

Farmakokinetyka paracetamolu w osoczu krwi i ślinie cieląt*)

BEATA GROCHOWINA, KRZYSZTOF JANUS

Zakład Chemii Fizjologicznej Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 2, 71-466 Szczecin

Grochowina B., Janus K.

Pharmacokinetics of paracetamol in calf plasma and saliva

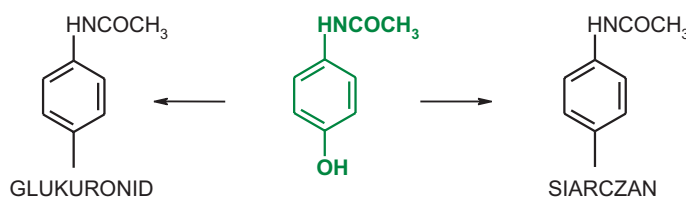
Summary

The aim of the investigation was the pharmacokinetics of paracetamol (as a model drug) in plasma and saliva in calves at different ages. The experiment was carried out on 15 healthy calves of BW (Black-and-White) breed. Paracetamol (5 mg/kg bw.) was administered per os on the tenth, twentieth and fourteenth days of the calves' lives. The concentration of the model drug in the plasma was determined by the spectrophotometric method. Pharmacokinetic parameters were estimated using a non-compartmental method by means of the TopFit computer program. It was determined that paracetamol concentration in the plasma and saliva was significantly different in many analyzed time points. Insignificant differences were observed in 10-day-old calves after 1.5, 2 and 3 hours after drug administration. In 20 and 40-day-old calves, insignificant changes were observed after 2 and 3 hours after paracetamol administrations. In all examined animals maximal paracetamol concentration was observed after 1 hour following drug administration. The obtained results indicate that saliva is not a good biological fluid for the determination the paracetamol pharmacokinetic parameters in calves.

Keywords: paracetamol, pharmacokinetics, plasma, saliva

Paracetamol (N-acetylo-p-aminofenol) jest lekiem o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym (5, 6, 8, 10, 25). Efekt ten jest wynikiem hamowania syntezy prostaglandyn (zmniejszenie aktywności cyklooksygenazy kwasu arachidonowego) w centralnym układzie nerwowym (2, 33). Paracetamol zmniejsza także wrażliwość komórek nerwowych na działanie takich mediatorów, jak kininy i serotonina (25, 33). Paracetamol po podaniu doustnym wchłaniany jest na drodze dyfuzji prostej (6, 25). Jest w ponad 95% metabolizowany w wątrobie (2, 5, 7, 13, 20, 29). W hepatocytach ulega on reakcjom sprzęgania, głównie z kwasem glukuronowym przy udziale transferazy glukuronowej (UDP-glukuronylotransferazy) (1, 2, 4, 13). Około 3-4% paracetamolu ulega utlenieniu do N-acetylobenzochinoiminy. Reakcja ta jest katalizowana przez enzymy kompleksu cytochromu P-450 (5, 6, 26). Sprzęganie paracetamolu z siarczanem jest głównym szlakiem metabolicznym tego leku u młodych organizmów, „charakteryzujących” się zmniejszoną aktywnością glukuronilylotransferaz (14, 15).

Wiele prac naukowych zawiera wyniki badań dotyczących zawartości różnych środków farmakologicznych w ślinie, w tym możliwości oceny farmakokinetiki leków modelowych na podstawie określenia ich



Schemat glukuronidacji i sulfatacji paracetamolu

stężenia w tym płynie biologicznym – zamiast w osoczu krwi (12, 16, 18, 19, 21, 24, 27). Badania nad wykorzystaniem śliny jako materiału biologicznego w badaniach farmakokinetycznych dotyczą głównie ludzi, a ich rezultaty nie są jednoznaczne (18, 19, 24, 27, 31, 32).

Celem niniejszych badań było porównanie wielkości parametrów farmakokinetycznych paracetamolu u cieląt, wyliczonych na podstawie stężenia w osoczu krwi i ślinie oraz określenie, czy możliwa jest precyzyjna ocena farmakokinetyki tego leku modelowego (markera do pośredniej oceny aktywności enzymów katalizujących procesy II fazy biotransformacji wątrobowej) u tych zwierząt na podstawie jego stężenia w ślinie.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 15 cielętach rasy czarno-białej w 10., 20 i 40. dniu życia. W czasie trwania eks-

*) Praca wykonana i finansowana w ramach grantu 3 P 06D 016 24 finansowanego przez KBN.

perymentu zwierzęta były utrzymywane w ujednoliconych warunkach środowiskowych i żywione zgodnie z ogólnie przyjętymi normami.

W trakcie trwania badań cielęta nie otrzymywały żadnych środków farmakologicznych mogących wchodzić w interakcję farmakokinetyczną i biochemiczną z paracetamolem.

Protokół badań został zaakceptowany przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (zezwolenie 31/2002).

Paracetamol (Codipar Glaxo-Wellcome, Poznań) podawano *per os* w dawce 5 mg/kg m.c. Krew (około 5 ml) pobierano do próbek zawierających 250 j.m. heparyny (Heparinum–Jelfa) przed „0” oraz po upływie 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 godzin od podania substancji testowej. Próbkę śliny (około 1 ml), zgodnie z metodą opisaną przez Janusa i wsp. (12), zbierano w tym samym czasie co krew. Krew i ślinę (w celu osadzenia mukopolisacharydów) wirowano (4000 g, 15 min.). Uzyskany po odwirowaniu materiał biologiczny przechowywano w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia analiz. Stężenie paracetamolu w osoczu krwi i ślinie oznaczono metodą spektrofotometryczną (28). Średni „odzysk” paracetamolu z osocza wynosił $95,8 \pm 2,9\%$, natomiast ze śliny $94,4 \pm 3,3\%$. Czulość metody wynosiła dla osocza $0,20 \mu\text{g/ml}$, a dla śliny $0,24 \mu\text{g/ml}$. Wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu oznaczono metodą niekompartmentową przy wykorzystaniu programu TopFit 2.0. Wyliczono następujące parametry farmakokinetyczne: stężenie maksymalne – C_{max} ($\mu\text{g/ml}$); czas osiągnięcia stężenia maksymalnego – T_{max} (min.); objętość dystrybucji – V_d (l); względną objętość dystrybucji – V_d (l/kg); średni czas przebywania w organizmie – MRT (min.); okres półtrwania $t_{1/2\beta}$ (min.); klirens metaboliczny – Cl_m (ml/min.); względny klirens metaboliczny – Cl_m (ml/min./kg); pole powierzchni pod krzywą – AUC ($\mu\text{g} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1}$).

Stopień wiązania paracetamolu przez białka osocza wliczono zgodnie ze wzorem:

$$F_B = 1 - V_{do}/V_{ds}$$

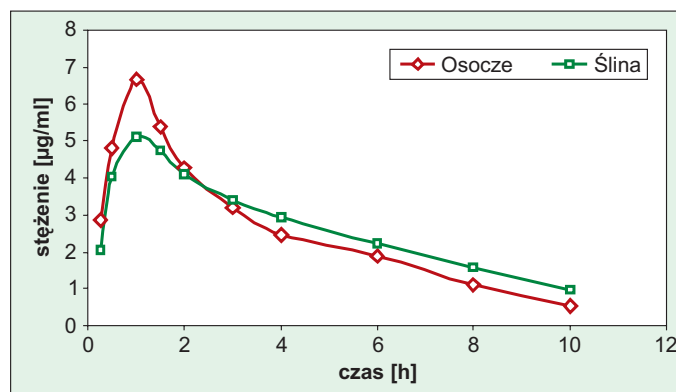
gdzie: V_{do} – objętość dystrybucji paracetamolu określana na podstawie zmian stężenia tego leku w osoczu krwi; V_{ds} – objętość dystrybucji paracetamolu określana na podstawie zmian stężenia tego leku w ślinie.

Przy pomocy testu t-Studenta oceniono istotność różnic wielkości parametrów farmakokinetycznych paracetamolu: osocze vs. ślina.

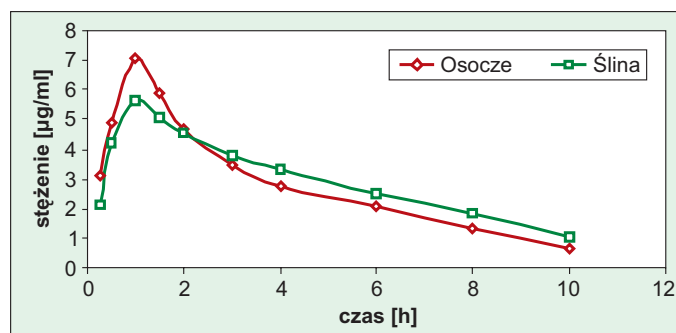
Wyniki i omówienie

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że stężenia paracetamolu w osoczu krwi i ślinie cieląt różnią się istotnie w większości analizowanych punktów czasowych. Statystycznie nieistotne różnice zaobserwowano u zwierząt 10-dniowych po upływie 1,5, 2 i 3 godzin, natomiast u 20- i 40-dniowych – 2 i 3 godzin od podania leku modelowego. U cieląt 10-, 20- i 40-dniowych maksymalne stężenie paracetamolu w osoczu i ślinie zaobserwowano po upływie 1 godziny od podania *per os* (ryc. 1-3).

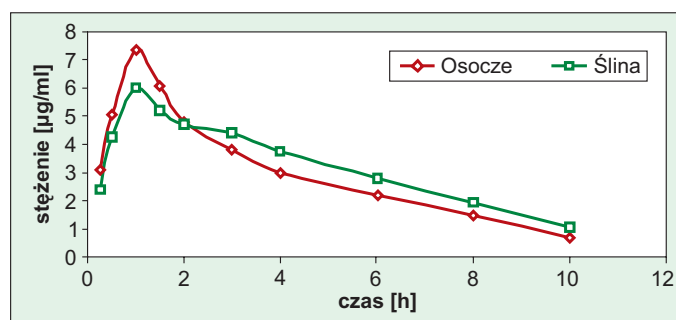
Wielkość analizowanych parametrów farmakokinetycznych paracetamolu obliczanych na podstawie stę-



Ryc. 1. Zmiany stężenia paracetamolu po podaniu *per os* w osoczu krwi i ślinie 10-dniowych cieląt



Ryc. 2. Zmiany stężenia paracetamolu po podaniu *per os* w osoczu krwi i ślinie 20-dniowych cieląt



Ryc. 3. Zmiany stężenia paracetamolu po podaniu *per os* w osoczu krwi i ślinie 40-dniowych cieląt

żenia leku modelowego w osoczu krwi i ślinie różniła się istotnie (tab. 1).

Interpretacja uzyskanych w niniejszym doświadczeniu wyników jest stosunkowo trudna, ze względu na istnienie znaczących różnic międzygatunkowych farmakokinetyki paracetamolu (2, 3, 13, 17, 20, 22, 23, 25) oraz brak publikacji dotyczących stężenia tego leku w ślinie zwierząt. Biorąc powyższe pod uwagę, rezultaty przeprowadzonych badań skonfrontowano głównie z danymi uzyskanymi u ludzi. Stwierdzone w doświadczeniu wielkości objętości dystrybucji paracetamolu są zbliżone do rezultatów badań przeprowadzonych u prosiąt (22, 23). Nieco niższe wartości obserwowano u młodych królików (20), natomiast zdecydowanie wyższe u wielbłądów (3). Okres półtrwania oraz średni czas przebywania paracetamolu w organizmie okazały się zbliżone do wyników badań

Tab. 1. Wielkość parametrów farmakokinetycznych paracetamolu w osoczu krwi i ślinie cieląt po podaniu *per os* (n = 15; $\bar{x} \pm s$)

Parametry	Osocze cieląt 10. dzień	Ślina cieląt 10. dzień	Osocze cieląt 20. dzień	Ślina cieląt 20. dzień	Osocze cieląt 40. dzień	Ślina cieląt 40. dzień
C _{max} (µg/ml)	6,87 ± 0,57	5,40 ± 0,53*	7,38 ± 0,63	5,92 ± 0,57*	7,80 ± 0,68	6,51 ± 0,48*
T _{max} (min.)	72,00 ± 9,00	87,00 ± 11,0*	65,00 ± 7,00	80,00 ± 7,00*	59,00 ± 6,00	74,00 ± 8,00*
V _d (l)	28,04 ± 2,96	31,20 ± 2,77*	32,15 ± 3,07	36,05 ± 3,65*	39,20 ± 3,89	45,50 ± 4,14*
V _d (l/kg)	0,701 ± 0,058	0,780 ± 0,066*	0,642 ± 0,053	0,720 ± 0,071*	0,560 ± 0,047	0,650 ± 0,057*
MRT (min.)	100,00 ± 9,00	120,00 ± 13,0*	88,00 ± 8,00	105,0 ± 10,0*	75,00 ± 7,00	92,00 ± 10,0*
T _{1/2β} (min.)	89,00 ± 7,00	106,00 ± 11,0*	80,00 ± 6,00	94,00 ± 8,00*	70,00 ± 6,00	85,00 ± 8,00*
Cl _m (ml/min.)	296,80 ± 30,20	246,00 ± 26,4*	395,8 ± 38,4	337,0 ± 33,5*	595,0 ± 60,1	521,5 ± 48,7*
Cl _m (ml/min./kg)	7,42 ± 0,84	6,15 ± 0,65*	7,94 ± 0,95	6,74 ± 0,72*	8,50 ± 0,74	7,45 ± 0,68*
AUC [µg·h·ml ⁻¹]	12,10 ± 1,90	16,70 ± 2,20*	10,20 ± 1,30	13,90 ± 1,80*	8,50 ± 0,90	11,90 ± 1,50*

Objaśnienia: * – różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$ między osoczem a śliną w poszczególnych grupach wiekowych cieląt

Monshowera i wsp. (22, 23); zdecydowanie krótszy $t_{0,5}$ i MRT stwierdzili natomiast Ali i wsp. (3) oraz McNamara i wsp. (20). Wielkości klirensu metabolicznego paracetamolu u badanych cieląt są nieco niższe od obserwowanych przez Monshouwera i wsp. (22, 23) oraz zdecydowanie niższe od podawanych przez Ali i wsp. (3) oraz McNamara i wsp. (20).

W wielu badaniach określano farmakokinetykę leków w oparciu o pomiar ich stężenia w ślinie u ludzi (4, 6, 18, 24, 30-32). Natomiast bardzo nieliczne są publikacje dotyczące wykorzystania śliny w badaniach farmakokinetycznych u zwierząt (12). Zaletą śliny jako materiału biologicznego wykorzystywanego w badaniach farmakokinetycznych jest m.in. nieinwazyjność pobierania próbek (6, 16, 18, 21). Oznaczenie stężenia leku w ślinie i porównanie z koncentracją w osoczu pozwala na oznaczenie wielkości wolnej frakcji danej substancji farmakologicznej (12, 16, 27). Wiadomo, że tylko wolna frakcja leku może przenikać błony biologiczne, wiązać się z receptorem oraz ulegać biotransformacji (16, 27, 34). Wielkość frakcji wolnej leku zależy od wielu czynników, m.in. od jego całkowitego stężenia, powinowactwa do białek, stężenia białek, obecności wielu substancji endo- i egzogennych (16, 24, 34).

Uzyskane wyniki wskazują, iż farmakokinetyka paracetamolu w osoczu i ślinie cieląt po podaniu *per os* różni się istotnie. Odmienne wyniki uzyskano u ludzi w odnośnie do innych (antypiryna) leków modelowych. Niektórzy autorzy (30-32) wykazali zbliżone wielkości objętości dystrybucji, okresu półtrwania i metabolicznego klirensu antypiryny, niezależnie od rodzaju materiału biologicznego (osocze, ślina) wykorzystywanego do oznaczeń parametrów farmakokinetycznych. Podobne zjawisko zaobserwowano u cieląt w przypadku kofeiny (11).

Jednym z ilościowych wskaźników transportu substancji z krwi do śliny jest tzw. współczynnik przenikalności, wyrażający stosunek koncentracji substancji w ślinie do jej stężenia w osoczu (16, 24, 27). Wiel-

kości tego współczynnika zbliżone do jednego obserwuje się w tych przypadkach, gdy szybkość przenikania leku jest większa lub równa szybkości wydzielania śliny (salivary flow). W przeciwnym przypadku współczynnik ten jest mniejszy od jedności (18, 19, 27). Rozdział środków farmakologicznych między śliną i osoczem wynika nie tylko z właściwości tych płynów biologicznych i oddzielających je barier tkankowych, ale także właściwości wprowadzanych do organizmu substancji (stopień jonizacji, rozmiary cząsteczek, lipofilność) (16, 21, 24). Wykazano, iż zdecydowana większość leków przechodzi do śliny na drodze dyfuzji, a ich zdolność do przenikania koreluje dodatnio z lipofilnością, ujemnie zaś z wielkością cząsteczki (16, 27, 34). Stwierdzono również, że zjonizowana forma związku (leku) przenika przez bariery biologiczne w znacznie mniejszym stopniu niż forma „obojetna” (19, 21). Na podkreślenie zasługuje jednocześnie fakt, iż w związku z istnieniem gatunkowych różnic w przenikaniu środków farmakologicznych z krwi do śliny, przy porównywaniu wyników eksperymentów przeprowadzonych na różnych gatunkach zwierząt i u ludzi zachować trzeba dużą ostrożność (12, 18, 24, 27).

W przeprowadzonych badaniach współczynnik dystrybucji paracetamolu między osoczem a śliną wahał się u badanych cieląt w granicach 0,859-0,897. Nieco wyższe wartości (0,960-0,985) – odnośnie do antypiryny i kofeiny, podają Janus i wsp. (11, 12).

Stwierdzony w niniejszych badaniach stopień wiązania paracetamolu z białkami osocza (Fb) kształtował się na poziomie 10%-14% aktualnego stężenia tej substancji w osoczu i wzrastał wraz z wiekiem badanych zwierząt. Wskazuje to na stosunkowo niewielkie wiązanie tego leku przez białka osoczowe. Stężenie leku we krwi jest sumą frakcji wolnej i związanej (1, 21, 24, 27). W ślinie obecna jest tylko frakcja „wolna” (16, 18, 34). Biorąc pod uwagę, że środki farmakologiczne przenikają do śliny głównie na drodze dyfuzji (12, 24, 34) ich wielkość wiązania z białkami

osocza jest pochodną różnicy między objętościami dystrybucji obliczonymi dla osocza (V_{do}) i śliny (V_{ds}): im większa jest frakcja związana, tym mniejsza V_{do} w porównaniu do V_{ds} .

Uzyskane wyniki badań (istotnie statystycznie różnice wielkości parametrów farmakokinetycznych paracetamolu określanych na podstawie stężenia w osoczu krwi i ślinie) wskazują, że ślina nie może być wykorzystywana jako materiał biologiczny służący do precyzyjnej oceny metabolizmu tego leku u cieląt.

Piśmiennictwo

- Adithan C., Danda D., Swaminathan R. P., Indhiresan J., Shashidran C. H., Bapna S. J., Chandrasekar S.: Effect of diabetes mellitus on salivary paracetamol elimination. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998, 15, 466-471.
- Adzu B., Garba M., Haruna A., Maman M., Wambebe C., Gamaniel K.: Effect of niprisan on single oral dose pharmacokinetics of paracetamol in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2001, 26, 201-204.
- Ali B. H., Cheng Z., Hadrani G., Bashir A. K., McKellar Q. A.: Comparative pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) and its sulphate and glucuronide metabolites in desert camels and goats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1996, 19, 238-244.
- Al-Obaidy S. S., Li W., McKiernan P. J., Glasgow J. F. T., Millership J.: Paracetamol and its metabolites in urine, plasma and saliva of children with liver disease. *J. Biomed. Pharm. Anal.* 1995, 24, 1033-1039.
- Anderson B.: Acetaminophen analgesia in infants. *Anesth. Analg.* 2001, 93, 1626-1627.
- Babalola C. P., Oladimeji F. A., Femi-Oyewo M. N.: Pharmacokinetics and saliva secretion of paracetamol in healthy male Nigerians. *West. Afr. J. Med.* 2004, 23, 10-14.
- Bailie M. B., Federowicz D. A., Dolce K., Kahn C., Mico B. A., Landi M. S.: Pharmacokinetics of acetaminophen, vancomycin and antipyrine in the Hanford miniature swine. *Drug. Metab. Disp.* 1987, 15, 729-730.
- Bannwarth B., Pehourcq F., Lagrange F., Matoga M., Maury S., Palisson M., Bars M.: Single and multiple dose pharmacokinetic of acetaminophen (paracetamol). *J. Rheumatol.* 2001, 28, 182-184.
- Dominguez A., Medine R., Hurtado M.: Bioequivalence study of paracetamol tablets: in vitro – in vivo correlation. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2000, 26, 821-828.
- Flouvat B., Leneveu A., Fitoussi S., Delhotal-Landes B., Gendron A.: Bioequivalence study comparing a new paracetamol solution for injection and paracetamol after single intravenous infusion in healthy subjects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2004, 42, 50-57.
- Janus K., Antoszek J.: The effect of sex and age on caffeine pharmacokinetics in cattle. *Res. Vet. Sci.* 2000, 69, 33-37.
- Janus K., Baranow-Baranowski S., Jakubowska D.: Trials to assessment of hepatic biotransformation rate in calves on the basis of the rate of antipyrine elimination from saliva. *Arch. Vet. Pol.* 1991, 31, 65-71.
- Janus K., Grochowina B., Antoszek J., Suszycki S., Muszczyński Z.: The effect of food or water deprivation on paracetamol pharmacokinetics in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2003, 26, 291-296.
- Kawalek J. C., El-Said K. R.: Maturation development of drug metabolizing enzymes in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 1990, 51, 2044-2050.
- Kearns G. L., Reed M. D.: Clinical pharmacokinetics in infants and children, a reappraisal. *Clin. Pharmacokinet.* 1999, 17, 29-52.
- Lakin K. M., Zorian E. W., Kac M. M., Aleksandrowa G. M., Efremlowa G. N.: Opredelenie soderzhaniya lekarstvennykh veshchestv v sline v klinicheskikh i eksperimentalnykh issledovaniyakh farmakokinetiki. *Farmakol. Toksikol.* 1997, 50, 93-97.
- Li X. D., Xia S. Q., He P., Han J., Wu M. C.: Conjugation metabolism of acetaminophen and bilirubin in extrahepatic tissues of rats. *Life Sci.* 2004, 74, 1307-1315.
- Lindsay L. A., Greenblatt D. J., Warren M. P., Harmatz J. S., De Cresce R., Cirales C., Le Duc B. W.: Changes in salivary antipyrine pharmacokinetic during adolescence, correlated with age, hormonal levels and Tanner stage. *Dev. Pharmacol. Ther.* 2002, 16, 194-200.
- Loft S., Haxholdt O., Dossing M.: Antipyrine clearance in children from single saliva samples. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995, 19, 698-705.
- McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D.: Pharmacokinetics of acetaminophen, antipyrine and salicylic acid in the lactating and nursing rabbit, with model predictions of milk to serum concentration ratios and neonatal dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999, 109, 149-160.
- Meffin P. J., Williams R. L., Blaschke T. F., Rowland M.: Application of salivary concentration data to pharmacokinetic studies with antipyrine. *J. Pharm. Sci.* 1997, 66, 135-141.
- Monshouwer M., Witkamp R. F., Pijpers A., Verheijden J. H. M., van Miert A. S.: Dose-dependent pharmacokinetic interaction between antipyrine and paracetamol in vivo and in vitro when administered as a cocktail in pig. *Xenobiotica* 1994, 24, 347-355.
- Monshouwer M., Witkamp R. F., Nijmeijer S. M., Pijpers A., Verheijden J. H. M., van Miert A. S. J. P. A. M.: Selective effects of bacterial infection on the hepatic clearances of caffeine, antipyrine, paracetamol and indocyanine green in the pig. *Xenobiotica* 1995, 25, 491-499.
- Mucklow J. C.: The use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Ther. Drug. Monit.* 1992, 4, 229-234.
- Muir N., Nichols J. D., Stillings M. R., Sykes S.: Comparative bioavailability of aspirin and paracetamol following single dose administration of soluble and plain tablets. *Curr. Med. Res. Opin.* 1997, 13, 491-500.
- Plewka A., Zielińska-Psujka B., Kowalówka-Zawieja J., Nowaczyk-Dura G., Plewka D., Waderkiewicz A., Kamiński M., Orłowski J.: Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P-450-dependent monooxygenase system. *Acta Bioch. Pol.* 2000, 47, 1129-1136.
- Posti J.: Drug concentration in plasma and saliva – physiological and pharmacokinetic examination. *Pharm. Acta Helv.* 1999, 54, 191-199.
- Routh J. J., Shane N. A., Arredondo E. G., Paul W. D.: Determination of N-acetyl-p-aminophenol in plasma. *Clin. Chem.* 1968, 9, 882-889.
- Sawada T., Sako K., Fukui M., Jokohama S., Hayashi M.: A new index the bioavailability of acetaminophen. *Int. J. Pharm.* 2003, 265, 55-63.
- Vesell E. S., Passananti G. T., Glenwright P. A., Dvorchik B. H.: Studies on the disposition of antipyrine, aminopyrine and phenacetin using plasma, saliva and urine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 259-272.
- Vital-Durand D., Piolat C., Soucheleau J., Baltassat P., Brazier J. L.: Pharmacocinetique de le' antipyrine. Comparaison des concentration totales, libres et salivaires. *Therapie* 1998, 43, 263-266.
- Welch R. M., De Angelis R. L., Wingfield M., Farmer T. W.: Elimination of antipyrine from saliva as a measure of metabolism in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995, 18, 249-258.
- Zielińska E.: Paracetamol. [w:] Adamska-Dyniewska H. (red.): *Terapia monitorowana*. DWN, Łódź 1994, 269-276.
- Zuidema J., Van Ginneken C. A.: Clearance concept in salivary drug excretion. Part II. *Pharm. Acta Helv.* 1993, 136-153, 1993.

Adres autora: dr inż. Beata Grochowina, ul. Orłąt Lwowskich 20, 71-337 Szczecin; e-mail: B.Grochowina@biot.ar.szczecin.pl