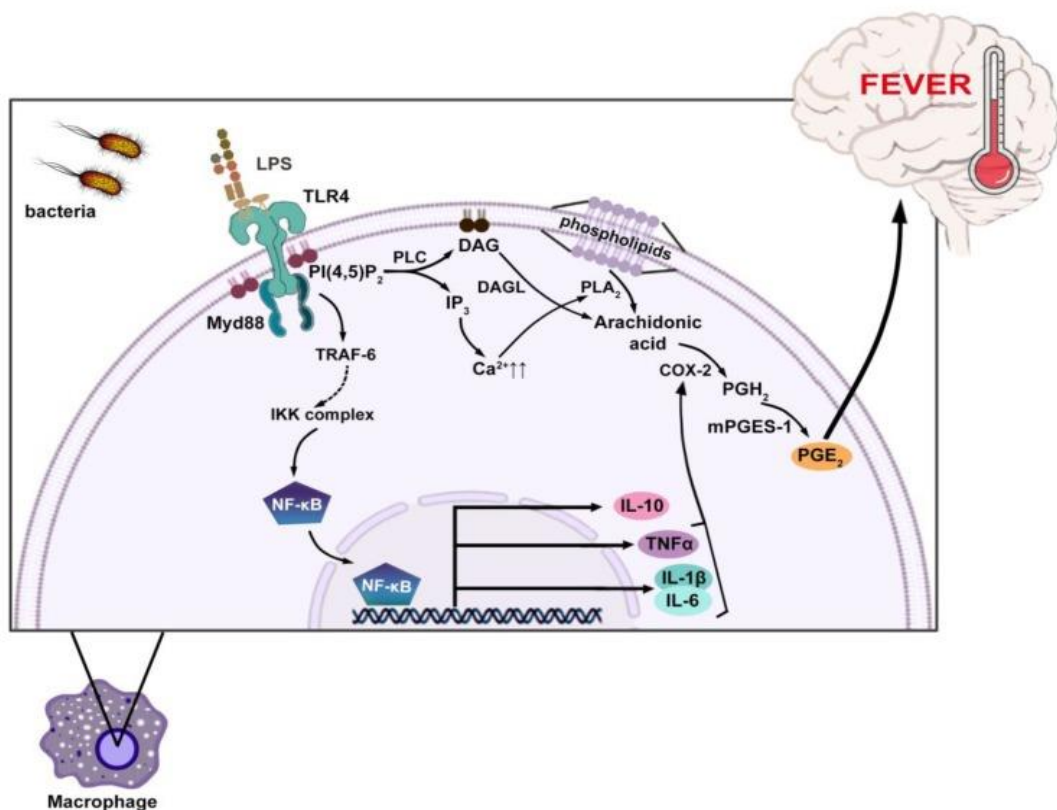
Souhrnně lze říci, že APAP působí na všech místech, kde dochází ke stimulaci bolesti z tkáňových receptorů přes míchu do thalamu a mozkové kůry, ve kterých jsou vyvolávány pocity bolesti. Mechanismus analgetického účinku APAP je složitý. V úvahu se stále berou následující možnosti: ovlivňování jak periferních (inhibice aktivity COX), tak centrálních COX, sestupné serotoninergické dráhy, L-arginin/NO cesta, kanabinoidní systém), antinociceptivních procesů a redoxního mechanismu (*Smith, 2009*).



Obr. 5: Schématické znázornění účinku APAP od perorálního podání až po jeho antinociceptivní aktivitu. **1)** APAP je deacetylován na p-aminofenol v játrech **2)** a poté metabolizován v mozku pomocí FAAH na AM404. **3)** AM404 zesiluje aktivitu supraspinálních CB₁ receptorů, **4)** které zesilují aktivitu serotonergních sestupných drah. **5)** Spinální uvolňování serotoninu (5-HT) stimuluje buď 5-HT_{3/4} receptor při mechanické bolesti, nebo 5-HT_{1A} receptor při chemické bolesti, tak aby došlo k inhibici přenosu bolestivých podnětů směrem k vyšším centrům a v důsledku toho došlo k vyvolání antinocicepce: (FAAH – amidová hydroláza mastné kyseliny, AM404 – N-arachidonoylfenolamin, PAG – periaqueductální šedá hmota, RVM – rostroventrální medulla) (Mallet et al., 2008).

2.3.1.2 Antipyretický účinek

Lipopolysacharid (LPS) uvolňovaný z bakterií je rozpoznáván Toll-like receptorem 4 (TLR4). Poskytuje přenos signálu prostřednictvím kináz rodiny TRAF6 a IKK k indukci exprese genu závislé na NF- κ B, což vede k uvolnění pyrogenního faktoru nekrotizujícího nádory (TNF), interleukinu (IL-1–a IL-6). Aktivace TLR4 také vyvolává hydrolýzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na diacylglycerol (DAG) a inositoltrisfosfát (IP₃) fosfolipázou C (PLC). Diacylglycerollipáza (DAGL) hydrolyzuje diacylglycerol (DAG) přítomný v membráně uvolňující volnou AA. Kromě toho IP₃ stimuluje uvolňování vápníku z endoplazmatického retikula do cytoplazmy, což řídí aktivaci fosfolipázy A₂ (PLA₂) za současného uvolňování AA z membránových fosfolipidů. AA je poté metabolizována enzymy COX-2 na PGH₂. Mikrosomální syntáza prostaglandinu E₂ (mPGES-1) následně převádí PGH₂ na prostaglandin E₂ (PGE₂), hlavní mediátor horečky (Obr. 6) (Wrotek *et al.*, 2020).



Obr. 6: Mechanismus horečky. (TLR4- Toll-like receptor 4, IL-interleukin, DAG- diacylglycerol, IP₃-inositol trifosfát, PLC- fosfolipáza C, mPGES-1-mikrosomální syntáza prostaglandinu E₂, PGE₂- prostaglandin E₂) (Wrotek *et al.*, 2020).

Antipyretika jsou skupina látek snižujících horečku. Jsou rozdělena do dvou kategorií: exogenní antipyretika a endogenní antipyretika. Mezi exogenní antipyretika patří NSAID, APAP a kortikosteroidy. Každé léčivo uplatňuje své účinky v různých bodech ve febrilní odezvě. APAP a NSAID inhibují syntézu prostaglandinů z AA zprostředkovanou COX (Lee, 2018).

Studie *in vitro* na potkaních primárních hipokampálních neuronech a lidských astrocytických buněčných liniích uvádí, že APAP snižuje jadernou translokaci transkripčního faktoru Nf-KB, o kterém je známo, že je nejdůležitějším transkripčním faktorem pro indukci COX-2 v mozku. APAP cílí na enzymovou aktivitu COX-2. Současná zjištění ukazují, že APAP, podobně jako aspirin a jiná NSAID, je antipyretický tím, že inhibuje COX-2 a nejpravděpodobněji působí na produkci PGE₂ indukovanou COX-2, která se vyskytuje v mozkových endoteliálních buňkách po zánětlivé expozici, a nedochází tedy k inhibici mPGES-1 nebo signální kaskády za PGE₂ (Engström *et al.*, 2013).

Ve studii z roku 2018 bylo prokázáno, že antinociceptivní účinek APAP může být zprostředkovaný tvorbou metabolitů APAP, jako je derivát NAPQI, který má za následek aktivaci iontových kanálů přechodného receptorového potenciálu (TRP), TRPV1 a přechodného receptorového potenciálu ankyrinu 1 (TRPA1). Už dříve bylo zjištěno, že APAP podávaný ve vysoké dávce vyvolává podchlazení jak u myši, tak u lidí, a bylo prokázáno, že tento účinek závisí na TRPA1, nikoliv na TRPV1. Studie tedy prokázala, že APAP aktivuje TRPA1 prostřednictvím svého elektrofilního metabolitu NAPQI. Tato aktivace vyvolává podchlazení, když je APAP podáván ve vysokých dávkách, ale může také přispívat k antipyretickému účinku při nižších dávkách (Mirrasekhian *et al.*, 2018).

2.4 Užívání a dávkování paracetamolu

APAP se vyskytuje ve formě tablet, šumivých tablet, suspenze, prášku pro přípravu perorálního tekutého léčiva a rektálních čípků. Při perorálním podání se klinický účinek APAP objeví po 30 minutách. Obsah APAP v perorálních lécích se liší. Nejčastěji se rovná 500 mg, ale existují přípravky (nejčastěji komplexní), které obsahují 325 mg APAP nebo 750 mg (např. Febrisan, Coldrex) nebo dokonce 1 000 mg (např. Efferalgan Forte, Coldrex MaxGrip, Flucontrol Hot). Nejrychlejší účinek APAP, již po 15 minutách,

nastává v případě použití tablet s rychlým uvolňováním obohacených o hydrogenuhličitan sodný, který zvyšuje vyprazdňování žaludku. Díky tomuto procesu APAP rychleji přechází do tenkého střeva, kde podléhá absorpci (např. Panadol Rapid®). Perorální dávky APAP pro dospělé pro léčbu bolesti nebo horečky jsou 650–1000 mg každé 4 hodiny podle potřeby až do doporučené maximální denní dávky 4 g. Pediatrické perorální dávky jsou 10–15 mg/kg každé 4–6 hodiny, maximálně 5 dávek denně. U pacientů se středně závažným selháním ledvin se doporučuje zvýšit interval dávkování každých 6 hodin a každých 8 hodin u pacientů se závažným selháním ledvin. Terapeutické koncentrace se pohybují od 5 do 20 mg/ml. Nástup analgetické aktivity nalačno po perorálním podání je asi půl hodiny, doba trvání analgetického účinku je asi 4 hodiny. Čas do dosažení maximální koncentrace je přibližně 45–60 minut po perorálním podání tablet s pravidelným uvolňováním a mohou se vyskytnout velké rozdíly v koncentracích APAP v plazmě měřených 60 minut po perorálním podání. Kapalný APAP (kapky, sirup) začíná účinkovat asi po 30 minutách (*Moller et al., 2005*).

Při rektálním podání (čípky) je biologická dostupnost APAP nižší, asi dvě třetiny dostupnosti ve srovnání s perorálním podáním. Čas potřebný k dosažení terapeutické koncentrace pro čípky je 120 až 180 minut, což znamená, že k analgetickému účinku dochází po 2 až 3 hodinách od příjmu léčiva. Biologická dostupnost a rychlost absorpce APAP ve formě čípků závisí na mnoha faktorech: dávce léku (u dospělých obvykle 650 mg; u dětí 80–225 mg), velikosti čípku (nižší dávka znamená lepší biologickou dostupnost). Pomalejší absorpce APAP aplikovaného přes konečník (čípky) se liší od jiných analgetických léčiv: např. Diklofenak sodný ve formě čípků v přípravcích Dicloberl (50 mg účinné látky) nebo Dicloratio (25, 50 a 100 mg) dosahuje maximální koncentrace v krvi po 30 minutách od aplikace, v přípravcích: Diclac a Diclofenac GSK (50 nebo 100 mg) nebo Voltaren (25, 50, 100 mg) - po 60 minutách a v Olfenu (50 a 100 mg)-po 2 hodinách (data podle PharmindeX 2012). Tato data ukazují, že rychlost absorpce účinné látky z léčiva podaného přes konečník je ovlivněna formou a složením pomocných látek obsažených v čípcích. Stejně faktory ovlivňují čípky obsahující APAP (*Pasero et al., 2012*).

2.4.1 Intravenózní podání APAP

Intravenózní (*i.v.*) APAP se v mnoha ohledech liší od dostupných *i.v.* opioidů a NSAID. Lék není spojen se zvýšeným výskytem nevolnosti, zvracením a respirační depresí, ke které může dojít u opioidů nebo dysfunkcí destiček, gastritidy a renální toxicity, které jsou někdy spojeny s NSAID. *I.v.* APAP má rychlejší nástup a vede k předvídatelnější farmakokinetice než běžné formulace rektálního APAP. V nedávné studii, ve které byl dospělým dobrovolníkům podán *i.v.*, perorální nebo rektální APAP, byla průměrná IV C_{max} (maximální plazmatická koncentrace léčiva) téměř dvojnásobná než při perorálním podání a téměř čtyřnásobná než při rektálním podání. Skupina *i.v.* vykazovala trvale maximální hodnoty koncentrace v plazmě a v mozku v mozkomíšním moku (CSF) trvale vyšší než po perorálním nebo rektálním podání (*Singla et al., 2011*).

Hlavní výhoda spočívá v tom, že *i.v.* APAP může být podáván před nebo během chirurgického zákroku, což umožňuje zahájení účinné analgetické terapie v časně fázi pooperační doby. *I.v.* APAP se zřejmě vyhýbá první expozici a metabolismu v játrech portální cirkulací, což může snížit riziko poškození jater. Při terapeutickém dávkování (až 4 g denně) je *i.v.* APAP málokdy spojen s hepatotoxicitou a ukázalo se, že je bezpečný pro užívání u některých pacientů s jaterními onemocněními. Nicméně podle předepsaných informací je *i.v.* APAP kontraindikován u pacientů se závažným poškozením a onemocněním jater. Kvůli své účinnosti, bezpečnosti, nedostatku klinicky významných interferencí a nežádoucích účinků spojených s jinými analgetiky je *i.v.* APAP častou součástí multimodálního plánu analgetické léčby (*Groudine, 2011*).

Tab. 1: Dávkování APAP u dětí (*Temple et al., 2013*).

dávka APAP	věk dítěte	hmotnost dítěte
40 mg	< 4 měsíce	2,5–5,4 kg
80 mg	4-11 měsíců	5,5–7,9 kg
120 mg	12-23 měsíců	8–10,9 kg
160 mg	2-3 let	11–15,9 kg
240 mg	4-5 let	16–21,9 kg
320 mg	6-8 let	22–26,9 kg
400 mg	9-10 let	27–31,9 kg
480 mg	11 let	32–43,9 kg

2.5 Toxické účinky paracetamolu

Toxicita APAP má charakteristický vývojový vzorec, který je reprodukovatelný prakticky u všech subjektů. Po předávkování APAP v jednom časovém bodě nenastává okamžitý sedativní účinek a zpočátku se objevuje velmi málo příznaků, po 12 až 24 hodinách může dojít k bolesti břicha a nevolnosti. V následujících 24 hodinách se mohou tyto příznaky zlepšit, ale aspartátaminotransferáza (AST) a alaninaminotransferáza (ALT) a mezinárodní normalizovaný poměr (INR) náhle stoupají na velmi vysoké hodnoty, často nad 10 000 U/l oproti normálním hodnotám do 40 U/l, s $INR \geq 4,0$. Za 72–96 hodin nastává vrchol biochemické elevace spolu s hyperamonemií, somnolencí, stuporem a kómatem doprovázeným laktátovou acidózou, mozkovým edémem, hernií mozkových kmenů a cévním kolapsem (*Tujios et al., 2015*).

Jak už bylo zmíněno APAP je snadno esterifikován na glukuronidy nebo sulfáty pokud není nasycena kapacita esterifikace. V takovém případě dojde sekundární cestě, kdy je APAP pomocí CYP2E1 odbouráván na NAPQI (viz kap. 2.2.3), který je pomocí GSH přeměněn na kyselinu merkapturovou, která je rozpustná ve vodě, neškodná a snadno vylučovaná močí. Jakmile je však GSH vyčerpán, NAPQI se váže přímo na buněčné proteiny prostřednictvím cysteinových zbytků, což narušuje buněčnou integritu, která vede k nekróze hepatocytů a dále může dojít až k akutnímu selhání jater (ALF). Toto poškození pravděpodobně nastane velmi rychle, jakmile je dosaženo vyčerpání GSH, což vede k mimořádným hladinám aminotransferáz, ale také k velmi rychlému poklesu po skončení poškození. Avšak vzhledem k relativně dlouhému poločasu AST i ALT se hladiny enzymů vracejí k normálním hodnotám až po 3–9 dnech, v závislosti na závažnosti poškození (*Remien et al., 2012*).

2.5.1 Hepatotoxicita

Předávkování APAP může vyvolat závažné poškození jater a dokonce i ALF. Ve skutečnosti je předávkování APAP nejčastější příčinou ALF ve většině západních zemí. Po předávkování jsou konjugační reakce fáze II buď nasycené (sulfatace), nebo díky dramatickému zvýšení hladin APAP nemůže glukuronidace držet krok s jeho vysokými hladinami. To vede ke zvýšené tvorbě NAPQI, což způsobuje vyčerpání buněčného GSH a k následnému dramatickému zvýšení aduktů jaterních proteinů (*McGill et al., 2013*). V 70. letech, kdy byla poprvé objevena deplece GSH a tvorba proteinového aduktu v reakci

na předávkování APAP u myši, se předpokládalo, že se jedná o hlavní mechanismus buněčné smrti. V průběhu let však bylo zřejmé, že časná tvorba proteinového aduktu je pouhým počátečním jevem, který vyvolává komplexní signální dráhy buněčné smrti a adaptivní reakce soustředěné kolem mitochondrií (*Jollow, et al., 1973*).

2.5.1.1 Tvorba mitochondriálních proteinových aduktů

I když mitochondriální proteinové adukty po předávkování APAP u myši byly v raných studiích popsány dr. Mitchellem, tak funkční význam nebyl rozpoznán (*Mitchell et al., 1973*). Avšak pozdější studie skupiny dr. Sidney Nelsona porovnávající proteinové adukty a jaterní poškození u myši po léčbě APAP oproti jeho izomeru AMAP (*N*-acetylmeta-aminofenol) naznačují významné rozdíly mezi těmito dvěma sloučeninami. Ačkoli AMAP tvořil reaktivní metabolity a celkové proteinové adukty v játrech podobně jako APAP, AMAP na rozdíl od APAP netvořil adukty v mitochondriích a nezpůsobil poškození jater (*Nelson et al., 1990*). Tato pozorování naznačují, že adukty mitochondriálních proteinů se tvoří při procesu poškození způsobeného APAP. Kromě toho také dochází ke zvýšení oxidačního stresu uvnitř jaterních mitochondrií u zvířat léčených APAP, což je zapříčiněno adukty mitochondriálních proteinů při vytváření mitochondriálního oxidačního stresu během hepatotoxicity způsobené APAP. Kromě toho srovnání mezi léčbou APAP u potkanů a myši ukázalo zpožděnou tvorbu a výrazně méně proteinových aduktů v mitochondriích jater potkana, což může vysvětlit nižší citlivost potkanů na předávkování APAP. Tato pozorování společně podporují hypotézu, že nikoliv celkové hladiny proteinového aduktu v buňce, ale proteinové adukty v mitochondriích jsou nejdůležitějšími iniciačními událostmi v patofyziologii buněčné smrti zapříčiněné APAP (Obr.7) (*Xie et al., 2015*).

2.5.1.2 Mitochondriální oxidační stres

Průvodní objev mitochondriálního oxidačního stresu byl založen na zvýšených hladinách glutathiondisulfidu (GSSG) uvnitř mitochondrie a nepřítomnosti relevantních hladin GSSG v cytosolu, nebo GSSG vylučovaného do žluče. Je známo, že GSSG vytvořený uvnitř mitochondrie lze redukovat pouze na GSH, ale nelze jej exportovat do cytosolu. To svědčí o selektivní tvorbě reaktivního kyslíku v matrici mitochondrií, což

bylo později potvrzeno použitím MitoSOX Red, indikátoru mitochondriálního superoxidu. Kromě toho tvorba peroxynitritu, reakčního produktu superoxidu a oxidu dusnatého byla také lokalizována převážně uvnitř mitochondrií (*Cover et al., 2005*). Přes přesvědčivý důkaz o mitochondriálním oxidačním stresu a tvorbě peroxynitritu během hepatotoxicity APAP se zdálo, že oxidační a nitrosativní stres byl pozdním jevem, který úzce koreloval s poškozením buněk a nikoliv s časnou tvorbou aduktu mitochondriálního proteinu. Důkaz o časném oxidačním stresu se objevil poté, co bylo zjištěno, že c-jun *N*-terminální kináza (JNK) se účastní poškození jater indukovaného APAP. JNK inhibitor SP600125 takto zabraňoval oxidačnímu stresu vyvolaného APAP. Zdá se, že prostředníkem u této aktivace JNK je redox-senzitivní kináza 1 regulující signál apoptózy (ASK1) a člen rodiny MAP-kinázových kináz (MAP3K), který se vyskytuje v cytosolu v komplexu s thioredoxinem a může být uvolněn a aktivován oxidací thioredoxinu (*Saito et al., 2010*). Bylo prokázáno, že nedostatek ASK-1 a inhibitorů ASK-1 zeslabuje aktivaci JNK a snižuje poškození jater vyvolané APAP. Další redox-senzitivní MAP3K zapojená do tohoto procesu zahrnuje smíšenou kinázu 3 (MLK3) a glykogen syntázu kinázu-3 beta (GSK-3b), které inhibují aktivaci JNK a snižují buněčné poškození. Tyto kinázy přímo neinteragují s JNK, ale působí prostřednictvím MAP-kinázové kinázy 4 (MKK4), která poté fosforyluje JNK. Aktivace JNK je potlačena mitogenem aktivovanou proteinovou kinázovou fosfatázou (Mkp)-1, která inhibuje APAP indukované poškození jater. Společně tyto poznatky naznačují, že mitochondriální proteinový adukt zapříčiňuje mírný počáteční oxidační stres, který není snadno detekován ani citlivými markery oxidačního stresu, aktivuje redox-citlivé MAP3 kinázy a spouští kinázovou kaskádu vedoucí k rozsáhlé aktivaci JNK (*Jaeschke et al., 2019*).

2.5.1.3 Mitochondriální JNK translokace

Bylo zjištěno, že aktivovaná JNK (pJNK) se translokuje z cytosolu na mitochondrie a váže se na kotevní protein Sab na vnější mitochondriální straně. Mitochondriální translokace JNK je zodpovědná za oxidační či nitrosativní stres a prodlouženou aktivaci JNK. Mechanismus, kterým vazba P-JNK a fosforylace Sab zvyšuje tvorbu superoxidu, zahrnuje uvolňování SHP1 (protein tyrosinfosfatázy, nереceptorového typu 6, PTPN6) ze Sab na vnitřní straně mitochondriální vnější membrány. To spouští jeho aktivaci a přenos P-SHP1 na vnitřní membránu, kde

defosforyluje P-Src (aktivní). Tento proces vyžaduje ukotvení proteinu 4 (DOK4) na vnitřní membráně. Src (neaktivní) dále inhibuje transportní řetězec elektronů (ETC) a podporuje uvolňování superoxidu, což vede k zesílenému oxidačnímu stresu, který je zodpovědný za další aktivaci JNK a následnou buněčnou smrt (Win et al., 2016). Naproti tomu superoxid odvozený od ETC reaguje s oxidem dusnatým za vzniku silně oxidačního peroxynitritu, který byl určen jako oxidant odpovědný za poškození. Kromě oxidačního stresu také dochází k uvolňování železa pocházejícího z lysosomů do mitochondrií prostřednictvím mitochondriálního elektrogenního $\text{Ca}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ uniportu během buněčné smrti indukované APAP. Dohromady tedy existuje rozsáhlý důkaz o zásadní úloze mitochondriálního oxidačního stresu, který je zodpovědný za mitochondriální dysfunkci vedoucí k otevření póru MPT, porušení membránového potenciálu a zastavení syntézy ATP. Tyto události také vedou k otoku mitochondriální matrix s prasknutím vnější membrány, uvolnění intermembránových proteinů a nukleární translokaci endonukleázy G a faktoru vyvolávajícímu apoptózu (AIF), které způsobují fragmentaci jaderné DNA (Obr. 7) (Jaeschke et al., 2018).

2.5.2 Terapie při APAP hepatotoxicitě

2.5.2.1 4-methylpyrazol

Na základě předchozích studií byly zahájeny předklinické studie hodnotící potenciální mechanismus terapie pomocí 4-methylpyrazolu (4MP). Když byly myši léčeny jednou dávkou 50 mg/kg 4MP (dávka pro člověka ekvivalentem: 4,1 mg/kg), což je méně než klinicky schválená dávka u lidí (10–15 mg/kg) každých 12 hodin, ve stejný čas došlo k zabránění toxicity APAP, aktivaci JNK, mitochondriální dysfunkci a současně bylo zabráněno nekróze jaterních buněk. Kromě toho byla eliminována deplece GSH a tvorba reaktivního metabolitu a proteinových aduktů. To naznačuje, že 4MP působil jako inhibitor CYP, který byl potvrzen u člověka jako jeden z faktorů hepatotoxicity. Přestože nebyl pozorován žádný účinek na tvorbu proteinových aduktů, byla eliminována aktivace a mitochondriální translokace JNK, mitochondriální dysfunkce a fragmentace jaderné DNA. Molekulární studie zjistily, že se 4MP váže na ATP do vazebného místa JNK a je tedy kompetitivním inhibitorem (Akakpo et al., 2018).

Výsledky preklinických studií byly potvrzeny u zdravých dobrovolníků, kteří užívali 80 mg/kg APAP s nebo bez 4MP terapie. 4MP byl podáván intravenózní dávkou

5 mg/kg v době podání APAP a 10 mg/kg o 12 hodin později. Nedošlo k žádné významné změně glukuronidace a sulfatace, ale došlo k více než 90% snížení oxidačních metabolitů svědčících o účinné inhibici tvorby NAPQI u těchto dobrovolníků. 4MP je stejně účinný nebo mírně lepší než NAC, protože prevence tvorby NAPQI je účinnější než zachycování NAPQI, a prevence mitochondriálního oxidačního stresu je účinnější než zachycování peroxynitritu s nově syntetizovaným GSH. Kromě toho je 4MP obecně dobře tolerován a nemá žádné relevantní vedlejší účinky (*Kang et al., 2019*).

2.5.2.2 Calmangafodipir

Mechanistické studie prokázaly tvorbu superoxidu a peroxynitritu uvnitř mitochondrií během hepatotoxicity. Zhoršování APAP indukovaného poškození jater u zvířat s deficitem superoxiddismutázy manganu (MnSOD) a vysoce účinná terapie pomocí mimetika Mito-Tempo zaměřeného na superoxiddismutázu v mitochondriích poskytla důkazy o funkční důležitosti tohoto oxidačního a nitrosativního stresu v patofyziologii. Tyto studie na zvířatech poskytly základ pro terapeutické použití mimetika SOD uvnitř mitochondrií (*Ramachandran et al., 2011*).

Nedávno bylo zjištěno, že mangafodipir (MnDPDP), který se používá jako kontrastní látka pro zobrazování magnetickou rezonancí u pacientů, má schopnost aktivity SOD. Aktivita SOD však vyžaduje, aby Mn^{2+} zůstal vázán na DPDP. Proto byla vyvinuta modifikovaná sloučenina, calmangafodipir (CMFP) [$Ca_4Mn(DPDP)_5$], kde Mn^{2+} je stabilněji vázán na molekulu (*Karlsson et al., 2015*). CMFP byl nedávno testován u pacientů, kteří prodělali předávkování APAP. Výsledky ukázaly, že léčivo bylo dobře tolerováno s omezenými vedlejšími účinky. Vedlejší účinky mangafodipiru a potenciálně CMFP mohou zahrnovat průjem a kardiovaskulární nežádoucí účinky podobné předávkování nitroglyceriny v důsledku mimetické aktivity SOD, což může zvýšit hladiny oxidu dusnatého. U pacientů léčených CMFP však nebyly pozorovány žádné průjmy ani kardiovaskulární účinky. Vyhodnocení citlivých biomarkerů poškozených buněk, jako je cytokeratin-18 a miR-122, však vykazovalo menší nárůst, který byl snížen u pacientů, kteří byli léčeni CMFP. S výhradou velmi omezeného počtu pacientů tyto slibné výsledky naznačují, že CMFP by mohl mít prospěšné účinky u pacientů s vyšším předávkováním a pozdějším podáním (*Morrison et al., 2019*).

2.5.2.3 Metformin

Metformin (MTFN) je široce používaný lék k léčbě diabetu typu II. Metformin snižuje hladinu glukózy v krvi zvýšením citlivosti svalových buněk na inzulín, což vede ke zvýšenému vychytávání glukózy. Dávky pro dospělé jsou 500 mg (7 mg/kg) dvakrát denně. Několik studií na myších uvádí příznivé účinky MTFN při terapii oproti hepatotoxicitě APAP. Kim a kol. ukázali, že jak 30minutová perorální předběžná terapie, tak podání 350 mg/kg MTFN po 60 minutách (lidská ekvivalentní dávka: 28,5 mg/kg) zmírnila poškození jater vyvolané APAP inhibicí signalizace JNK (Kim *et al.*, 2015). Nespecifická ochrana JNK MTFN byla potvrzena v buňkách HepaRG, které na rozdíl od primárních lidských hepatocytů nevyžadují aktivaci JNK pro vznik toxicity způsobené APAP. Nicméně po 2 hodinách od podání MTFN došlo k inhibici mitochondriálního oxidačního stresu prostřednictvím inhibice komplexu I (Ramachandran *et al.*, 2016). V modelu chronického předávkování APAP byla potvrzena terapie zprostředkovaná MTFN se sníženým oxidačním stresem. Existuje tedy shoda v tom, že vysoké dávky klinicky používaného léku MTFN chrání před toxicitou APAP u myši, kde se MTFN používal jako předběžná léčba s příznivými vedlejšími účinky (Saravi *et al.*, 2016) (Obr. 7). Velkým problémem je však vysoká dávka MTFN používaného u zvířat. Dávka použitá u zvířat (28 mg/kg) je čtyřikrát vyšší než terapeutické dávka u lidí (7 mg/kg). Vzhledem k některým významným účinkům terapeutických dávek MTFN u lidí je třeba zkoumat, zda by MTFN mohl být účinný proti toxicitě APAP u pacientů v dávkách, které jsou nižší, než bylo zapotřebí u zvířat (Jaeschke *et al.*, 2020).

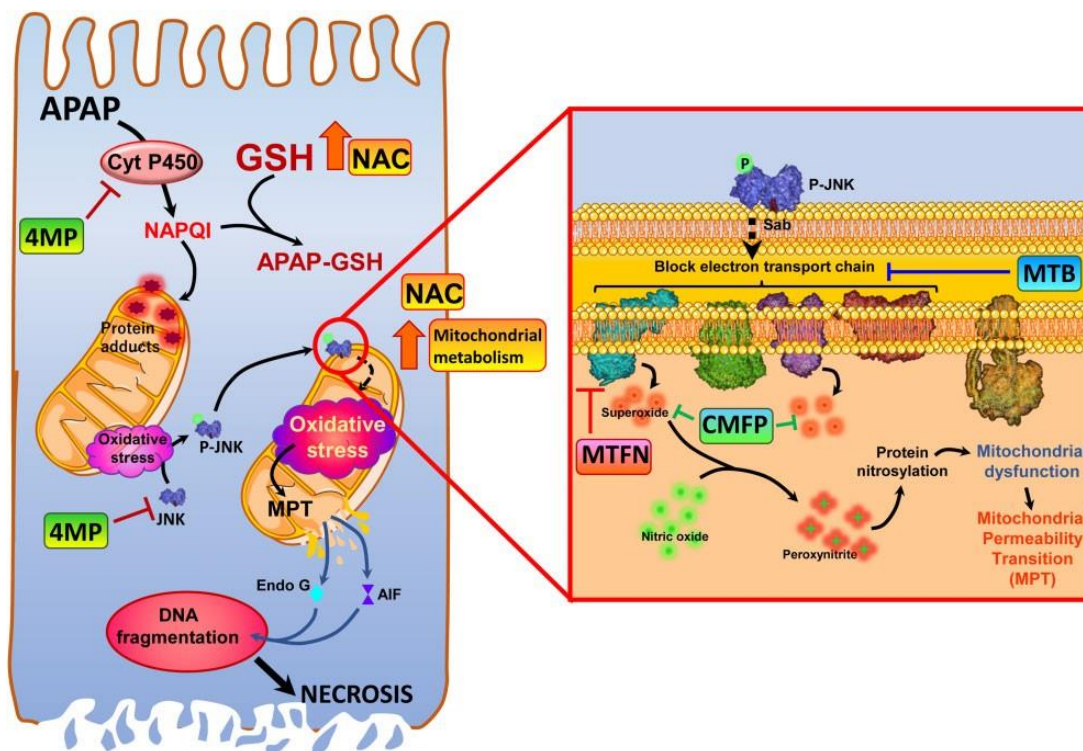
2.5.2.4 Methylenová modř

Bylo zjištěno, že redoxně aktivní látky s mírně redoxním potenciálem mohou přenášet elektrony mezi různými redoxními centry v buňce. Methylenová modř (methylthioniniumchlorid) (MTB), která se klinicky používá k léčbě methemoglobinémie, je mírně redoxně aktivní lék, který může snadno přijímat a darovat elektrony. Jako takový může zlepšit mitochondriální funkci tím, že přijímá elektrony v místě blokády na transportním elektronovém řetězci a dopravuje tyto elektrony směrem od místa blokády. To také zabraňuje úniku elektronů a výsledné tvorbě reaktivních druhů kyslíku (ROS) (Atamna *et al.*, 2012). Dále byla MTB zkoumaná jako možná ochrana při

APAP toxicitě. V izolovaných hepatocytech *in vitro* bylo prokázáno, že MTB může přijímat elektrony z inhibovaného komplexu II elektronového transportního řetězce modifikovaného NAPQI a přenést je do cytochromu c, což zabraňuje mitochondriální dysfunkci, otevření MPTP a následné nekróze buněk (Obr.7) (Lee *et al.*, 2012). Kvůli redox-cyklické povaze reakce mohou být koncentrace MTB v buněčné kultuře (3 mM) a dávky *in vivo* (10 mg/kg) (dávka ekvivalentní člověku: 0,81 mg/kg) poměrně nízké. Vzhledem k riziku závažných vedlejších účinků (MTB působí jako oksylichovadlo a způsobuje methemoglobinemii v dávkách >7 mg/kg) je bezpečná dávka pro člověka 1–2 mg/kg. (Jaeschke *et al.*, 2020).

2.5.2.5 Nrf2 aktivátory

Aktivace transkripčního faktoru Nrf2 je vysoce účinná strategie, protože geny závislé na Nrf2 mohou příznivě ovlivnit terapii při intoxikaci APAP. Jedním z nejdůležitějších genů týkajících se toxicity APAP jsou enzymy syntetizující GSH včetně katalytické podjednotky glutamát-cysteinové ligázy a podjednotky modifikátoru glutamát-cysteinové ligázy, které jsou odpovědné za udržování hladin GSH v játrech, aby zachytily NAPQI a ROS. Kromě toho Nrf2 reguluje geny pro (NAD(P)H:ubichinon oxidoreduktázu 1, Nqo1) a konjugační reakce (UDP-glukuronosyltransferázy a glutathion-S-transferázy), které mohou buď omezit tvorbu NAPQI, nebo urychlit detoxikaci NAPQI (Klasseen, 2010). Ukázalo se tedy, že aktivátory Nrf2 chrání před APAP toxicitou (Kang *et al.*, 2019).



Obr. 7: Účinky APAP při hepatotoxicitě a možnosti terapie. (JNK- *c-Jun-N* terminální kináza, 4MP-4-methylpyrazol, MTFN-metformin, MTB-methylenová modř, CMFP–calmangafodipir) (Jaeschke et al., 2020).

2.6 Kazuistiky popisující příčiny předávkování pomocí APAP

2.6.1 Úmyslné předávkování pomocí APAP v těhotenství

Sebevražedné myšlenky, příznaky deprese a jiná psychická onemocnění se vyskytují přibližně u 13–33 % těhotných žen. Mezi příčiny, proč dochází k sebevražedným sklonům v těhotenství, se řadí věk okolo 20-30 let, svobodný stav, užívání návykových látek, expozice partnerskému násilí, omezená sociální podpora a neplánované těhotenství. Úmyslné předávkování je tedy běžnou metodou při pokusu o spáchání sebevraždy. Úmyslné předávkování v těhotenství představuje mnoho rizik, které mají za důsledek výskyt fyziologických změn u matky, přenos léků placentou a změnu metabolismu plodu (Werler et al., 2005).

2.6.1.1 Předávkování těhotné ženy po požití 30 g APAP

Žena byla hospitalizovaná po 3 dnech od úmyslného předávkování pomocí 30 g APAP. Zpočátku byla asymptomatická a bylo zjištěno, že má zvýšené hladiny ALT při 785 IU/l a AST při 630 IU/l a detekovatelnou hladinu APAP 14 mg/dl a INR 1,7, což odpovídá zpožděné toxicitě APAP. Byl jí podán NAC a byla převezena do terciárního centra. Po příjezdu se u ní objevily kontrakce a docházelo opakovaně ke zpomalení srdeční činnosti. Hodnota INR byla opakovaně 3,0 což svědčilo o zhoršující se koagulopatii, proto byl podáván vitamin K, čerstvá zmražená plazma a byl jí pokusně podán terbutalin a nikardipin. Ačkoli byl plod v životaschopném gestačním stádiu, riziko možného krvácení matky vedlo k doporučení nevykonávat císařský řez. Následně žena porodila mrtvé dítě, téměř 72 hodin po předávkování APAP. Po porodu se žena stala více acidoemickou, vyvinulo se u ní fulminantní jaterní selhání s maximální hodnotou AST 6693 IU/l a ALT 5566 IU/l, dále došlo k akutnímu poškození ledvin, srdečnímu selhání a k akutnímu poranění plic, které si vyžádalo připojení na plicní ventilaci. Bylo pokračováno v terapii s NAC, dokud nebylo pozorováno dostatečné zlepšení jaterních funkcí. Žena byla poté propuštěna do ústavní psychiatrické péče 14. den po úplném obnovení orgánových funkcí (*Shenai et al., 2018*).

Fatální předávkování a následný důsledek na plod byl v tomto případě pravděpodobně multifaktoriální, v kombinaci fetální toxicity s poškozením jater a placentární nedostatečnosti. Fetální zánik plodu byl v několika případech zaznamenán při požití 29,5 – 35g APAP. Díky své široké dostupnosti APAP představuje 81 % všech úmyslných sebevražedných předávkování v běžné populaci a 20 % v době těhotenství. U matky je toxicita v těhotenství podobná toxicitě jako u negavidních pacientů a zahrnuje hepatotoxicitu, metabolickou acidózu, renální dysfunkci, encefalopatii a koagulopatii. Po neúmyslné subakutní toxicitě v důsledku APAP byla v některých případech hlášena transplantace jater ve druhém trimestru těhotenství, nevedlo to však k záchraně těhotenství.

O APAP je známo, že prochází placentou a jeho hladiny v krevním oběhu mají tendenci se přibližovat koncentracím v mateřském oběhu. NAPQI se vytváří v játrech plodu s nižší rychlostí než u dospělých v důsledku nedostatečného vyvinutí CYP. NAC je nejčastěji používaným antidotem při předávkování v těhotenství, jelikož se jeho užívání zdá být bezpečné (*Zelner et al., 2015*).

2.6.2 Opakované podání terapeutických dávek APAP u dětí

APAP je celosvětově hlavní příčinou ALF a to buď po úmyslném předávkování, nebo neúmyslném požití. Počet úmrtí v Severní Americe a Evropě nevykazuje žádné známky poklesu, navzdory určitým snahám o omezení velikosti balení léků obsahující APAP ve Velké Británii a dostupnosti antidota. U dětí bylo hlášeno několik případů ALF vyvolaných APAP s mírně vyššími terapeutickými dávkami (*Bunchorntavakul, 2018*).

2.6.2.1 Fatální otrava po opakovaném podání terapeutických dávek

V této studii je popsáno ALF po opakovaném podání čtyř terapeutických dávek APAP ve 4 hodinových intervalech u dříve zdravé devítileté dívky. Biopsie jater ukázala typickou nekrózu vyvolanou APAP a mikrovezikulární steatózu v periportálních hepatocytech. Tento případ zdůrazňuje, že vzhledem k tomu, že stav jater u pacientů není většinou znám, je třeba respektovat a dodržovat četnost podávání léku a mělo by být podporováno používání farmaceutických forem, které umožňují upravit dávku tak, aby odpovídala hmotnosti dítěte.

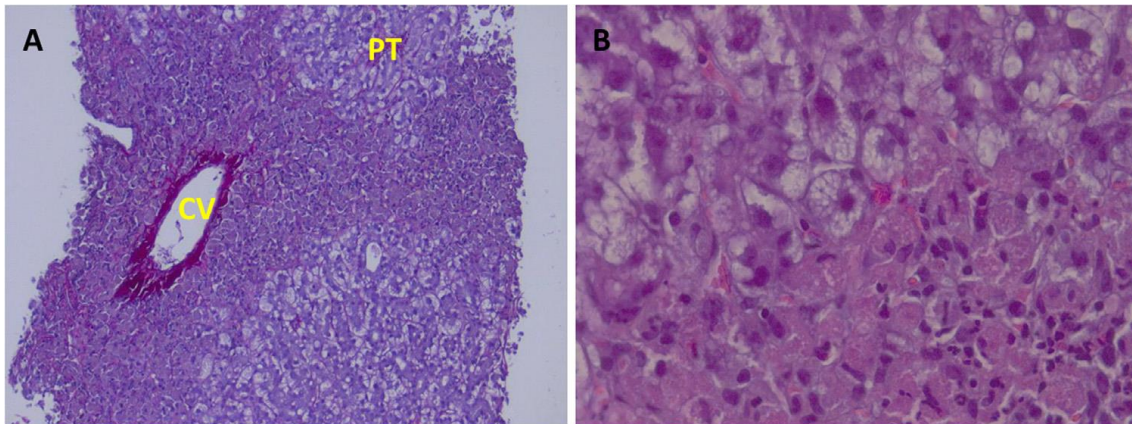
Devítiletá dívka s anamnézou (hmotnost 30 kg; výška: 1,35 m; index tělesné hmotnosti 16,5 kg/m²). Ucítla bolest zubů při sportovním úrazu v místě obličeje. Matka jí podala tabletu APAP ve 4 dávkách po 500 mg s intervalem 4 hodin mezi každou dávkou. Ve večerních hodinách dívka v důsledku bolesti v oblasti břicha začala zvracet a 48 hodin po užití APAP zvracení neustávalo, došlo dále k bolesti hlavy a pocitu dezorientace. Klinické vyšetření na dětském pohotovostním oddělení ukázalo na sníženou bdělost. Laboratorní testy prokázaly hepatocelulární nedostatečnost (protrombinový poměr: 12 % ; faktor V: 12 % cytolýza, AST: 11 500 IU/l; ALT: 16 200 IU/l, laktát: 5 mmol/l, renální nedostatečnost 18 mmol/l; kreatinin: 120 mmol/l). Koncentrace APAP v krvi byla 8,9 mg/ml. Ošetření intravenózním NAC 3 g/ 24 h bylo zahájeno podle obvyklých postupů a dívka byla následně přijata na jednotku dětské intenzivní péče. Intrakraniální hypertenze byla léčena bolusy thiopentalem sodíku, mannitolu a mírnou hyperventilací. Kraniální CT sken prokázal difúzní mozkový edém se zapojením mozečku bez jakékoli hemoragické léze. Laboratorní výsledky jasně prokázaly poměr protrombinu pro těžkou hepatocelulární nedostatečnost: (11 % 12 h po přijetí do pediatrického pohotovostního oddělení, poté <10 % o 3 h později, což odůvodňuje infúzi fibrinogenu; v době smrti protrombinový poměr: 21 %) a také funkční renální

nedostatečnost se zachováním diurézy. Hemodynamické selhání vyžadovalo infuzi fyziologického roztoku a noradrenalinu poté, co se vyvinula srdeční nedostatečnost (ejekční frakce <20%).

V případě terminálního selhání jater s hepatorenálním syndromem byla zahájena hemodiafiltrace s velkým objemem (60 ml/kg). Po zjištění tohoto selhání jater byla provedena jaterní biopsie. Přes počáteční regresi mydriázy se neurologický obraz vyvinul do fáze, kdy došlo k odumření mozku. Na žádost soudce byla provedena pitva. Další vyšetřování nezjistilo žádné markery, které by prokazovaly infekci (hepatitida A, B, C, E; HIV; EBV; HSV; VZV) nebo autoimunitní hepatitidu (negativní výsledky na anti-mitochondriální protilátky, anti-LKM1 protilátky, anti-LC1 protilátky a protilátky proti parietálním buňkám). Testování na amanitin v moči bylo negativní. Koncentrace mědi v ceruloplasminu, moči a plazmě a nepřítomnost usazenin mědi v játrech při biopsii umožnilo vyloučení Wilsonovy choroby.

Biopsie jater vykazovala dva rysy. První rysem byla nekróza v centrální a mediolobulární zóně, která postihla 60 % hepatocytů (Obr. 8A). Tento znak byl typický pro nekrózu vyvolanou APAP. Druhým rysem byla mikrovezikulární steatóza v periportálních hepatocytech (Obr. 8B). Nebyla zjištěna žádná fibróza nebo zánět. Vyšetření renálního parenchymálního vzorku získaného během pitvy ukázalo několik oblastí eozinofilní nekrózy, přibližně 70 % tubulů s úplným vymizením jader. Neuropatologické vyšetření ukázalo multifokální subdurální a subarachnoidální krvácení s intersticiálním edémem a masivní ztrátu neuronů.

Nebyly tedy zjištěny žádné známky infekce. Diagnóza hepatitidy v důsledku intoxikace APAP byla určena na základě klinického obrazu fulminantní hepatitidy a tubulární nekrózy, encefalopatie, nekrózy hepatocytů s eozinofilními a apoptotickými aspekty. Důkladné policejní vyšetřování potvrdilo, že čtyři tablety APAP 500 mg byly skutečně podány ve 4 hodinových intervalech a že nebylo použito žádné jiné ošetření (*Bouvet et al., 2020*).



Obr. 8: *Histologické znaky v jaterní biopsii A: Hepatocytární nekróza kolem centrální žíly (CV) a steatóza v periportálních hepatocytech (PT) (Siriusovo červené barvení, X 100) B: Mikrovezikulární steatóza v horní části a nekróza v dolní části (HES barvení, X 400)(Bouvet et al., 2020).*

Ačkoli je tento lék obvykle považován za bezpečný, existuje stále více důkazů, že aktuální maximální doporučená dávka APAP může indukovat hepatickou cytolýzu u velkého počtu zdravých osob. Při nepřítomnosti komorbidit je předepsán APAP v dávkách 15 mg/kg každých 6 hodin (60 mg/kg denně) pro děti o hmotnosti vyšší než 10 kg a 7,5 mg/kg každých 6 hodin (30 mg/kg denně) pro děti vážící méně než 10 kg. Dávka 150 mg/kg za den je jako jediná dávka obecně akceptována jako prahová hodnota toxicity (Heard et al., 2014). V tomto případě výsledky studie umožnily dospět k závěru, že smrt byla způsobena otravou APAP.

2.7 Klinické studie – vztah APAP a neurologických změn

2.7.1 Vztah mezi užíváním APAP a vznikem ADHD u potomků

Odhaduje se, že 50 až 70 % žen používá analgetika a antipyretika během těhotenství s obsahem APAP (např. Tylenol). Ačkoli APAP prochází placentou, podle amerického úřadu pro správu potravin a léčiv mu byl přidělen status „Kategorie těhotenství B“ (léky, které jsou otestované na zvířatech bez zjištěné teratogenity) a je považován za bezpečný pro použití ve všech stádiích těhotenství. V posledních letech však bylo použití APAP v těhotenství spojeno se zvýšeným rizikem vzniku astmatu, vrozených malformací a neurologických poruch u potomků. Porucha hyperaktivity s deficitem pozornosti (ADHD) je nejčastější neurobehaviorální poruchou v dětství. Etiologie ADHD není zcela známa. Je to multifaktoriální syndrom se silnou genetickou

vazbou. Mezi další rizikové faktory ADHD patří věk matek, socioekonomický status matky, migréna u matek a znečištění ovzduší (*Peterson et al., 2015*). Nedávné metaanalýzy zabývající se užitím APAP v těhotenství byly spojovány se zvýšeným rizikem vzniku ADHD u potomků (relativní riziko [RR] 1,34, 95% interval spolehlivosti [CI]) (*Masarwa et al., 2018*).

Metaanalýza zahrnovala šest kohortových studií, kdy byl APAP kdykoliv užíván během těhotenství. Navzdory pozorované asociaci a její shodou s předchozími zprávami o této zamýšlené asociaci bylo potřeba lépe porozumět potenciální úloze zaujatosti v této pozorované asociaci vzhledem k multi-etilogické povaze ADHD a mnoha rizikovým faktorům spojenými s ADHD (*Grimes, 2002*). Bylo tedy zapotřebí identifikovat faktory, které mohou ovlivnit souvislost mezi použitím APAP během těhotenství a rizikem vzniku ADHD (*Lash et al., 2014*).

Byly prozkoumány možné nepřesnosti v dříve nahlášených studiích mezi použitím APAP během těhotenství a rizikem vzniku ADHD u potomstva. Aby toho bylo dosaženo, byla aktualizována dříve publikovaná metaanalýza a byla provedena analýza citlivosti pro neměřené nepřesnosti pro metaanalytický odhad. (*Masarwa et al., 2020*). Rodičovská ADHD (genetická vazba) (*Faraone et al., 2005*), mateřská horečka (*Brucato et al., 2017*), migréna u matek (*Fasmer et al., 2010*), kouření a konzumace alkoholu u matek (*Mick et al., 2002*) a látky znečišťující ovzduší jsou rizikovými faktory ADHD (*Peterson et al., 2015*), které byly v analýze zkreslení považovány za potenciální nepřesnosti.

Vyhledávání literatury přineslo 57 nových citací. Odstranění duplikátů, přehledových titulů a abstraktů vedlo k vyloučení 50 citací. V důsledku toho bylo do aktualizované metaanalýzy zařazeno sedm studií. Charakteristiky těchto studií jsou uvedeny v (Tab. 2) (*Masarwa et al., 2020*).

Tab. 2: Spojení mezi nepřesnostmi a prevalencí ADHD pro analýzu zkreslení, (CI–interval spolehlivosti, p_1 -nepřesnost prevalence u exponovaných, p_0 -nepřesnost prevalence u neexponovaných) (Masarwa et al., 2020).

Potenciálně naměřené nepřesnosti	Velikost efektu (95% CI)	Prevalence záměny	citace
Rodičovské ADHD	OR 1.68 (1.17, 2.41)	$p_1 = 0.5, p_0 = 0.2$	(Li et al., 2006)
Mateřská teplota	OR 2.50 (1.20, 5.20)	$p_1 = 0.75, p_0 = 0.25$	(Zerbo et al., 2013)
Kouření	OR 2.1 (1.10, 4.10)	$p_1 = 0.10, p_0 = 0.05$	(Mick et al., 2002)
Konzumace alkoholu	OR 2.5 (1.10, 5.50)	$p_1 = 0.08, p_0 = 0.06$	(Mick et al., 2002)
Předčasnost	OR 3.04 (2.19, 4.21)	$p_1 = 0.25, p_0 = 0.1$	(Franz et al., 2018)
Mateřská migréna	OR 1.81 (1.53, 2.12)	$p_1 = 0.3, p_0 = 0.14$	(Hansen et al., 2018)
Látky znečišťující vzduch	RR 5.06 (1.43, 17.93)	$p_1 = 0.6, p_0 = 0.4$	(Perera et al., 2018)

Cílem této studie bylo prozkoumat roli dříve hlášených potenciálních neměřených nepřesností a jejich vliv na vznik ADHD u potomků a dále zkoumat roli spojení mezi užíváním APAP během těhotenství a též možnost následného vzniku ADHD u potomků. Předchozí zprávy naznačovaly přítomnost zkreslení ve spojení mezi užíváním APAP a následného vzniku ADHD, bylo dokázáno kvantifikovat dopad tohoto zkreslení a určit jeho původ.

Výsledky analýzy zkreslení zdůrazňují dva hlavní body. První je, že jsou nutné další studie k potvrzení dosavadních zjištění, které navrhují, že bude třeba pečlivě prozkoumat současné pokyny pro léčbu bolesti a horečky během těhotenství. Druhým je to, že analýza zkreslení může být praktickým a produktivním nástrojem ve farmakoepidemiologii, zejména v situacích, kdy etiologie a rizikové faktory nejsou zcela známy, nebo pokud není stanoven biologický mechanismus pro pozorovanou asociaci.

Pozorovaná souvislost mezi užíváním APAP během těhotenství a zvýšeným rizikem vzniku ADHD u potomků je pravděpodobně výsledkem zkreslení (Masarwa et al., 2020).

2.7.2 Užívání APAP a riziko možného vzniku poruchy autistického spektra u mužů

Porucha autistického spektra (ASD) je charakterizována výraznými poruchami verbální a neverbální komunikace v kombinaci s restriktivními, opakujícími se vzorci chování. Jedná se o neurodevelopmentální poruchu s deficitem v sociální komunikaci. Dvě samostatné retrospektivní studie zjistily, že postnatální užívání APAP je spojeno se zvýšeným rizikem vzniku ASD (*Bittker, 2018*), (*Schultz, 2008*). Další epidemiologické důkazy ukazují na možnou roli užívání APAP při vyvolání některých případů ASD. Například Becker a Schultz poznamenali, že případ, kdy byl lék Tylenol, který obsahuje APAP, záměrně kontaminován kyanidem, což vedlo v roce 1982 k jeho stažení z prodeje, tak v důsledku toho v rozmezí let 1982-1986 došlo též k poklesu výskytu ASD v Kalifornii (*Becker, 2010*). Dánské studie zjistily, že obřízka prováděná u chlapců v kojeneckém věku může být též spojena s výskytem ASD, protože často byl chlapcům kvůli zmírnění bolesti při tomto zákroku podáván lék s obsahem APAP (*Frisch, 2015*). U potkanů, kterým bylo na počátku života podáváno velké množství APAP došlo k degradaci neurotransmíse, poruše motorické funkce a prostorové paměti a dále k poruše sociálního chování v pozdějším životě. Všechny tyto projevy a vlastnosti se zdají být v blízké souvislosti s lidmi, kteří trpí ASD (*Blecharz et al., 2018*).

Biochemické studie naznačují, že děti s ASD metabolizují APAP méně než děti bez ASD. Konkrétně u dětí s ASD jsou hladiny volného sulfátu, sníženého GSH, cysteinu a S-adenosylmetioninu v plazmě výrazně nižší než u dětí bez ASD. Genetické studie podpořily toto zjištění (*Melnyk et al., 2012*). Dvě varianty genu SLC13A1, který reguluje transport síranu, se v případech ASD vyskytují běžně a u myši bylo zjištěno, že tyto stejné varianty snižují účinnost metabolismu APAP, čímž dochází k větší náchylnosti vzniku toxicity v důsledku APAP (*Hagiya et al., 2015*).

Tyto biochemické a genetické studie naznačují, že děti s ASD mají větší náchylnost k toxicitě APAP než děti bez ASD. Zatímco toxicita APAP je vnímána spíše jako jaterní než neurologická, experimenty na potkanech zjistily, že APAP je toxický pro neurony v koncentracích nižších než jsou koncentrace potřebné k vyvolání ALF. To tedy naznačuje, že osoby trpící ASD mají větší riziko poškození neuronů při užívání APAP. Je tedy možné, že poškození neuronů může zvýšit riziko vzniku ASD u osob, u kterých ještě prokázáno nebylo, nebo zhoršit patologii ASD u těch, kteří již postiženi jsou (*Posadas et al., 2010*).

Postnatální užívání APAP je tedy rizikovým faktorem při vzniku ASD. Jeho další užívání v kojeneckém a ranném věku by mohlo být ospravedlněno, pokud by příspěvek postnatálního užívání APAP byl k celkovému riziku vzniku ASD extrémně nízký. Určitá kvantifikace možného rizika ASD v populaci jako celku spojená s postnatálním užíváním APAP má tedy velký význam (*Bittker, 2020*).

Tato studie byla zahájena s cílem pokusit se kvantifikovat toto potenciální riziko. Studie rizikových faktorů onemocnění často používají jako měřítka míry pravděpodobnosti (OR). Velikost OR je však funkcí jednotek, ve kterých se měří a OR nezohledňuje výskyt expozice v populaci. Samotný OR tedy nebude poskytovat užitečný odhad souhrnného rizika onemocnění způsobeného konkrétním faktorem v celé populaci. Alternativní řešení je zlomek připisatelný populaci (PAF). Představuje podíl celkového rizika onemocnění v populaci, která je spojena s konkrétním faktorem (*Pepe et al., 2004*). I když jsou do této studie zahrnuty výpočty OR, odhad PAF spojený s postnatálním užíváním APAP je pro ni zásadní.

Základní údaje pro tuto studii byly získány z internetového průzkumu od rodičů žijících v USA, který byl proveden na jaře 2017. První soubor se skládal z dětí ve věku 3-12 let, u kterých byla diagnostikována ASD. Kontrolní soubor byl složen z dětí též ve věku 3-12 let, u kterých ASD diagnostikována nebyla. V konečném souboru tedy bylo 1001 případů s ASD a 514 kontrol. Průzkum se skládal z 22 až 25 otázek v závislosti na tom, zda dotyčné dítě mělo ASD. Jednalo se o jednu otázku týkající se počtu dávek APAP spotřebovaných dítětem do doby než dovršilo stáří dvou let a další otázku týkající se počtu dávek ibuprofenu spotřebovaných dítětem do doby než dovršilo stáří dvou let. Byla sestavena sada kategorických proměnných závislých na dávce, které obsahovaly odpovědi na otázky týkající se APAP a ibuprofenu z průzkumu. Byly také vytvořeny demografické proměnné. V této studii se uvažuje o osmi demografických proměnných: pohlaví, věk dítěte, etnicita, Středozápad, Jih, vzdělání matek, věk matky při narození dítěte a její vztah k dítěti.

Analýzy byly prováděny pomocí statistického balíčku R. Prahová hodnota pro statistickou významnost p-hodnot v této studii byla stanovena na 0,05. Přibližné OR závislé na dávce a intervaly spolehlivosti 95% (CI) byly vypočteny pro kategorické proměnné proti výsledku ASD. Tabulka 3 ukazuje statistiku o počtech dávek APAP pro každou vrstvu, aOR APAP pro každou vrstvu a vypočítaný PAF pro každou vrstvu. Sečtením PAF napříč vrstvami se odhaduje PAF pro ASD spojené s postnatálním užíváním APAP u mužů na 43,7 %.

Tab. 3: PAF spojený s postnatálním užíváním APAP u mužů podle vrstev. (kovariát pro aOR jsou: věk dítěte, etnický původ, Středozápad, Jih, vzdělání matek, věk matky při narození dítěte a její vztah k dítěti. aOR- upravený poměr míry pravděpodobnosti, 95% CI- 95% interval spolehlivosti, PAF-zlomek připisatelný populaci) (Bittker, 2020).

APAP dávek	Případů n (%)	aOR	95% CI	PAF (%)
žádná	37 (5,6)	reference		
1–3	134 (20,4)	1,360	0,683–2,680	4,13
4–15	308 (47)	1,685	0,881–3,165	18,11
16–63	156 (23,8)	1,824	0,909–3,616	11,03
64+	21 (3,2)	6,805	1,595–47,633	10,45

Otázkou je, zda i jiné proměnné, které nebyly v této studii zkoumány, by mohly vysvětlit relativně silnou asociaci pozorovanou mezi postnatálním užíváním APAP a ASD mezi muži. Jednou z možností je, že případy, kdy byla diagnostikována ASD, mohly mít větší potřebu pro užívání APAP než kontrolní skupina, kde ASD diagnostikována nebyla. Je pravděpodobné, že případy, kde byla později ASD prokázána, mohly mít větší náchylnost k horečkám, a proto bylo pravděpodobnější, že budou APAP více užívat než kontrolní skupiny. Pokud by mohl tento scénář v této studii ovlivnit zkoumanou asociaci mezi APAP a ASD, pak by se dalo očekávat podobně silné spojení mezi ibuprofenem a ASD, protože obě léčiva jsou užívána jako antipyretika. Přesto jsou asociace mezi ibuprofenem a ASD pozorované v této studii mnohem slabší než asociace mezi APAP a ASD, což platí zejména pro muže. Některá omezení této studie vyplynula z její závislosti na souboru údajů, který byl založen na internetovém průzkumu. Například odpovědi rodičů na průzkumné otázky nebyly nezávisle ověřeny. Kromě toho nebyly získány informace o velikosti podávaných dávek.

Tato studie zjistila, že postnatální užívání APAP, který byl podáván v dávkách před dovršením dvou let, je spojeno s rizikem vzniku ASD u dětí mužského pohlaví (aOR 1.023, CI 1.005–1.043, $p = 0.02$). PAF je pro postnatální užívání APAP přibližně 40 % rizika pro vznik ASD mezi muži v USA (Bittker et al., 2020).

3. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo popsat APAP jako běžné léčivo, zejména jeho terapeutické a toxické účinky. Jsou zde také popsány možnosti moderní terapie při intoxikaci APAP, metabolismus APAP a dále jeho možnosti transportu.

Z vědeckých výzkumů a studií vyplývá, že místo působení APAP je v centrálním nervovém systému pomocí inhibice COX-2, což je acetaminofenem preferovaný izoenzym z dvojice COX-1 a COX-2. COX-2 je enzym, který umožňuje vznik prostaglandinů, což jsou mediátory bolesti a horečky. Také bylo zjištěno, že APAP nepřímo působí na sestupné serotoninergické dráhy, L-arginin/NO cestu a kanabinoidní systém, čímž též zapřičiňuje jeho analgetický účinek.

Předávkování APAP může mít za následek těžké poškození jater, které může vyústit až v ALF. V důsledku intoxikace APAP dochází k hromadění jeho toxického metabolitu NAPQI, který vyčerpává buněčný GSH a tvoří proteinové adukty zejména v mitochondriích. To má za následek oxidační stres a nukleární translokace těchto proteinů pak způsobuje fragmentaci DNA a nakonec nekrózu hepatocytů. Jako standardní antidotum je používán NAC, který slouží jako donátor SH- skupin při vyčerpání GSH. V této práci byly dále popsány další možnosti terapie při intoxikaci APAP. Konkrétně 4-methylpyrazol, metformin, calmangafodipir, methylenová modř a Nrf2 aktivátory. Příčin předávkování APAP je několik, v této práci jsem jako příčiny uvedl úmyslné předávkování, popsaná případová studie ukazuje těhotnou ženu, u které úmyslné předávkování mělo za následek úmrtí plodu. Jako další příčinu uvádím opakované podání terapeutických dávek u dětí, druhá případová studie ukazuje devítiletou dívku, u které opakované podávání terapeutických dávek APAP zapřičinilo její úmrtí, protože nebyl brán zřetel na její celkovou hmotnost a tomu odpovídající dávku APAP.

Kromě jaterní hepatotoxicity může APAP způsobovat neurologické změny. V závěru této práce jsou popsány dvě klinické studie zabývající se touto problematikou. Souvislost v případě užívání APAP u těhotných matek a následný vznik ADHD u jejich potomků nebyla potvrzena a je potřeba provádět další studie. Zatímco spojitost mezi postnatálním užíváním APAP a rizikem možného vzniku poruchy autistického spektra u mužů potvrzena byla.

Z mé práce je patrné, že APAP je bezpečné analgetikum a antipyretikum, ale je potřeba dbát zvýšené opatrnosti při jeho užívání, jinak následek může být fatální.

4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Akakpo J. Y., Ramachandran A., Kandel S. E., Ni H. M., Kumer, S. C. et al.: 4-Methylpyrazole protects against acetaminophen hepatotoxicity in mice and in primary human hepatocytes. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2018** (37), 322-1310.
2. Alloui A., Chassaing C., Schmidt J. et al.: Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **2002** (443), 7-71.
3. Anderson B.J.: Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*, **2008** (18), 915-921.
4. Atamna H., Mackey J., Dhahbi, J. M.: Mitochondrial pharmacology: Electron transport chain bypass as strategies to treat mitochondrial dysfunction. *Biofactors*, **2012** (38), 158-166.
5. Atkuri K.R., Mantovani J.J., Herzenberg L.A., L.A. Herzenberg.: *N*-acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2007** (7), 355-359.
6. Auchus R.J., Miller W.L.: P450 enzymes in steroid processing P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (fourth ed.), *Springer, New York*, **2015**, 851-879.
7. Babu Pingilia R., Krishnamanjari Pawar A., Siva R.: Effect of chrysin on the formation of *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine, a toxic metabolite of paracetamol in rats and isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, **2019** (302), 123-134.
8. Barnes S.N., Aleksunes L.M., Augustine L., Scheffer G.L, Goedken M.J et al.: Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug Metab Dispos.*, **2007** (35), 1963-1969.
9. Becker K.G., Schultz S.T.: Similarities in features of autism and asthma and a possible link to Acetaminophen use. *Med. Hypotheses*, **2010** (74), 7-11.
10. Bertolini A., Ferrari A., Ottani S., Guerzoni R. et al.: Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.*, **2006** (12), 250-275.
11. Bittker S.S., Bell K.R.: Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: An epidemiological study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **2018** (14), 1399-1414.
12. Bittker S.S., Bell K.R.: Postnatal Acetaminophen and Potential Risk of Autism Spectrum Disorder among Males. *Behav Sci.*, **2020** (10), 1-26.

13. Blecharz K., Wawer K., Jawna-Zboinska A. et al.: Early paracetamol exposure decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in striatum and affects social behaviour and exploration in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **2018** (168) 25-32.
14. Boutaud O., Aronoff D.M., Richardson J.H., Marnett L.J.: Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2002** (99), 7130-7135.
15. Bouvet R., Cauchois A., Baert A. et al.: Fatal acetaminophen poisoning with hepatic microvesicular steatosis in a child after repeated administration of therapeutic doses. *Forensic Sci. Int.*, **2020** (310), 110-258.
16. Brucato M., Ladd-Acosta C., Li M. et al.: Prenatal exposure to fever is associated with autism spectrum disorder in the Boston birth cohort. *Autism Res.*, **2017** (10), 1878-1890.
17. Bunchorntavakul C., Reddy K.: Acetaminophen (APAP or N-acetyl-p-aminophenol) and acute liver failure. *Clin. Liver Dis.*, **2018** (22), 325-334.
18. Cover C., Mansouri A., Knight T.R. et al.: Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005** (315), 879-887.
19. Criado A., Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M.: Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis. *Talanta*, **2000** (53), 417-423.
20. Du K., Ramachandran A., Weemhoff J. L., Chavan H. et al.: Editor's highlight: Metformin protects against acetaminophen hepatotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant stress and dysfunction. *Toxicol. Sci.*, **2016** (154), 214-226.
21. Engström L., Daniel R., Wilhelms B., Eskilsson A. et al.: Acetaminophen reduces lipopolysaccharide-induced fever by inhibiting cyclooxygenase-2. *Neuropharmacology*, **2013** (71), 124-129.
22. Faraone S.V., Perlis R.H., Dolye A.E. et al.: Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, **2005** (57), 1313-1323.
23. Fasmer O.B., Riise T., Lund A., Dilsaver S.C. et al.: Comorbidity of migraine with ADHD. *J. Attent. Disord.*, **2010** (16), 339-345.
24. Franz A.P., Bolat G.U., Bolat H. et al.: Attention-deficit/hyperactivity disorder and very preterm/very low birth weight: a meta-analysis. *Pediatrics*, **2018** (14), 1-16.

25. Frisch M., Simonsen J.: Ritual circumcision and risk of autism spectrum disorder in 0- to 9-year-old boys: National cohort study in Denmark., *J. R. Soc. Med.* **2015** (108), 79-266.
26. Ghanema I., María Pérez J. et al.: Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacological Research*, **2016** (109), 13-119.
27. Graham G.G., Scott K.F.: Mechanism of action of paracetamol. *Am. J. Ther.*, **2005** (12), 46-55.
28. Grimes D.A., Schulz K.F.: Bias and causal associations in observational research. *Lancet.*, **2002** (359), 248-252.
29. Groudine S., Fossum S., Use of intravenous acetaminophen in the treatment of postoperative pain. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*, **2011** (26), 74-80.
30. Hagiya Y., Kamata S., Mitsuoka S., Okada N. et al.: Hemizygoty of transsulfuration genes confers increased vulnerability against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2015** (282), 195-206.
31. Hansen T.F., Hoeffding L.K., Kogelman L. et al.: Comorbidity of migraine with ADHD in adults. *BMC Neurol.*, **2018** (18), 1-9.
32. Heard K., Bui A., Mlynarchek S.L., Green J.L. et al.: Toxicity from repeated doses of acetaminophen in children: assessment of causality and dose in reported cases, *Am. J. Ther.*, **2014** (21), 174- 183.
33. Hinson J.A., Roberts D.W., James L.P.: Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2010** (196), 369-405.
34. Hinz B., Brune K.: Cyclooxygenase-2—10 Years Later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002** (300), 367-375.
35. Hinz B., Brune K.: Paracetamol and cyclooxygenase inhibition: is there a cause for concern? *Annals of the Rheumatic Diseases*, **2012** (71), 20-25.
36. Hinz B., Cheremina O., Brune K.: Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. *FASEB J.*, **2008** (2), 383-390.
37. Higgins J.P., Thompson S.G.: Quantifying heterogeneity in a meta- analysis. *Stat Med.* **2002** (21), 1539-1558.
38. Hou C.C., Lin H., Chang C.P., Huang W.T., Lin M.T.: Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. *Eur. J. Pharmacol.*, **2011** (667), 6-12.
39. Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., et al.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by Acetaminophen and other analgesic_antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002** (99), 13926-13931.

40. Christophe M., Daulhac L., Bonnefont J.: Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*, **2008** (139), 190-200.
41. Jaeschke H., Duan L., Nguyen T., Ramachandran A.: Mitochondrial damage and biogenesis in acetaminophen-induced liver injury. *Liver Research*, **2019** (3), 150-156.
42. Jaeschke H., Duan L., Akakpo J.Y, Farhood A., Ramachandran A.: The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*, **2018** (118), 709-718.
43. Jaeschke H., Akakpo J., Umbaugh S., Ramachandran A.: Novel Therapeutic Approaches Against Acetaminophen-induced Liver Injury and Acute Liver Failure. *Toxicological sciences*, **2020** (174), 159-167.
44. Jollow D.J., Mitchell J.R., Potter W.Z., Davis D.C., Gillette J.R., Brodie B.B.: acetaminophen- induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973** (187), 195-202.
45. Kang K. Y., Shin J. K., Lee S. M.: Pterostilbene protects against acetaminophen-induced liver injury by restoring impaired autophagic flux. *Food Chem. Toxicol.*, **2019** (123), 536-545.
46. Kang A. M., Padilla-Jones A., Fisher E. S., Akakpo, J. Y. et al.: The effect of 4-methylpyrazole on oxidative metabolism of Acetaminophen in human volunteers. *J. Med. Toxicol.*, **2019** (16), 169-176.
47. Karlsson J. O., Ignarro L. J., Lundstrom I., Jynge P.: Calmangafodipir [Ca₄Mn(DPDP)₅], mangafodipir (MnDPDP) and MnPLED with special reference to their SOD mimetic and therapeutic properties. *Drug Discov. Today*, **2015** (20), 411-421.
48. Khamdang S., Takeda M., Noshiro R., Narikawa S., Enomoto A. et al.: Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002** (303), 53-534.
49. Kidron H., Wissel G., Manevski N., Hakli M., Ketola R.A. et al.: Impact of probe compound in MRP2 vesicular transport assays. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2012** (46), 10-100.
50. Kim Y., H., Hwang J. H., Kim K. S. et al.: Metformin ameliorates acetaminophen hepatotoxicity via Gadd45b-dependent regulation of JNK signaling in mice. *J. Hepatol.*, **2015** (63), 75-82.
51. Klaassen C. D., Reisman S. A.: Nrf2 the rescue: Effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010** (244), 57-65.

52. Kulo M.Y., Peeters K., Allegaert A., Smits J. et al.: Pharmacokinetics of paracetamol and its metabolites in women at delivery and post-partum. *Br. J. Clin. Pharmacol*, **2012** (75), 850-860.
53. Kumpulainen H., Kokki T., Halonen M., Heikkinen J. et al.: Paracetamol (acetaminophen) penetrates readily into the cerebrospinal fluid of children after intravenous administration. *Pediatrics*, **2007** (119), 766-771.
54. Lash T.L., Fox M.P., MacLehose R.F., Maldonado G. et al.: Practices for quantitative bias analysis. *Int. J. Epidemiol.* **2014** (43), 1969-1985.
55. Lee J.J., Simmons D.L.: Antipyretic therapy: Clinical pharmacology. *Handb. Clin. Neurol*, **2018** (157), 869-881.
56. Lee K. K., Imaizumi N., Chamberland S. R., Alder N. N., Boelsterli U. A.: Targeting mitochondria with methylene blue protects mice against acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*, **2015** (61), 326-336.
57. Li D., Sham P.C., Owen M.J.: Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Human Mol Genet.*, **2006** (15), 2276-2284.
58. Masarwa R., Levine H., Gorelik E., Reif S. et al.: Prenatal exposure to acetaminophen and risk for attention deficit hyperactivity disorder and autistic spectrum disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis of cohort studies. *Am. J. Epidemiol.*, **2018** (187), 1817-1827.
59. Masarwa R., Platt R.W., Filion K.B.: Acetaminophen use during pregnancy and the risk of attention deficit hyperactivity disorder: A causal association or bias?. *Paediatr Perinat Epidemiol.*, **2020** (34), 309-317.
60. McGill M.R., Jaeschke H.: Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*, **2013** (30), 87-2147.
61. McQuay H. J., Moore R.A.: Dose-response in direct comparisons of different doses of aspirin, ibuprofen and paracetamol (acetaminophen) in analgesic studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2007** (63), 271-278.
62. Melnyk S., Fuchs G.J., Schulz E., Lopez M. et al.: Metabolic imbalance associated with methylation dysregulation and oxidative damage in children with autism. *J. Autism Dev. Disord.* **2012** (2), 367-377.
63. Mick E., Biederman J., Faraone S.V., Sayer J., Kleinman S.: Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *J. Am. Acad Child Adolesc Psychiatry*, **2002** (41), 378-385.

64. Mirrasekhian E., Nilsson J., Shionoya K. et al.: The antipyretic effect of paracetamol occurs independent of transient receptor potential ankyrin 1-mediated hypothermia and is associated with prostaglandin inhibition in the brain. *FASEB Journal*, **2018** (32), 5751-5759.
65. Moller P.L., Petersen C.T., Juhl G.I., Dillenschneider A., Skoglund L.A.: Onset of acetaminophen analgesia: comparison of oral and intravenous routes after third molar surgery. *Br. J. Anaesth.* **2005** (5), 642-648.
66. Morrison E. E., Oatey K., Gallagher B., Grahamslaw J. et al.: Principal results of a randomised open label exploratory, safety and tolerability study with calmagofodipir in patients treated with a 12h regimen of N-acetylcysteine for paracetamol overdose (POP trial). *EBioMedicine*, **2019** (46), 423-430.
67. Nowak J.Z., Okul L.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in ophthalmology: pharmacological and clinical characteristics. *Military Pharmacy and Medicine*, **2012** (4), 33-50.
68. Ogilvie J.D., Rieder M.J., Lim R.: Acetaminophen overdose in children. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal = Journal de L'association Medicale Canadienne.*, **2012** (184), 1492-1496.
69. Ottani A., Leone S., Sandrini M. et al.: The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **2006** (531), 1-3.
70. Pasero C., Stannard D.: The role of intravenous acetaminophen in acute pain management: a case-illustrated review. *Pain Manag Nurs*, **2012** (2), 107-124.
71. Pepe M.S., Janes H., Longton G., Leisenring W., Newcomb P.: Limitations of the odds ratio in gauging the performance of a diagnostic, prognostic, or screening marker. *Am. J. Epidemiol.*, **2004** (159), 882-890.
72. Perera F.P., Chang H.W., Tang D. et al.: Early-life exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and ADHD behavior problems. *PLoS ONE*, **2014** (11), 1-9.
73. Peterson B.S., Rauh V.A., Bansal R. et al.: Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *JAMA Psychiatry*, **2015** (72), 531-540.
74. Pickering G., EstÈve V., Loriot M.A. et al.: Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2008** (84), 47-51.
75. Piomelli D., Giuffrida A., Calignano A., Rodriguez F.: Endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000** (21), 218-224.
76. Posadas I., Santos P., Blanco A., Muñoz-Fernánde M., Ceña V.: Acetaminophen induces apoptosis in rat cortical neurons. *PLoS ONE*, **2010** (5), 60-153.

77. Ramachandran A., Lebofsky M., Weinman S. A., Jaeschke H.: The impact of partial manganese superoxide dismutase (SOD2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during Acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2011** (251), 226-233.
78. Rashed M.S., Myers T.G., Nelson S.D.: Hepatic protein arylation, glutathione depletion, and metabolite profiles of acetaminophen and a non-hepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in the mouse. *Drug Metab Dispos*, **1990** (18), 765-770.
79. Remien C.H., Adler F.R., Waddoups L., Box T.D., Sussman N.L.: Mathematical modeling of liver injury and dysfunction after acetaminophen overdose: Early discrimination between survival and death. *Hepatology*, **2012** (56), 727-734.
80. Rendi S. F.P.: Guengerich Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem. Res. Toxicol.*, **2015** (28), 38-42.
81. Rongen A. V., Valitalo P.A.J., Peeters M.Y.M. et al.: Morbidly obese patients exhibit increased CYP2E1-mediated oxidation of Acetaminophen. *Clin. Pharmacokinet.*, **2016** (55), 833-847.
82. Roth M., Obaidat A., Hagenbuch B.: OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.*, **2012** (165), 128-1260.
83. Rudraiah S., Rohrer P.R., Gurevich I., Goedken M.J., Rasmussen T. et al.: Tolerance to Acetaminophen Hepatotoxicity in the Mouse Model of Autoprotection Is Associated with Induction of Flavin-Containing Monooxygenase-3 (FMO3) in Hepatocytes. *Toxicol. Sci.*, **2014** (141), 2-263.
84. Saito C., Lemasters J.J., Jaeschke H.: c-Jun, N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010** (246), 8-17.
85. Saeedi Saravi S. S., Hasanvand A., Shahkarami K., Dehpour A. R.: The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/mice. *Pharm. Biol.*, **2016** (54), 2830-2837.
86. Shenai N., Shulman J., Gopalan P., Cheng E., Cerimele JM.: Fetal Outcomes in Intentional Over-the-Counter Medication Overdoses in Pregnancy. *Psychosomatics*, **2018** (59), 400-404.
87. Schilling A., Corey R., Leonard M., Eghtesad B.: Acetaminophen: old drug, new warnings. *Cleveland Clin. JMed.*, **2010** (77), 19-27.

88. Schultz S.T., Wingard H.S., Akshoomo D.L.: Acetaminophen (paracetamol) use, measles-mumps-rubella vaccination, and autistic disorder: The results of a parent survey. *Autism*, **2008** (12), 293-307.
89. Singla N.K., Parulan C., Samson R., Hutchinson J.L., Bushnell R. et al.: Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetic parameters after single-dose administration of intravenous, oral or rectal acetaminophen. *Presented at the 10th Annual American Society of Regional Anesthesia Pain Medicine Meeting and Workshops*, New Orleans, **2011**.
90. Smith H.S.: Potential analgesic mechanisms of Acetaminophen. *Pain Physician*, **2009** (12), 269-280.
91. Temple A.R., Temple B.R., Kuffner E.K.: Dosing and antipyretic efficacy of oral acetaminophen in children. *Clin. Ther.*, **2013** (35), 1361-1375.
92. Toczek M., Malinowska B.: Enhanced endocannabinoid tone as a potential target of pharmacotherapy. *Life Sciences.*, **2018** (204), 20-45.
93. Tujios S.R, Hynan L.S., Vazquez M.A., Larson A.M., Seremba E., Sanders C.M., et al.: Risk factors and outcomes of acute kidney injury in patients with acute liver failure. *Clin. Gastroenterol Hepatol.*, **2015** (13), 352-359.
94. Werler M.M., Mitchell A.A., Hernandez-Diaz S., Honein M.A.: Use of over-the-counter medications during pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol.*, **2005** (193), 771-777.
95. Wilcox C.M., Cryer B.: Triadafilopoulos, Patterns of use and public perception of over-the-counter pain relievers: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Rheumatol*, **2005** (32), 2218-2224.
96. Win S., Than T.A, Min R.W., Aghajan M., Kaplowitz.: N. c-Jun N-terminal kinase mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH3BP5)-dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial. *Src. Hepatology*, **2016** (63), 1987-2003.
97. Wrotek S., Sobocińska J., Kozłowski H.M., Pawlikowska M. et al.: New Insights into the Role of Glutathione in the Mechanism of Fever. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020** (21), 1393.
98. Xie Y., McGill M.R., Du K., et al.: Mitochondrial protein adducts formation and mitochondrial dysfunction during N-acetyl-m-aminophenol (AMAP)-induced hepatotoxicity in primary human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2015** (289), 213-222.
99. Zelner I., Matlow J., Hutson J.R. et al.: Acute Poisoning During Pregnancy: Observations from the Toxicology Investigators Consortium. *J. Med. Toxicol.*, **2015** (11), 301-308.

100. Zerbo O., Iosif A-M., Walker C., Ozonoff S., Hansen R.L., Hertz- Picciotto I.: Is maternal influenza or fever during pregnancy associated with autism or developmental delays? Results from the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) study. *J. Autism. Dev.Disord.*, **2013** (43), 25-33.
101. Zhang W., Nuki G., Moskowitz R.W. et al.: OARSI Recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through, *Osteoarthritis Cartilage*, **2010** (18), 476-499.