

Jan Błaszczak

**FARMAKOKINETYKA, METABOLIZM
I HEPATOTOKSYCZNOŚĆ PARACETAMOLU PO
NARAŻENIU POJEDYNCZYM I ŁĄCZNYM
Z TRICHLOROETYLENEM I N-ACETYLOCYSTEINĄ**

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Zielińskiej-Psuja
i przedstawiona Radzie Wydziału Farmaceutycznego
jako rozprawa doktorska

Poznań 2011

Praca częściowo finansowana w ramach projektu KBN nr 6PO5D 011 21.

Wielce Szanownej

**Pani prof. dr hab. Barbarze Zielińskiej-Psuja
za sprawowanie kierownictwa naukowego
i udzielanie mi wszechstronnej pomocy
podczas realizacji tej pracy,
a także za poświęcony czas**

składam serdeczne podziękowania

Jan Błaszczak

**Pracownikom Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
za wszelką pomoc i życzliwość jaka towarzyszyła
mi w czasie wykonywania pracy
serdecznie dziękuję**

Słowa kluczowe: paracetamol, trichloroetylen, N-acetylocysteina, monooksygenazy cyt.P-450, izoformy: CYP 2E1, CYP 2B1/2, CYP 1A2, farmakokinetyka paracetamolu, hepatotoksyczność, glutation.

Key words: paracetamol, trichloroethylene, N-acetylcysteine, monooxygenase cyt.P-450, isoforms: CYP 2E1, CYP 2B1/2, CYP 1A2, pharmacokinetics of paracetamol, hepatotoxicity, glutathione.

Skróty stosowane w pracy:

α i β	hybrydy odpowiednio stałej szybkości dystrybucji i eliminacji leku (faza α), oraz stałej szybkości eliminacji (faza β),
AIAT	aminotransferaza alaninowa,
APAP	paracetamol,
AspAT	aminotransferaza asparaginianowa,
AUC	pole pod krzywą stężenie-czas,
AUC _{całk.}	całkowite pole powierzchni pod krzywą, stanowiące sumę AUC _{obl.} i AUC _{resztk.} ,
AUC _{obl.}	pole pod krzywą otrzymane przez całkowanie w granicach 0 do ostatniego punktu pomiarowego
AUC _{resztk.}	pole resztkowe,
B.W.	masa ciała (ang. body weight),
C	stężenie leku we krwi lub osoczu,
Cl _s , Cl _{total}	klirens ogólnoustrojowy,
C _{max}	maksymalne stężenie leku we krwi w czasie t _{max} ,
COX	cyklooksigenaza kwasu arachidonowego,
CYP	izoformy cytochromu P-450 (np. CYP2A1 – pierwsza liczba arabska określa rodzinę, litera – podrodzinę, druga liczba arabska – poszczególne białko lub gen),
D	dawka leku,
DEPOT	kompleks leku związany z białkami osocza, nieaktywny farmakologicznie,
DCA	kwas dichlorooctowy,
EDRF	czynnik rozkurczający pochodzący ze śródbłonna – tlenek azotu (NO),
F	ułamek wchłoniętej dawki,
FAD	dinukleotyd flawinowy,
FMN	mononukleotyd flawinowy,
GRF	szybkość przesączania kłębuszkowego,
ICD	dehydrogenaza izocytrynianowa,
INR	wskaźnik protrombinowy,
K	stała szybkości eliminacji leku różnymi drogami,
k ₁₂	stała szybkości pierwszego rzędu dystrybucji leku z kompartmentu centralnego (1) do tkankowego (2),
k ₂₁	stała szybkości pierwszego rzędu dystrybucji leku z kompartmentu tkankowego (2) do centralnego (1),

k_{10}	stała szybkości pierwszego rzędu eliminacji leku z kompartmentu centralnego (1) na zewnątrz kompartmentu centralnego (0),
k_a	stała szybkości pierwszego rzędu wchłaniania leku (absorpcji) do krwi,
k_e	stała szybkości pierwszego rzędu wydalania leku przez nerki,
k_{nr}	stała szybkości pierwszego rzędu wydalania leku drogami pozanerkowymi,
LADME	skrót: Liberation – uwalnianie, Absorption – wchłanianie, Distribution – rozmieszczenie w poszczególnych tkankach i narządach, Metabolism – przemiany chemiczne i enzymatyczne w tkankach lub narządach, Elimination – wydalanie z organizmu (mocz, krew, kał, pot),
LDH	dehydrogenaza mleczanowa,
MCA	kwasy monochlorooctowe,
MDH	dehydrogenaza jabłczanowa,
MFO	układ enzymatyczny monooksygenaz o mieszanej funkcji,
MRT	średni czas przebywania leku w organizmie,
NAC	N-acetylocysteina,
NADP	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego,
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego,
NAPQI	N-acetylo-p-benzochinonoimina,
NSAIDs	niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang.),
NSLP	niesteroidowe leki przeciwzapalne,
OTC	leki wydawane w aptekach bez recepty lekarskiej (ang. over the counter),
OUN	ośrodkowy (centralny) układ nerwowy,
SDH	dehydrogenaza sorbitolowa,
t	czas,
$t_{0,5}$; $t_{1/2}$	biologiczny okres półtrwania,
TCA	kwasy trichlorooctowe,
t_{max}	czas, w którym osiągnięte jest stężenie maksymalne C_{max} ,
TCE	trichloroetanol,
TRI	trichloroetylen,
V_c	objętość kompartmentu centralnego,
V_d	objętość dystrybucji,
$V_{D(area)}$	objętość dystrybucji wyliczona z wielkości pola powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku w krwi,
$V_{D\beta}$	objętość dystrybucji liczona dla fazy β ,
V_{dss}	objętość dystrybucji leku po ustaleniu się równowagi dystrybucyjnej,

V_T	objętość płynów pozanaczyniowych (tkankowych),
X	masa leku we krwi (reprezentującej cały kompartment) w czasie t ,
X_C	masa leku w kompartmentcie centralnym,
$X_D, X_{(D0)}$	masa leku w żołądku (mięśniu, jelicie grubym itp.),
X_T	masa leku w kompartmentcie tkankowym,
X_{nr}	masa leku wydalona drogami pozanerkowymi w czasie t ,
X_u	masa leku wydalona do moczu w czasie t

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy.....**doktorskiej**..... p.t.:

„Farmakokinetyka, metabolizm i hepatotoksyczność paracetamolu po narażeniu pojedynczym i łącznym z trichloroetylenem i N-acetylocysteiną”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia ...**naukowego: doktor nauk farmaceutycznych**..., a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko: Jan Błaszczak

Data, podpis: 19.12.2011 r.

Spis treści

1. WSTĘP	14
2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	18
2.1. Paracetamol	18
2.1.1. Właściwości fizykochemiczne paracetamolu	18
2.1.2. Parametry farmakokinetyczne paracetamolu	19
2.1.3. Paracetamol - działanie, zastosowanie i przeciwwskazania	19
2.1.4. Preparaty paracetamolu	22
2.1.5. Wchłanianie	25
2.1.6. Dystrybucja	25
2.1.7. Biotransformacja paracetamolu	26
2.1.8. Wydalanie paracetamolu	29
2.1.9. Toksyczne działanie paracetamolu	30
2.1.10. Leczenie zatruc paracetamolem	39
2.2. N-acetylocysteina	43
2.2.1. Właściwości fizykochemiczne	43
2.2.2. Parametry farmakokinetyczne N-acetylocysteiny u człowieka	43
2.2.3. Wchłanianie, metabolizm i wydalanie	44
2.2.4. Mechanizm działania, zastosowanie oraz przeciwwskazania do stosowania	44
2.2.5. Działania toksyczne oraz niepożądane	48
2.3. Trichloroetylen	50
2.3.1. Właściwości fizykochemiczne trichloroetylenu	50
2.3.2. Źródła emisji trichloroetylenu	50
2.3.3. Wchłanianie trichloroetylenu	51
2.3.4. Dystrybucja trichloroetylenu	51
2.3.5. Biotransformacja trichloroetylenu	52
2.3.6. Wydalanie trichloroetylenu	54
2.3.7. Mechanizm działania toksycznego trichloroetylenu	55
2.3.8. Leczenie zatruc	57
2.4. Interakcje ksenobiotyków	58
2.4.1. Interakcje paracetamolu	59
2.4.2. Interakcje N-acetylocysteiny	60

2.4.3. Interakcje trichloroetyleny.	62
2.5. Parametry farmakokinetyczne w ocenie działania ksenobiotyków	63
2.5.1. Otwarty model jednokompartментowy	67
2.5.2. Otwarty model dwukompartментowy	73
2.6. Toksyczne uszkodzenia wątroby	80
2.6.1. Enzymy biorące udział w biotransformacji ksenobiotyków	80
2.6.2. Diagnostyka toksycznych uszkodzeń wątroby – metody biochemiczne	81
3. CEL PRACY, HIPOTEZY BADAWCZE	86
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	88
4.1. Schemat doświadczenia	88
4.1.1. Zwierzęta	88
4.1.2. Przebieg badań	88
4.2. Oznaczanie paracetamolu w krwi i w moczu	90
4.2.1 Metoda oznaczania paracetamolu w surowicy krwi	90
4.2.1.1. Zasada metody	90
4.2.1.2. Odczynniki	90
4.2.1.3. Tok postępowania	91
4.2.1.4. Metodyka obliczeń farmakokinetycznych.	91
4.2.2. Metoda oznaczania wolnego paracetamolu i jego metabolitu w moczu	94
4.2.2.1. Zasada metody	94
4.2.2.2. Odczynniki	95
4.2.2.3. Tok postępowania	95
4.2.2.4. Wykres wzorcowy i precyzja oznaczeń.	95
4.2.2.5. Metodyka obliczeń farmakokinetycznych.	99
4.3. Oznaczanie aktywności enzymów w surowicy krwi	99
4.3.1. Oznaczanie aktywności aminotransferazy alaninowej	99
4.3.1.1. Zasada metody	99
4.3.1.2. Odczynniki	100
4.3.1.3. Tok postępowania	100
4.3.2. Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginianowej	100
4.3.2.1. Zasada metody	100
4.3.2.2. Odczynniki	101
4.3.2.3. Tok postępowania	101
4.3.3. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej	101
4.3.3.1. Zasada metody	101

4.3.3.2. Odczynniki	102
4.3.3.3. Tok postępowania	102
4.3.4. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej	102
4.3.4.1. Zasada metody	102
4.3.4.2. Odczynniki	103
4.3.4.3. Tok postępowania	103
4.3.5. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy sorbitolowej	104
4.3.5.1. Zasada metody	104
4.3.5.2. Odczynniki	104
4.3.5.3. Tok postępowania	104
4.3.6. Uwagi	105
4.4. Badanie układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450	105
4.4.1. Izolacja frakcji mikrosomalnej wątroby	105
4.4.1.1. Odczynniki	105
4.4.1.2. Tok postępowania	105
4.4.2. Oznaczanie zawartości cytochromu P-450	106
4.4.2.1. Odczynniki	106
4.4.2.2. Tok postępowania	106
4.4.3. Oznaczanie zawartości cytochromu b₅	107
4.4.3.1. Odczynniki	107
4.4.3.2. Tok postępowania	107
4.4.4. Oznaczanie aktywności reduktazy NADPH-cytochrom c (P-450)	107
4.4.4.1. Odczynniki	107
4.4.4.2. Tok postępowania	107
4.4.5. Oznaczanie aktywności reduktazy NADH-cytochrom b₅	108
4.4.5.1. Odczynniki	108
4.4.5.2. Tok postępowania	108
4.4.6. Oznaczanie białka we frakcji mikrosomalnej wątroby.	108
4.4.6.1. Zasada metody	108
4.4.6.2. Odczynniki	108
4.4.6.3. Tok postępowania	109
4.4.7. Oznaczanie izoenzymów cytochromu P-450	109
4.4.7.1. Zasada metody	109
4.4.7.2. Tok postępowania	110
4.4.7.3. Analiza Western Blot izoform cytochromu P-450	110

4.5. Oznaczenie glutationu w wątrobie	111
4.6. Metodyka obliczeń statystycznych	111
5. WYNIKI BADAŃ	112
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW	147
6.1. Farmakokinetyka paracetamolu w surowicy.	147
6.1.1. Biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5}$)	147
6.1.2. Stężenie maksymalne (C_{max}) i czas jego osiągnięcia (t_{max})	148
6.1.3. Pole powierzchni pod krzywą (AUC)	148
6.1.4. Objętość dystrybucji w kompartmentcie centralnym (V_c).	149
6.1.5. Objętość dystrybucji w fazie stacjonarnej (V_{ss})	149
6.1.6. Objętość dystrybucji w fazie eliminacji ($V_{d\ area}$)	150
6.1.7. Klirens (Cl).	150
6.2. Kinetyka wydalania paracetamolu i jego metabolitu z moczem	153
6.3. Wyniki badań enzymatycznych	156
6.3.1. Aminotransferaza alaninowa ALAT	156
6.3.2. Aminotransferaza asparaginianowa AspAT	157
6.3.3. Dehydrogenaza mleczanowa LDH	158
6.3.4. Dehydrogenaza sorbitolowa SDH i izocytrynianowa ICD	159
6.4. Wyniki oznaczeń układu monoooksygenaz zależnych od cytochromu P-450	161
6.4.1. Cytochrom P-450	161
6.4.2. Reduktaza NADPH – cyt. P 450	162
6.4.3. Cytochrom b_5	162
6.4.4. Reduktaza NADH – cyt. b_5	163
6.5. Wyniki oznaczania izoenzymów cytochromu P-450	164
6.6. Wyniki oznaczeń glutationu w wątrobie	166
7. WNIOSKI	174
8. STRESZCZENIE	176
9. PIŚMIENNICTWO	182
10.SPIS TABEL I RYCIN	198

1. WSTĘP

W naturalnym środowisku człowieka występuje wiele różnorodnych związków chemicznych. Większość z nich, mimo bezpośredniej styczności z organizmem, nie przenika do jego wnętrza. Niektóre elementy środowiska (powietrze, woda, pożywienie) dostarczają organizmowi niezbędnych składników do metabolizmu pośredniego i umożliwiają w określonych warunkach jego istnienie. Wraz z nimi przedostają się do organizmu substancje obce, ksenobiotyki, które mogą wywierać działanie szkodliwe. Często również substancje te są wprowadzane celowo do organizmu jako leki, używki, a nawet trucizny.

Samoleczenie staje się coraz popularniejsze. Producenci zabiegają, aby coraz więcej leków mogło być sprzedawanych bez recepty, co zwiększa ich dostępność. Często są to preparaty zawierające substancje czynne w tych samych dawkach, co ordynowane przez lekarza, ale w opakowaniach o mniejszej liczbie tabletek. Nie zmienia to jednak faktu, że działania niepożądane i ewentualne interakcje, jakie mogą zachodzić między lekami (ksenobiotykami), są identyczne.

Takim ksenobiotykiem jest paracetamol (acetaminophen) należący do pochodnych p-aminofenolu. Jest on aktywnym metabolitem fenacetyny o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Paracetamol wchodzi w skład ponad 300 preparatów farmaceutycznych o różnych nazwach, nie zawsze wskazujących na jego zawartość (APAP, Acenol, Coldrex, Effergal, Panadol). Obecnie praktycznie każda znacząca firma farmaceutyczna wytwarza lek w skład którego wchodzi paracetamol. Niewątpliwą zaletą paracetamolu jest szybkość działania, wysoka skuteczność, znikoma toksyczność i bardzo rzadko występujące skutki uboczne. Zalety te spowodowały, iż stał się dostępny bez recepty również poza siecią aptek. Dodatkowo reklama prasowa i telewizyjna sprawiła, że paracetamol jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych, popularnością zbliżonym do aspiryny. Powszechna dostępność przyczyniła się jednak do wzrostu występowania nieumyślnych zatruc w następstwie przedawkowania paracetamolu.

Paracetamol został zsyntezowany w 1877 roku przez Meringa i po raz pierwszy zastosowany przez niego w leczeniu klinicznym w 1893 roku. Prawdziwa kariera tego związku rozpoczęła się jednak dopiero w roku 1948, gdy został zidentyfikowany przez Brodiego i Axelorda jako aktywny metabolit acetanilidu i fenacetyny (odkrytych odpowiednio w 1886 i 1887 roku). Przeprowadzone badania wykazały, że kliniczne efekty tych dwóch związków wynikają z ich biotransformacji w organizmie do paracetamolu. Prace Brodiego i Axelorda pozwoliły na wprowadzenie paracetamolu do lecznictwa w postaci 500 mg tabletek. Od roku 1950 w Stanach Zjednoczonych lek ten zastąpił fenacetynę, a od roku 1955 jest powszechnie dostępny bez recepty, ponieważ umieszczono go w wykazie „over-the-counter” (tzw. OTC – lek

do sprzedaży odręcznej). W Wielkiej Brytanii paracetamol wprowadzono do sprzedaży w roku 1956 początkowo jako lek na receptę, a od roku 1963 jako lek OTC (Arana i wsp., 2001; Mofenson i wsp. 1998; Prescott, 2000).

W roku 1966 opisano w Anglii pierwszy przypadek występowania zmian martwiczych w wątrobie jako następstwa przedawkowania paracetamolu w celach samobójczych. Od tego czasu liczba opisanych zatruć i przypadków śmiertelnych występujących po zażyciu paracetamolu stale wzrasta. Przyczyniło się to do poszukiwania wybiórczych odtrutek skutecznych w leczeniu osób, które przedawkowały lek. Jedną z takich odtrutek jest N-acetylocysteina (NAC), która w organizmie ulega biotransformacji do cysteiny będącej ważnym prekursorem wewnątrz komórkowej syntezy glutationu, strategicznego czynnika w ochronie organizmu przed oksydantami. Cysteina stymuluje i zwiększa produkcję endogennego glutationu zapobiegając znacznemu obniżeniu jego stężenia w wątrobie. Glutation jest niezbędny do inaktywacji toksycznego metabolitu paracetamolu – N-acetylo-p-benzochinonoiminy (NAPQI) (Betten i wsp., 2007; Prescott, 2000; Prescott i wsp., 1979; Rumack i wsp., 1981).

W Polsce paracetamol zyskał na znaczeniu dopiero w latach 90 ubiegłego stulecia. Według aktualnych danych Wielkopolskiego Centrum Medycyny Pracy w Poznaniu, liczba osób leczonych z powodu zatrucia paracetamolem od 1994 r. wykazuje stałą tendencję zwyżkową. Ponad 90% tych przypadków ma jednak charakter samobójczy.

Istotnym osiągnięciem farmakologii ogólnej jest powstanie nowej subdyscypliny – farmakokinetyki, zajmującej się matematycznym określeniem losów leków w ustroju (*farmakon-lek, kinesis-ruch*). Obliczenia farmakokinetyczne opierają się na założeniu, że lek, który został wchłonięty do krwi, ulega równomiernemu rozmieszczeniu w określonej tkance i narządzie zwanym kompartmentem. Wyróżniamy kompartment centralny, którym jest krew, i kompartmenty obwodowe (tkankowe), które stanowią różne tkanki. W każdym przedziale czasowym stężenie leku w różnych częściach kompartmentu jest takie samo. Drugim ważnym pojęciem jest biodostępność (dostępność biologiczna) – ułamek leku dostający się do krążenia ogólnego z miejsca podania. Pojęcie biodostępności nie jest równoważne z wchłanianiem, ponieważ po wchłonięciu np. z jelit, niektóre leki podlegają efektowi pierwszego przejścia, podczas którego część leku, przed osiągnięciem kompartmentu centralnego, jest metabolizowana w ścianie jelit lub wątrobie (Anderson i wsp., 2000; Danek, 1979, Feldman, 1975; Forrest i wsp., 1993; Herman i Skibińska, 1992).

Cechą współcześnie występujących zagrożeń środowiskowych i zawodowych jest narażenie łączne. Wiele substancji obecnych w środowisku może zmienić farmakokinetykę, metabolizm i farmakodynamiczne działanie paracetamolu. W badaniach wstępnych, przeprowadzonych w ramach pracy magisterskiej stwierdzono, że jedną z takich substancji jest

trichloroetylen (TRI) – rozpuszczalnik często stosowany w przemyśle i życiu codziennym (Błaszczak, 1999). Zarówno trichloroetylen jak i paracetamol podlegają biotransformacji za pośrednictwem układu monoooksygenaz zależnych od cytochromu P-450. W przypadku przedawkowania, główna droga biotransformacji APAP, jaką jest sprzężanie z kwasem glukuronowym i siarkowym, ulega wysyceniu, co prowadzi do nasilenia przemian zachodzących za pośrednictwem układu cyt. P-450 (zwłaszcza izoform: CYP 1A1, CYP 2B1, CYP 2E1, CYP 1A2 oraz CYP 3A1 i CYP 3A2) i wzmożonego tworzenia N-acetylo-p-benzochinonoiminy (NAPQI), która szybko wyczerpuje rezerwy endogennego glutationu. W konsekwencji w wątrobie gromadzą się duże ilości wolnego i toksycznego metabolitu, wykazującego zdolność łączenia się z makrocząsteczkami komórkowymi i w efekcie powodowania zmian histopatologicznych w centralnej części zrazików wątrobowych (Dekant i wsp., 1986; Griffin i wsp., 1998).

Drugi z badanych związków - trichloroetylen (TRI) jest szeroko stosowanym rozpuszczalnikiem organicznym ulegającym biotransformacji głównie w mikrosomach hepatocytów, w mniejszym stopniu w śledzionie i płucach, przy udziale różnych izoform cytochromu P-450. W przemianach tych główną rolę odgrywa CYP 2E1, a także CYP 2B1/2 i CYP 1A1/2, izoformy zbieżne z izoformami biorącymi udział w biotransformacji paracetamolu. Podczas przemian TRI tworzony jest epoksyd, ulegający detoksykacji w reakcji z glutationem. W przypadku narażenia łącznego detoksykacja aktywnych metabolitów paracetamolu i TRI może nasilać wyczerpywanie rezerw endogennego glutationu (Cai i wsp., 2001; Fisher i wsp. 1991).

N-acetylocysteina (NAC, acetylocysteina) jest pochodną naturalnego aminokwasu L-cysteiny, ulegającą w wątrobie deacetylacji do cysteiny – czynnego metabolitu, diacetylocysteiny i cystyny. Mechanizm detoksykacyjnego działania NAC związany jest z powstającą w trakcie jej biotransformacji cysteiną, która stymuluje i nasila produkcję endogennego glutationu zapobiegając wyczerpaniu się jego rezerw, a tym samym obniżeniu stężeń w wątrobie i w płucach. Ponadto N-acetylocysteina korzystnie wpływa na poziom enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationu) oraz działa depresyjnie na aktywność enzymów związanych z cytochromem P-450. Jak już wspomniano, NAC jest swoistą odtrutką podawaną w zatruciach paracetamolem, a największą skuteczność wykazuje po podaniu do 10 – 16 godzin po spożyciu leku. Brak jest danych odnośnie skuteczności NAC w leczeniu zatruc mieszanym (Dawson i wsp., 1984; Heard, 2008; Hoffer i wsp., 1996).

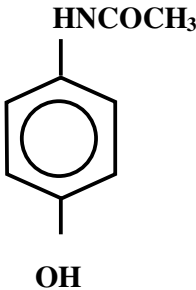
Celem niniejszej pracy było określenie parametrów farmakokinetycznych paracetamolu oraz ocena wpływu łącznego narażenia na biotransformację, po narażeniu pojedynczym i łącznym z trichloroetylenem i N-acetylocysteiną. Dane te pozwolą na prześledzenie losów ksenobiotyków w organizmie i określenie ich ewentualnych wzajemnych oddziaływań.

Natomiast oznaczenie glutationu i składników układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 powinno umożliwić ocenę sprawności tych układów w przypadku narażenia łącznego oraz przydatności stosowania NAC.

2. Część teoretyczna

2.1 Paracetamol

2.1.1. Właściwości fizykochemiczne paracetamolu

nazwa chemiczna	: N-acetylo-p-aminofenol
synonimy	: APAP, PAR, paracetamol, acetaminophen, 4'-hydroksyacetanilid, p-acetamidophen, N-(4-hydroksyfenylo)acetanilid, Termidor.
wzór sumaryczny	: $\text{CH}_3\text{CONHC}_6\text{H}_4\text{OH}$
wzór strukturalny	:  OH
postać	: bezbarwne kryształki o gorzkim smaku, bez zapachu
masa cząsteczkowa	: 151,16
pK _a (-OH)	: 9,5
rozpuszczalność	: woda 1:70 alkohol 1:70 NaOH 1:15 dobrze rozpuszczalny w acetonie i octanie etylu; słabo w chloroformie, dichlorometanie, eterze; w benzenie nie rozpuszcza się.
temperatura topnienia	: 169 - 171°C
otrzymywanie	: na drodze syntezy chemicznej z fenacetyny.

2.1.2. Parametry farmakokinetyczne paracetamolu

absorpcja po podaniu <i>p.o.</i>	: > 95%
metabolizm presystemowy	: 20%
okres półtrwania	
zakres	: 1,5 – 3,0 h
wartość przeciętna	: 2,3 h
objętość dystrybucji	: 0,9 dm ³
wiązanie z białkami osocza	: < 20%
po przedawkowaniu	: do 40%
pierwsze objawy zatrucia	: po spożyciu 150 mg/kg m.c. (tj. 10,5g/70 kg m.c.)

2.1.3. Paracetamol - działanie, zastosowanie i przeciwwskazania

Paracetamol (APAP) jest aktywnym metabolitem fenacetyny (pochodna p-aminofenolu) o silnym działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym (Chomicka, 1998; Jodynis-Liebert i wsp., 1995).

APAP jest często zaliczany do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSLP, NSAIDs), pomimo że efekt terapeutyczny i skutki uboczne są odmienne od występujących po podaniu typowych NSLP. Mechanizm działania przeciwbólowego paracetamolu związany jest z selektywnym hamowaniem cyklooksygenazy kwasu arachidonowego (COX-2), zlokalizowanej w centralnym układzie nerwowym (OUN). Paracetamol nie odgrywa większego wpływu na COX-2 zlokalizowaną w układzie obwodowym. Konsekwencją tego jest obniżenie poziomu prostaglandyn w OUN i w efekcie zmniejszenie wrażliwości organizmu na działanie mediatorów bólu (kininy, serotoniny) oraz brak obwodowego działania przeciwzapalnego. APAP może również przyspieszać przekształcanie prostaglandyny PGG₂ (czynnik bólu i obrzęku w ostrych stanach zapalnych) do PGH₂. Z przemiany tej wynika skuteczność leku w ostrych stanach zapalnych i jej brak w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Potwierdzeniem badań *in vitro* są obserwacje kliniczne, które wykazały, że terapeutyczne dawki paracetamolu nie obniżają poziomu prostaglandyn PGE₂ w płynie maziowym i PGF_{2α} w moczu. Badania te sugerują, że specyficzny profil farmakologiczny i analgetyczne właściwości paracetamolu są spowodowane

jego działaniem ośrodkowym i hamowaniem mózgowej COX (Mrozikiewicz, 1984; Pawełczyk, 1986; Tanaka i wsp. 2000).

Ośrodkowe działanie leku może również wynikać z oddziaływania na układ serotonergiczny, o czym świadczy osłabienie działania przeciwbólowego paracetamolu po podaniu dordzeniowym 5,7-dihydroksytryptaminy uszkodzającej zstępujące drogi serotonergiczne oraz brak tego działania po podaniu p-chlorofenyloaminy obniżającej poziom serotoniny (Ornaghi i wsp., 1993). Paracetamol może również hamować rdzeniową substancję P (silny mediator bólu) i obniżać syntezę tlenku azotu (NO) zaangażowanego w rdzeniową hiperalgezę indukowaną przez NMDA (N-metylo-D-asparaginian) i substancję P. Udowodniono także hamowanie przez paracetamol pobudzeń bólowych w chemoreceptorach wrażliwych na bradykininę (Björkman i wsp., 1994; Fernandez i wsp., 1977; Fisher i wsp., 1991; Guzman i Lim, 1967; Lim i wsp., 1964). Stosując agonistów i antagonistów różnych receptorów (tropisteron, nalokson, indometacyna, johimbina) wykazano, że APAP nie wiąże się z receptorami adrenergicznymi (α_1 , α_2 , β), muskarynowymi, adenozynowymi (A_1 i A_2), dopaminowymi (D_1 i D_2), histaminowymi (H_1), opioidowymi (μ , κ , δ) oraz benzodiazepinowymi i NMDA (Morgan i wsp., 1984; Mrozikiewicz, 1984; Pawełczyk i Zając, 1995; Tanaka i wsp., 2000). Natomiast w mechanizmie działania APAP dużą rolę mogą odgrywać rdzeniowe receptory 5-HT₃, po których zablokowaniu, poprzez dordzeniowe podanie tropisteronu, następuje zahamowanie antynocyceptywnego działania paracetamolu (Ornaghi i wsp., 1993).

Badania ostatnich lat wskazują na obecność trzeciej cyklooksygenazy – COX-3. Jest ona kodowana przez m-RNA zapisany w tym samym genie co COX-1, jednak różniący się ilością intronów i eksonów. Chandrasekharan i wsp. wykazali, że COX-3 znajduje się w niektórych obszarach kory mózgowej i jest bardziej wrażliwa na działanie paracetamolu niż COX-1 i COX-2, czym można obecnie tłumaczyć ośrodkowe przeciwbólowe i przeciwgorączkowe działanie leku. Aktywność tego enzymu nie jest hamowana przez kwas acetylosalicylowy (Buckley i wsp., 1999; Chandrasekharan i wsp., 2002; McMurtry i wsp., 1978).

Działanie przeciwgorączkowe paracetamolu związane jest z obecnością pierścienia aminobenzenowego, odpowiedzialnego za rozszerzenie obwodowych naczyń krwionośnych, co przejawia się zwiększeniem przepływu krwi przez skórę, poceniem się i utratą ciepła (Diaz i wsp., 1990; Flower i Vane, 1972; Mazer i Perrone, 2008). APAP blokuje również syntezę i uwalnianie prostaglandyn oraz endogennych pirogenów, natomiast nie wywołuje zmian prawidłowej temperatury ciała (Bourdeaux i Bewley, 2007; Fernandez i wsp., 1977, Radzikowski i Mrozińska, 1998).

Po przyjęciu leku w jednorazowej dawce doustnej 10 mg/kg m.c. efekt przeciwgorączkowy pojawia się, podobnie jak działanie przeciwbólowe, po 30 minutach,

osiągając szczyt pomiędzy 2 – 3 h i trwa do 6 h. Obserwowane obniżenie temperatury ciała wynosi ok. 1,6 °C (Chomicka, 1998; Radzikowski i Mrozińska, 1998).

Paracetamol nie wykazuje działania przeciwzapalnego, gdyż nie hamuje syntezy prostanoidów w tkankach obwodowych (Raińska-Giezek, 1995).

Wskazaniem do stosowania paracetamolu jest podwyższona temperatura ciała oraz bóle mięśniowe, stawowe, kostne, zębów, nerwobóle, pleców, barku, głowy (także migrenowe), bolesne miesiączkowanie, przeziębienia, stany grypopodobne, półpasiec, stany skurczowe przewodu pokarmowego. W dawce dobowej ok. 6 g APAP jest skuteczny w zwalczaniu bólu w terapii chorób nowotworowych i w łagodzeniu bólów pooperacyjnych (Betten i wsp., 2007; Chruściel i Gliński, 1992; Janiec i Krupińska, 1995). Zalecane jest stosowanie APAP również u osób z owrzodzeniem żołądka i krwawieniem z przewodu pokarmowego. Może być także stosowany u chorych z astmą, cukrzycą (może jednakże wzmagać działanie doustnych leków przeciwcukrzycowych), nadciśnieniem, żylakami przełyku lub zapaleniem przełyku wywołanym refluksem żołądkowo jelitowym. Ponadto może być przyjmowany przez pracowników obsługujących urządzenia mechaniczne, gdyż nie wywołuje senności i nie zaburza sprawności psychofizycznej (Burdan, 1992; Chodera i Herman, 1993; Chruściel i Gliński, 1992; Fujimura i wsp., 1995; Newton i wsp., 1982, Tanaka i wsp., 2000).

Paracetamol w dawkach terapeutycznych jest lekiem bezpiecznym, dlatego stanowi alternatywę dla innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W porównaniu do pochodnych pirazolonu, które mogą uszkadzać szpik (metamizol, aminofenazon), jest lekiem znacznie mniej toksycznym. APAP wykazuje podobną jak salicylany siłę działania przeciwbólowego, jednak w mniejszym stopniu uszkadza błonę śluzową przewodu pokarmowego, nie wpływa na płytki krwi, nie upośledza wydalania kwasu moczowego, a także nie wywołuje zespołu Reye'a u dzieci. W przeciwieństwie do salicylanów, może być stosowany u dzieci w postaci płynnej już w pierwszym miesiącu życia, a na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż toksyczność APAP u dzieci jest mniejsza niż u dorosłych. Jest to spowodowane nie osiągnięciem jeszcze pełnej aktywności monoooksygenaz wątrobowych, co ogranicza powstawanie toksycznego metabolitu. U dzieci powyżej 3-go miesiąca życia zaleca się podawanie APAP w dawkach 10-15 mg/kg m.c. *per os* oraz 15-20 mg/kg m.c. *per rectum* (Burdan, 1992; Dollery i wsp., 1999; Estabrook i wsp., 1978; Jackson i wsp., 1984; Janiec i Krupińska, 1995; Kostowski i Kubikowski, 1991; Mohandas i wsp., 1981; Necki, 1996; Ośrodek informacji Naukowej Polfa, 1995; Raińska-Giezek, 1996; Rumack, 1984; Siembab, 1993; Thibault i wsp., 1991).

APAP jest najczęściej stosowanym lekiem przeciwbólowym i przeciwgorączkowym u kobiet w ciąży, a dotychczasowe wieloletnie obserwacje wskazują, że nie działa uszkadzająco na

plód, nawet w przypadkach przedawkowania w I trymestrze ciąży (Mazer i Perrone, 2008; Pearson, 1978; Stokes, 1982; Thibault i wsp., 1991).

Paracetamol może być stosowany również przez matki karmiące piersią w doraźnym zwalczaniu bólu. Wykazano, że do organizmu noworodka przenika zaledwie 1 % dawki przyjętej przez matkę. Są to znikome ilości i nie mają wpływu na stan zdrowia dziecka (Mazer i Perrone, 2008).

Nadwrażliwość na paracetamol jest opisywana bardzo rzadko, a związane z nią objawy takie jak: zapalenie skóry, pokrzywka, gorączka polekowa, leukopenia, neutropenia, spadek ciśnienia, przeważnie są łagodne. Wystąpienie któregoś z w/w objawów jest wskazaniem do natychmiastowego odstawienia leku (Tanaka i wsp., 2000).

U chorych ze znacznie upośledzoną funkcją wątroby (głównie u pacjentów z poalkoholowymi schorzeniami wątroby) lub/i nerek (ostre i odmiedniczkowe zapalenie nerek) zaleca się przyjmowanie leku jedynie pod stałą kontrolą lekarską. Paracetamol nie powinien być także stosowany u osób przyjmujących równocześnie leki indukujące aktywność enzymów wątrobowych (głównie cyt. P-450) takich jak fenobarbital (np. z powodu padaczki), czy rifampicyna (gruźlica), gdyż mogą one nasilać tworzenie hepatotoksycznego metabolitu paracetamolu – N-acetylo-p-benzochinonoiminy. Nie zaleca się stosowania APAP po przebytych krwotokach, żółtaczce, nadciśnieniu tętniczym, niedokrwistości, wrodzonym braku dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz wrodzonym niedoborze reduktazy methemoglobinowej (Dollery i wsp., 1999; Mazer i Perrone, 2008; Newton i wsp., 1982; Towheed i wsp., 2003; Bray i wsp., 1992; Chomiczka, 1998; Kostowski i Kubikowski, 1991; Laurence i Benett, 1987).

Przeciwwskazaniem do stosowania APAP jest także skrajne niedożywienie, w konsekwencji, którego występuje niedobór glutationu, niezbędnego w procesach detoksykacyjnych (Dallner, 1974; Emoto i wsp., 2000; Lynch i Robertson, 2004; Eriksson i wsp., 1992; Nadolski, 1995).

2.1.4. Preparaty paracetamolu

Paracetamol jest jednym z najczęściej przepisywanych i zalecanych leków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych. Od połowy lat 80 ubiegłego wieku liczba preparatów zawierających paracetamol stale wzrasta. Paracetamol występuje pod różnymi nazwami handlowymi, pojedynczo lub w skojarzeniu z innymi substancjami wzmagającymi jego siłę i spektrum działania (kofeina, kodeina, propyfenazon, pseudoefedryna, dekstrometorfan,

feniramina, kwas askorbinowy). Dostępny jest w formie: kapsułek, tabletek, tabletek musujących, syropów, czopków, proszku do przygotowania napoju lub iniekcji.

W ostatnim okresie, z powodu słabej rozpuszczalności samego paracetamolu w wodzie, na rynku farmaceutycznym pojawiły się proleki paracetamolu przeznaczone do stosowania dożylnego. Wprowadzono do obrotu pochodną – ester dietyloaminooctowy paracetamolu stosowany w postaci iniekcji dożylnych i charakteryzujący się mniejszą toksycznością niż związek macierzysty. Alternatywną formą paracetamolu do podawania dożylnego jest propacetamol - bioprekursor paracetamolu. Z innego proleku jakim jest proparacetamol uwalniany jest paracetamol w proporcji 2:1, tzn. z dwóch gramów proparacetamolu uwalniany jest jeden gram paracetamolu. Preparat ten jest dostępny np. we Francji. Innym przykładem jest benorylat – ester paracetamolu i kwasu acetylosalicylowego, podawany tylko dwa razy dziennie. Po wchłonięciu dochodzi do rozerwania wiązań estrowych, co prowadzi do stopniowego uwalniania paracetamolu i kwasu acetylosalicylowego. Koszt leku jest jednak stosunkowo wysoki, a potencjalne działania niepożądane są typowe dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych (Meredith i wsp., 1980).

Przykłady preparatów paracetamolu zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Wybrane preparaty złożone paracetamolu.

Paracetamol	<i>Analget</i>	Paracetamol	200 mg
		Propyfenazon	200 mg
		Kofeina	50 mg
	<i>Cefalgin, Saridon</i>	Paracetamol	250 mg
		Propyfenazon	150 mg
		Kofeina	50 mg
	<i>Coldrex, Coldrex HotRem</i>	Paracetamol	500 mg
		Fenylefryna	5 mg
		Kofeina	25 mg
		Wodzian terpiny	20 mg
	Kwas askorbowy	30 mg	
<i>Dolores</i>	Paracetamol	500 mg	
	Kofeina	50 mg	
<i>Efferalgan Codeine</i>	Paracetamol	500 mg	
	Fosforan kodeiny	30 mg	
<i>Fervex</i>	Paracetamol	500 mg	
	Kwas askorbowy	200 mg	
	Maleinian feniraminy	25 mg	
<i>Gripex, Gripex Max</i>	Paracetamol	325/500 mg	
	Pseudoefedryna	30 mg	
	Dekstrometorfan	10/15 mg	
<i>Panadol Extra</i>	Paracetamol	500 mg	
	Kofeina	65 mg	
<i>Saridon</i>	Paracetamol	250 mg	
	Propyfenazon	250 mg	
	Kofeina	50 mg	
<i>Tabcin impakt</i>	Paracetamol	250 mg	
	Dekstrometorfan	10 mg	
	Pseudoefedryna	30 mg	
	Doksylamina	6,25 mg	

2.1.5. Wchłanianie

Paracetamol w dawkach terapeutycznych szybko i prawie całkowicie wchłania się z jelit (ok. 95% dawki) na drodze dyfuzji biernej. Absorpcję zmniejszają m.in. dieta wegetariańska oraz pokarm o dużej zawartości węglowodanów. Szybkość absorpcji zależy od powierzchni kontaktu leku z błoną śluzową przewodu pokarmowego oraz stopnia jego ukrwienia (Diaz i wsp., 1990; Hoffer i wsp., 1996; Newton i wsp., 1982; Raińska-Giezek, 1995; Villagrasa i wsp., 1997). Ilość paracetamolu przenikającego do krążenia ogólnego jest proporcjonalna do podanej dawki i zmniejsza się z 90% (dawka 1000 do 2000 mg) do 70% (dawka 500 mg). Paracetamol lepiej dyfunduje z podłoża lipofilnego niż hydrofilnego. Podany w postaci czopków (doodbytniczo) wykazuje mniejszą dostępność biologiczną, określaną jako 2/3 dostępności po podaniu doustnym, jak również dłuższy czas, po którym osiąga stężenie maksymalne (Emeigh Hart i wsp., 1994; Forrest i wsp., 1993).

Maksymalna dawka dobową paracetamolu u osób dorosłych nie powinna przekroczyć 4,0 g. U dzieci starszych, powyżej 3 miesięcy, stosuje się dawkę 10 mg/kg m.c. U noworodków dawkę ustala się indywidualnie. Za dawkę śmiertelną dla dorosłych uważa się 20-25g (Bessems i wsp., 1996; Chodera i Herman, 1993).

2.1.6. Dystrybucja

Biodostępność paracetamolu po przyjęciu drogą pokarmową wynosi 80-90% natomiast po podaniu doodbytniczym 62-88% podanej dawki (Wallace, 2004). Paracetamol łatwo przenika przez barierę krew-mózg i łożysko (Burdan, 1992).

Stężenie maksymalne leku w surowicy krwi osiągane jest, w zależności od jego postaci, w czasie od 0,5 do 2 h (Diaz i wsp., 1990; VSP DI, 1998). Po jednorazowym podaniu doustnym APAP w dawce 650 mg, maksymalne stężenie w surowicy wynosi 5-20 mg/dm³ i osiągane jest w czasie od 0,5 do 1 h. Okres biologicznego półtrwania paracetamolu $t_{0,5}$ wynosi 1-4 h (McDaniel i wsp., 2007; VSO DI, 1998). Stężenia paracetamolu w osoczu w zakresie 10 do 20 mg/dm³ są uznawane za skuteczne terapeutycznie.

APAP stosunkowo słabo wiąże się z albuminami osocza, a stopień wiązania zależy od stężenia leku we krwi. W stężeniach do 60 mg/dm³, paracetamol słabo łączy się z białkami osocza (do 20%), w wyższych stężeniach stopień wiązania może dojść do 40% (Diaz i wsp., 1990; Feldman, 1975; Mazer i Perrone, 2008; Radzikowski i Mrozińska, 1998; Raińska-Giezek, 1995; Tanaka i wsp., 2000; Ziółkowski i Ziółkowska, 1998).

Objętość dystrybucji paracetamolu wynosi 0,9 dm³/kg (Diaz i wsp., 1990).

2.1.7. Biotransformacja paracetamolu

Biotransformacja paracetamolu zachodzi głównie w wątrobie, szczególnie w III strefie zrazika wątrobowego, gdzie podlega kilkutorowym przemianom. Po podaniu paracetamolu w dawkach terapeutycznych lek sprzęgany jest głównie z kwasem glukuronowym (55%) przy udziale transferazy glukuronowej oraz z kwasem siarkowym (30%) przy udziale fenylosulfotransferazy, w mniejszym stopniu z cysteiną (4%). Około 2% dawki jest wydalane w postaci niezmienionej. U dorosłych i u starszych dzieci przeważa sprzęganie z kwasem glukuronowym, natomiast u dzieci w wieku 3 – 9 lat większość dawki jest wydalana po sprzęgnięciu z kwasem siarkowym. Powstałe metabolity, niezależnie od wieku, są eliminowane z moczem przez nerki (Dollery i wsp., 1999; Mazer i Perrone, 2008; Mohandas i wsp., 1981; Ott i wsp., 1996).

Tab. 2. Współczynnik frakcji glukuronidu do siarczanu w przemianie paracetamolu u różnych grup wiekowych (Chomicka, 1998).

Wiek	Noworodki	3 – 9 lat	12 lat	Dorośli
Współczynnik glukuronidy/siarczany	0,34	0,75	1,61	1,80

Około 3-5% przyjętej dawki leku ulega biotransformacji przy udziale wątrobowych enzymów mikrosomalnych zależnych od cytochromu P-450, tzw. układ mikrosomalnych monoooksygenaz o funkcji mieszanej (MFO) (Diaz i wsp., 1990).

Wszystkie końcowe produkty biotransformacji paracetamolu są nieaktywne, natomiast toksyczny jest pośredni metabolit arylowy – N-acetylo-p-benzochinonoimina (NAPQI) powstająca w wyniku hydroksylacji grupy acetamidowej i następnie utlenienia do formy chinonoiminowej przy udziale cytochromu P-450. Badania z użyciem ludzkich mikrosomów wątrobowych wykazały, że za powstanie tego metabolitu odpowiada głównie izoforma CYP 1A1 indukowana przez β -naftoflawon. Indukowana fenobarbitem izoforma CYP 2B1 odpowiedzialna jest za biotransformację paracetamolu do 3-hydroksyparacetamolu. Isoforma CYP 2E1 indukowana etanolem odgrywa istotne znaczenie u alkoholików, u których wzrasta toksyczność APAP (Chandrasekharan, 2002; Lauterburg i Velez, 1988; Prescott, 2000; Whitcomb i Block, 1994). W

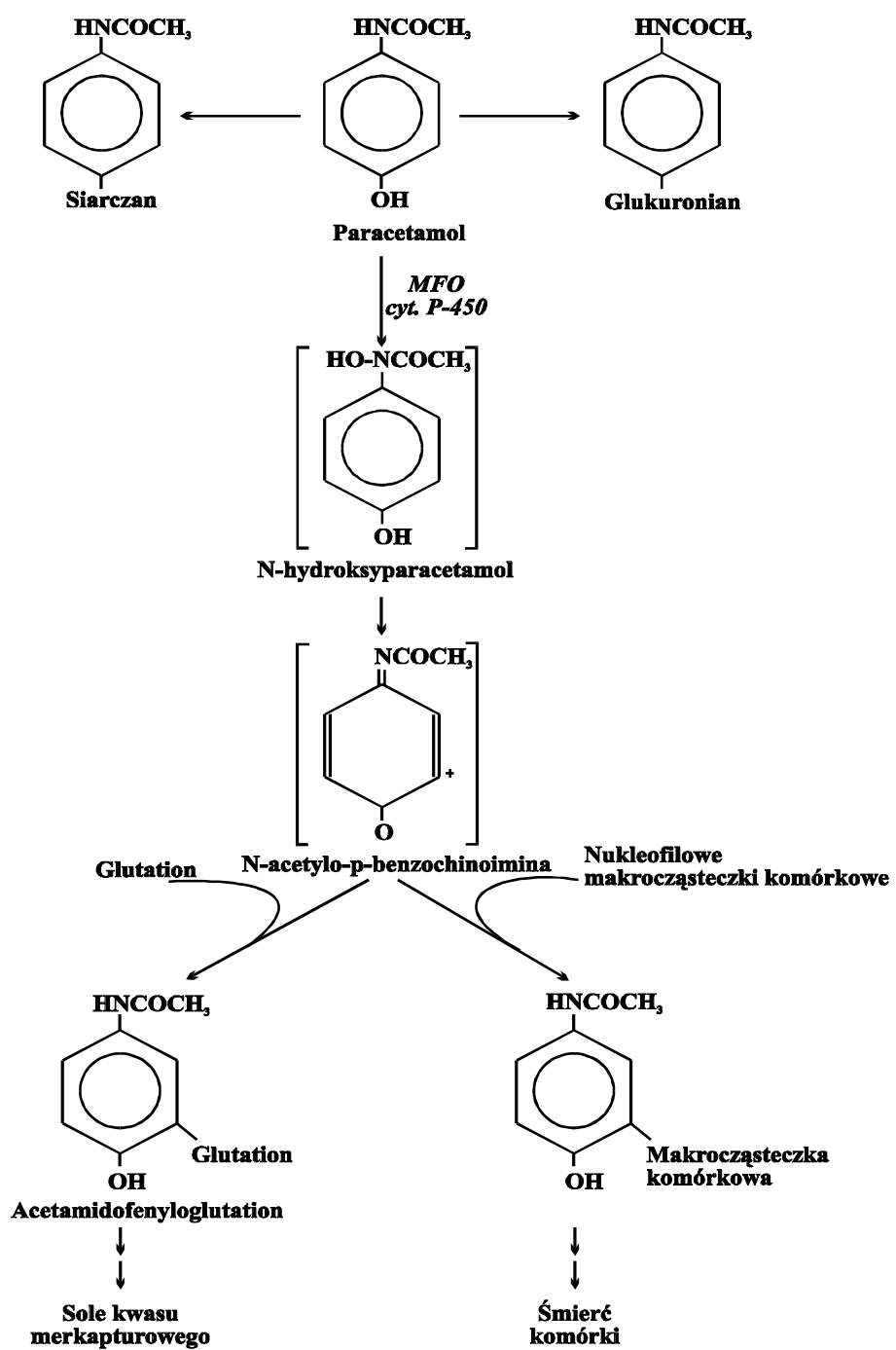
przemianach paracetamolu do NAPQI biorą udział także izoformy CYP 1A2 oraz CYP 3A1 i CYP 3A2 (Dai i Cederbaum, 1960; Dollery i wsp., 1999; Szostek-Gaweł, 2002).

W rdzeniu nerek, gdzie aktywność układu monooksygenaz jest mniejsza niż w wątrobie, biotransformacja paracetamolu do NAPQI przebiega przy udziale syntazy prostaglandynowej. Niewielka ilość leku może zostać przekształcona w procesie deacetylacji do nefrotoksycznego p-aminofenolu (Dimova i Stoytcher, 1994; Dollery i wsp., 1999; Dyderski, 1997; Green i wsp., 1998; Mazer i Perrone, 2008; Raińska-Giezek, 1995; Siembab, 1993; Tanaka i wsp., 2000; VSP DI, 1998).

Powstała NAPQI ulega detoksykacji w wątrobie przez wiązanie się z endogennym glutationem do 3-(S-glutationylo)-paracetamolu, wydalanego następnie z moczem oraz żółcią w postaci nietoksycznych związków z kwasem merkapturowym i cysteiną (Filipek, 1997; Flower i Vane, 1972; Green i wsp., 1998; Mazer i Perrone, 2008; Raińska-Giezek, 1995; Tanaka i wsp., 200).

Opisany schemat metabolizmu przedstawiono na Ryc.1.

Ryc. 1. Biotransformacja paracetamolu (Tanaka i wsp., 2000).



2.1.8. Wydalanie paracetamolu

Paracetamol po podaniu w jednorazowej dawce terapeutycznej jest wydalony w ciągu 24 godzin, głównie z moczem w postaci estrów siarczanowych i glukuronowych (90-95%), a także w formie cysteinianów i merkaptopurynianów (5-10%) z żółcią. Około 3% leku wydalane jest w postaci niezmienionej. Okres półtrwania leku wynosi 3 – 3,3 h u dorosłych i 1,5 – 4,5 h u dzieci (Jodynis-Liebert, 1995). Klirens nerkowy paracetamolu wynosi 10 cm³/min. i nie zależy od pH moczu.

Udział procentowy wolnego paracetamolu i jego metabolitów wydalanych z organizmu różnymi drogami, zestawiono w tabeli 3 (Diaz i wsp., 1990).

Tab.3. Procentowy udział paracetamolu i jego metabolitów wydalanych z moczem i żółcią.

Metabolit wydalany z moczem	Wydalenie w (%)
Paracetamol wolny	1-4
<u>Proste związki sprzężone:</u> Glukuronian paracetamolu Siarczan paracetamolu	40-60 20-30
<u>Metabolity utlenione</u> Sprzężone z resztą siarczanową: Paracetamol-3-cysteina Paracetamol-3-merkaptan	5-10
<u>Pochodne katecholowe:</u> Siarczan 3-hydroksy-paracetamolu Siarczan 3-metoksy-paracetamolu Glukuronian 3-metoksy-paracetamolu	5-10
Metabolit wydalany z żółcią	Wydalenie w (%)
Cysteiniany	82.2
Glukuronian paracetamolu	16.4

2.1.9. Toksyczne działanie paracetamolu

Pierwszy przypadek zmian martwiczych wątroby spowodowanych przedawkowaniem paracetamolu odnotowano w 1966 roku w Anglii. Od tego czasu liczba zatruc i wypadków śmiertelnych związanych z przedawkowaniem paracetamolu stale wzrasta. Wynika to m.in. z ogromnej ilości preparatów farmaceutycznych zawierających ten lek, jak również ich łatwej dostępności (Fisher i wsp., 1991; Gilbertson i wsp., 1996; Makin, 1994). Dlatego w niektórych krajach ustawowo zmniejszono wielkość opakowania, co zmniejszyło liczbę przypadków przedawkowania paracetamolu (Bergman i wsp., 1996). Należy jednak podkreślić, że APAP stosowany w dawkach terapeutycznych jest lekiem bardzo bezpiecznym, a ponad 90% przypadków przedawkowania to próby samobójcze (Campbell i Baylis, 1992; Martin i wsp., 1996; Mohandas i wsp., 1981).

Paracetamol posiada bardzo wysoki indeks terapeutyczny pomiędzy stężeniem leczniczym (20 mg/dm^3 dla dawki 15 mg/kg m.c.), a toksycznym (200 mg/dm^3 dla dawki $130\text{-}150 \text{ mg/kg m.c.}$). Stanowi to o bezpieczeństwie stosowania tego leku (Liu i wsp., 1991).

Na podstawie badań przeprowadzonych na zwierzętach obliczona pojedyncza dawka paracetamolu, która u zdrowych ludzi może spowodować utratę ponad 70% zasobów glutationu w wątrobie i w konsekwencji doprowadzić do uszkodzenia hepatocytów, wynosi 15 g (Lof i wsp., 1990).

Paracetamol w dawkach toksycznych wywołuje zatrucia ostre i przewlekłe. Pierwsze objawy działania toksycznego pojawiają się po jednorazowym przyjęciu 5 g leku (10 tabletek po 500 mg). Przebieg ostrego zatrucia można podzielić na 3 fazy (Anderson i wsp., 2000; Bogdanik, 1998; Angielski i Rogulski, 2000; Makin i Williams, 1994):

I faza: (2-4 h) rozpoczyna się nieswoistymi objawami ze strony przewodu pokarmowego jak: nudności, wymioty, biegunka. Dodatkowo występuje błądź twarży i obfite pocenie się. Obserwuje się wydłużenie czasu protrombinowego (często już w 12 h po zatruciu wskaźnik protrombinowy jest obniżony, a wartość INR podwyższona) (Lynch i Robertson, 2004). Występująca po ok. 15 h kwasica jest następstwem zaburzenia oczyszczania krwi z kwasu mlekowego i niedotlenienia tkanek. Stan taki może się utrzymywać do 24 h, najdłużej do 48h.

II faza: (2 dni od zatrucia) stwierdza się pierwsze objawy uszkodzenia wątroby. Wzrasta aktywność aminotransferaz ($\text{AspAT} > 10\ 000 \text{ j.m./dm}^3$) i stężenie bilirubiny w surowicy. Niewydolność nerek z oligurią (wydalanie moczu poniżej $300 \text{ cm}^3/24 \text{ h}$ i poziom kreatyniny w surowicy powyżej $300 \text{ }\mu\text{mol/dm}^3$) występuje u ok. 2% chorych po przedawkowaniu i u 11% chorych z ciężkim zatruciem (Bergman i wsp., 1996).

III faza: (3-5 dni po przyjęciu leku) nasilają się objawy uszkodzenia wątroby manifestujące się żółtaczką, skazą krwotoczną, kwasicą metaboliczną oraz hipoglikemią, mogącą doprowadzić do śpiączki wątrobowej. Obrzęk mózgu występuje u 80% chorych, którzy znajdują się w IV okresie encefalopatii wątrobowej. Może dochodzić do zakażenia bakteriami gram-dodatnimi (połowę stanowi gronkowiec złocisty). Pojawiające się zaburzenia sercowo – naczyniowe (wzrost wyrzutu krwi z serca, spadek systemowego obwodowego oporu naczyniowego), prowadzą w konsekwencji do uszkodzenia mięśnia sercowego. Pojawia się depresja OUN. Obserwuje się także pogorszenie stanu czynnościowego nerek. Najczęściej przyczyną śmierci jest uszkodzenie wątroby (Angielski i Rogulski 2000; Makin i Williams, 1997).

Niektórzy autorzy wyróżniają również czwartą fazę, trwającą od 4 dni do 2 tygodni, która obejmuje zdrowienie po pomyślnym przejściu okresu zatrucia (Lynch i Robertson, 2004).

Długotrwałe stosowanie wysokich dawek paracetamolu może doprowadzić do zatrucia przewlekłego. Główne objawy to bóle i zawroty głowy, bóle brzucha, sinica, wahania ciśnienia tętniczego krwi, wykwity skórne, a w cięższych przypadkach, uszkodzenie nerek wywołane śródmiąższowym zapaleniem nerek i miedniczek nerkowych (Anderson i wsp., 2000; Bogdanik, 1998; Luft i Herman, 1992; Pakravan i wsp., 2007; Rumack, 1996). Należy jednak wspomnieć, że długotrwałe zażywanie paracetamolu uruchamia proces autoprotekcji, prowadzący do wzrostu odporności komórek wątroby oraz zapobiega nadwrażliwości bólowej (Aleksunes i wsp., 2008; Buckley i Eddelston, 2007; Crawley i wsp., 2008).

Hepatotoksyczne działanie paracetamolu wykazuje liniową zależność dawka-efekt, dlatego w przypadku przedawkowania monitorowanie stężenia leku w krwi pozwala na ocenę prawdopodobieństwa zatrucia i wystąpienia związanych z nim objawów ze zgonem włącznie (Anderson i wsp., 2000; Angielski i Rogulski, 1982). Dzięki obserwacjom klinicznym, opartym na dużej liczbie przypadków przedawkowania, opracowano wykres półlogarytmiczny zależności między stężeniem paracetamolu w osoczu a czasem, który wystąpił od przyjęcia nadmiernej dawki oraz przewidywaną hepatotoksycznością (Ryc.3). Warunkiem niezbędnym do wykorzystania tego wykresu jest znajomość czasu jaki upłynął od spożycia paracetamolu. W przypadku, gdy brak jest danych dotyczących czasu jaki upłynął od przyjęcia paracetamolu, należy pobrać kilka próbek i oznaczyć biologiczny okres półtrwania leku. Obliczony wówczas $t_{0,5}$ przekraczający 4 h wskazuje na uszkodzenie wątroby, natomiast dłuższy niż 12 h potwierdza uszkodzenie tego organu (Dollery i wsp., 1999).

Wykazano, że u 60 % pacjentów, u których stężenie paracetamolu w osoczu przekracza 200 mg/dm^3 ($1,32 \text{ mmol/dm}^3$) w 4 h lub 30 mg/dm^3 ($0,19 \text{ mmol/dm}^3$) w 15 h po zatruciu, wystąpią objawy uszkodzenia wątroby (Ryc.3, linia A). Powyżej odpowiedniej linii równoległej

łączącej 300 mg/dm³ (1,98 mmol/dm³) po 4 h i 45 mg/dm³ (0,28 mmol/dm³) w 15 h od zatrucia istnieje 90% prawdopodobieństwo poważnego uszkodzenia wątroby (Ryc.3, linia B) (Cattermole, 2007; Lee i wsp., 1991; Mielczarska i wsp., 1997).

Za toksyczne działanie paracetamolu odpowiedzialna jest N-acetylo-p-benzochinonoimina. Po podaniu wysokich dawek paracetamolu dochodzi do wysycenia detoksykacyjnego sprzężania z glukuronianami i siarczanami i wzmożonej produkcji NAPQI (Cattermole, 2007), której nadmiar szybko wyczerpuje rezerwy działającego detoksykacyjnie, endogennego glutationu (poniżej 20%). Wolny, silnie elektrofilowy metabolit wiąże się kowalencyjnie z makrocząsteczkami komórek, głównie wątroby, a także nerek. Badania prowadzone przy użyciu znakowanego paracetamolu pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Paracetamol wiąże się kowalencyjnie z białkami wątroby w znacznie większym stopniu niż z białkami innych tkanek np. mięśni;
2. Wiązania są zlokalizowane głównie w części środkowej zrazika wątrobowego, która podlega uszkodzeniu (badania autoradiograficzne);
3. Kowalencyjne wiązanie z białkami wątroby jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia niezmienionego paracetamolu w wątrobie. Wiązanie kowalencyjne wzrasta lub obniża się, odpowiednio pod wpływem induktorów lub inhibitorów enzymów mikrosomalnych;
4. Ilość wiązań z białkami wątrobowymi koreluje z dawką leku i znacznie wzrasta po przekroczeniu dawki działającej hepatotoksycznie;
5. Wiązanie kowalencyjne z białkami wątrobowymi zależy od czasu. Nie stwierdzono takiej zależności w odniesieniu do białek mięśni.

Wiązania kowalencyjne pojawiają się najwyraźniej w białkach mitochondrialnych, powodując zaburzenie ich funkcji. Około 70% tych wiązań stanowią połączenia poprzez grupę sulfhydrylową cysteiny (3-Cys-A) białek wątrobowych w pozycji 3 pierścienia benzenowego. U ludzi i u myszy metabolity paracetamolu wiążą się głównie z białkami 58 kDa (Khandkar, 1996). Funkcja tych białek nie jest całkowicie poznana, nie mniej jednak sugeruje się, że odgrywają istotną rolę w hepatotoksyczności (Andrews i wsp., 2001; Flower i Vane, 1972).

Stwierdzono, że po podaniu myszom APAP w dawce 300 mg/kg m.c. w wątrobie i nerkach następuje wzrost aktywności katepsyny D (w czasie 2 – 2,5 h), RNA-zy (po 0,5 h) oraz DNA-zy (po 2,5 h). Wzmożone działanie katepsyny D może prowadzić do masowej degradacji białek, natomiast wzrost aktywności DNA-zy i RNA-zy powoduje rozerwanie włókien kwasów nukleinowych oraz fragmentację ich łańcuchów. Pod koniec 3 godziny od chwili podania leku masa wątroby wzrastała o 70%, natomiast masa nerek nie ulegała istotnym zmianom (Back i Orme, 1990; Łuczak i wsp., 1976).

W badaniach *in vitro* na komórkach myszy CD-1 wykazano, że paracetamol w dawkach toksycznych indukuje aberracje chromosomowe. Po podawaniu 2,5% roztworu paracetamolu przez okres 2 i 7 tygodni, na 150 prób, stwierdzono występowanie aberracji, odpowiednio w 13 i 11 przypadkach, podczas gdy w grupie kontrolnej zanotowano tylko 1 uszkodzenie chromosomu. Zanotowano także pęknięcie chromatyd jądrowych i inne anomalie takie jak: przerwy, pęknięcia, fragmentowanie chromatyny i poliploidalne jądra. Wykazano, że szczególnie szkodliwa jest kumulacja dawek (Back i Orme, 1990; Chen i wsp., 2008).

NAPQI jest odpowiedzialna także za ultrastrukturalne zmiany u ssaków takie jak: powiększenie mitochondriów i aparatów Golgiego, częściową degranulację siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, pojawianie się pęcherzyków na powierzchni siateczki śródplazmatycznej gładkiej, występowanie jąder o nieregularnych kształtach z grudkową chromatyną, zmniejszenie rezerw glikogenu oraz zwiększenie liczby wakuoli (Dahlin i wsp., 1984; Flower i Vane, 1972; Goldin i wsp., 1996). W konsekwencji zmiany te prowadzą do zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia. Dochodzi do zwiększenia frakcji wolnego Ca^{2+} w cytozolu i aktywacji wielu enzymów, w tym fosfolipazy A_2 , która uwalnia kwas arachidonowy z błon komórkowych. Powstały kwas jest przekształcany przy udziale lipooksygenazy do leukotrienów lub przy udziale cyklooksygenazy do nadtlenków prostaglandyn PGG_2 i PGH_2 . Podczas tych przemian uwalniają się nadtlenki tworzące grupy $-OH$ i wolne rodniki prowadzące do uszkodzenia DNA i rybosomów. Zmianie ulega także poziom siarki i aktywność enzymów lizosomalnych takich jak katepsyna D, RNA-za II i DNA-za II. Wzrasta aktywność fosforylasy glikogenu w wyniku czego dochodzi do obrzęku komórki i utraty Ca^{2+} mitochondrialnego. Hipotezę tę potwierdzają badania przeprowadzone przez Horton`a i Wood`a, którzy po podaniu kortykosteroidów (inhibitory fosfolipazy A_2) lub kwasu acetylosalicylowego (nieswoisty inhibitor cyklooksygenaz), a także innych blokerów kaskady kwasu arachidonowego, stwierdzili obniżenie hepatotoksycznego działania paracetamolu (Horton i Wood, 1989). Podobny rezultat uzyskano po podaniu blokerów kanału wapniowego (Bessemis i wsp., 1996; Held i Biaglow, 1994; Klotz, 1983; Manautou, 1996; Raińska-Giezek, 1995; Socha, 1994).

Hepatotoksyczne działanie paracetamolu wiąże się także z tzw. stresem oksydacyjnym. NAPQI jest formą chinonową, niestabilnym produktem, łatwo ulegającym przemianie do rodnika semichinonowego. Chinonoimina i semichinonoimina tworzą układ oksydoredukcyjny, będący źródłem anionu ponadtlenkowego. W procesie tym na poziomie komórkowym istotne znaczenie mają dwa enzymy: reduktaza i peroksydaza glutationu (GSSG-Rd, GSH-Px). Oksydacyjne uszkodzenie hepatocytów przez NAPQI powoduje zwiększony wpływ utlenionego glutationu (GSSG) z komórki, co prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu: anionów nadtlenkowych, rodników hydroksylowych i nadtlenku wodoru. Nadtlenki ulegają detoksykacji poprzez

enzymatyczną redukcję przy udziale peroksydazy glutationu (GSH-Px), utleniającej glutation GSH do GSSG. Gdy ilość powstałego GSSG przekroczy pojemność reduktazy glutationu (GSSG-Rd), wówczas niemożliwa staje się redukcja GSSG do GSH. W następstwie GSSG gromadzi się w komórce, a jego nadmiar jest usuwany. Zwiększony wpływ GSSG z hepatocytów jest wykorzystywany jako czuły wskaźnik występowania wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego (Adamson i Harman, 1993; Andrews i wsp., 2001; Bai i Cederbaum, 2004; Bhatia i wsp., 2008; Imaeda i wsp., 2009; Raińska-Giezek, 1995).

Reaktywny metabolit paracetamolu (NAPQI) poza wiązaniem z białkami może działać cytotoksycznie na poziomie błon komórkowych mitochondriów, jąder, błon plazmatycznych i mikrosomów, a także systemu błon lub enzymów lizosomalnych. U pacjentów, którzy przyjęli paracetamol w dawkach wyższych niż terapeutyczne, wykazano stymulację uwalniania z monocytów krążących w krwi czynnika martwicy nowotworów (TNF), co sugeruje, że również makrofagi mogą odgrywać bezpośrednią rolę w patogenezie uszkodzeń wątroby indukowanych tym lekiem poprzez uwalnianie czynnych form tlenu, enzymów proteolitycznych i lizosomalnych (Flower i Vane, 1972). Rolę makrofagów potwierdzają badania Goldina i współpracowników wykonane na myszach, u których wyeliminowano 99% wątrobowych makrofagów poprzez wstrzyknięcie liposomów zawierających DCMDP (difosforan dichlorometylenu). Wykazano, że uszkodzenie wątroby u myszy uprzednio „zaszczepionych” liposomami z DCMDP, obserwowane po 0,5; 1,0; 2,0 h po dootrzewnowym podaniu 0,5 cm³ paracetamolu w stężeniu 500 µg/cm³, było znacząco mniejsze niż u zwierząt nie poddanych działaniu DCMDP lub potraktowanych pustymi liposomami. Jednak już po 4,0 h nie stwierdzono żadnych różnic pomiędzy tymi trzema grupami (Flower i Vane, 1972; Goldin i wsp. 1996).

Przeprowadzone badania wskazują, że paracetamol w dawkach hepatotoksycznych może działać również genotoksycznie i rakotwórczo. Za działanie to prawdopodobnie odpowiedzialne są trzy mechanizmy:

1. inhibicja reduktazy rybonukleotydowej;
2. podwyższenie poziomu wapnia cytozolowego;
3. uszkodzenie DNA wywołane przez NAPQI po wyczerpaniu endogennych rezerw glutationu (Angielski i Rogulski, 2000).

NAPQI po związaniu się z DNA i/lub RNA powoduje przerwanie podwójnej helisy, w wyniku czego dochodzi do uszkodzenia materiału genetycznego oraz hamowania replikacji, syntezy i resyntezy naprawczej DNA w śledzionie, grasicy, żołądka, jelicie cienkim i szpiku kostnym. Zwiększa się też częstotliwość uszkodzeń chromosomów. Badania działań nowotworowych paracetamolu, przeprowadzone na myszach szczepu IF, ujawniły możliwość wystąpienia gruczolaka, a nawet raka wątroby, co potwierdzono w doświadczeniach na

szczurach, aczkolwiek wyniki otrzymane na szczepach myszy B6C3F1 i NIH były negatywne. Uzyskane wyniki sugerują, iż rakotwórczość paracetamolu może być specyficzna nawet w obrębie jednego gatunku. Potwierdzają to doświadczenia laboratoryjne na izolowanych hepatocytach myszy i chomików, które wykazały, że APAP stosunkowo łatwo wywołuje ich uszkodzenia, a nawet śmierć. Szczurze i ludzkie hepatocyty są natomiast bardziej odporne na to działanie. Jednak dokładna ocena wrażliwości człowieka na działanie hepatotoksyczne paracetamolu jest trudna do oszacowania, z uwagi na dużą heterogenność populacji, niemożliwość ustalenia w wielu przypadkach wielkości dawki i czasu przyjęcia leku oraz dlatego, iż dane o zatruciach pochodzą głównie z wywiadu od pacjentów, którzy przebywają w szpitalu i w dalszym ciągu rozwija się u nich uszkodzenie wątroby. Dodatkowo może wystąpić martwica komórek wątrobowych, która wzrasta, względnie maleje po podaniu odpowiednich induktorów lub inhibitorów enzymów mikrosomalnych (Chen i wsp., 2008). Dlatego też konieczne jest prowadzenie badań modelowych w celu dokładnego poznania mechanizmów toksycznego działania APAP, które pozwolą na obniżenie ryzyka wystąpienia szkodliwego działania paracetamolu (Siembab, 1993).

Działanie genotoksyczne i mutagenne paracetamolu może się ujawniać po zażyciu dawek większych niż 10g. Przejawia się ono zahamowaniem procesów replikacji, syntezy i naprawy DNA w komórkach śledziony, żołądka, jelita cienkiego, szpiku kostnego i grasicy (Back i Orme, 1990; Bourdeaux i Bewley, 2007; Ott i wsp., 1996).

Należy podkreślić, że efekty genotoksyczne i kancerogenne występują po podaniu APAP w dawkach hepatotoksycznych, i że poziom progowy dla tego działania nie jest osiągany po podaniu leku w dawkach terapeutycznych (Back i Orme, 1990; Jarecki, 1996; Konturek, 1985; Ott i wsp., 1996).

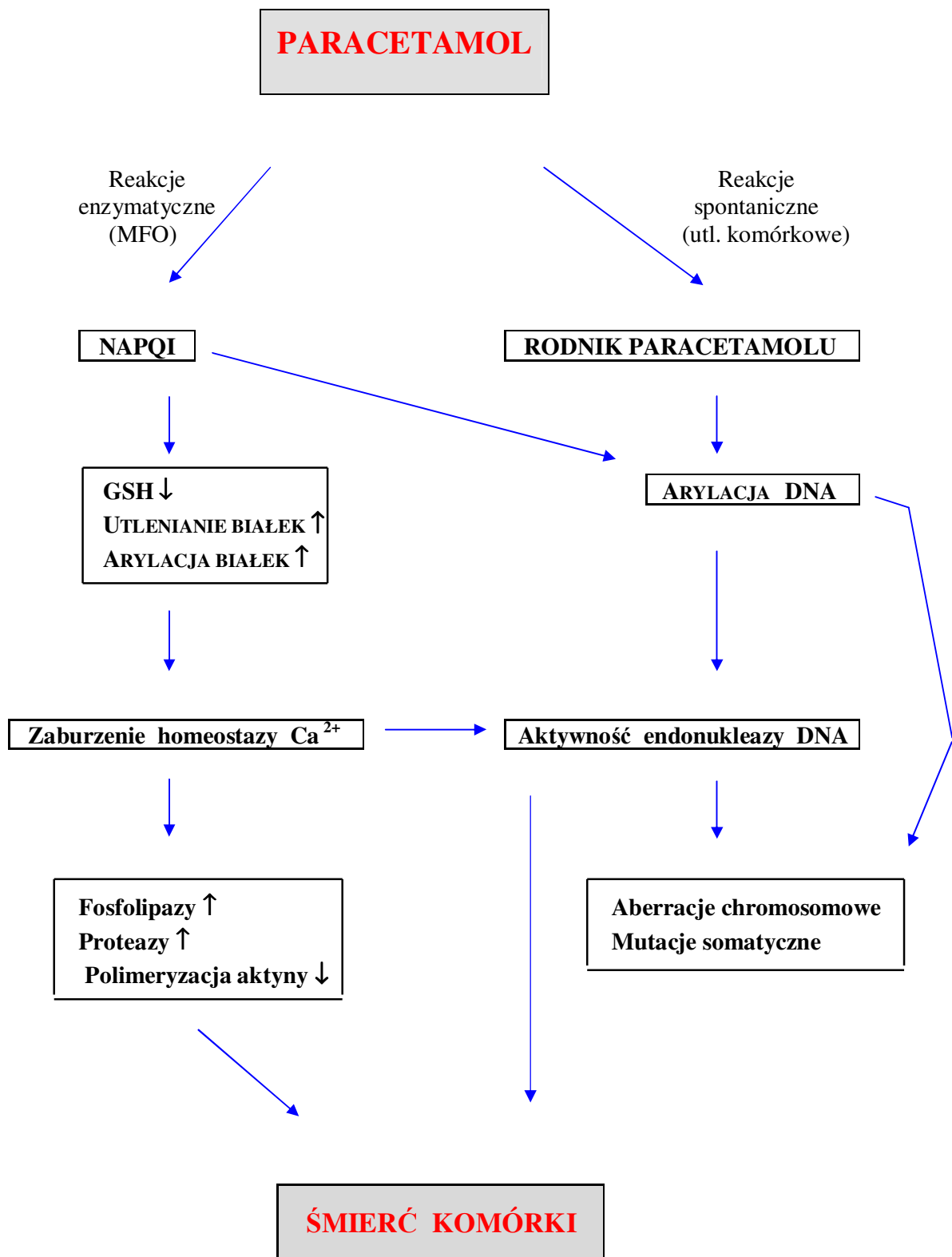
Przyjęcie toksycznej dawki paracetamolu może powodować ostrą martwicę cewek nerkowych bez jednoczesnego działania hepatotoksycznego. Działanie nefrotoksyczne może być efektem cytotoksycznego działania NAPQI, powstającej przy udziale cytochromu P-450 i syntazy prostaglandyny. Ze względu na niski poziom glutationu w nerkach, powstający toksyczny metabolit wiąże się bezpośrednio z białkami komórkowymi. Procesy te mogą być przyczyną ostrej martwicy cewek proksymalnych (mechanizm zależny od cytochromu P-450) lub przewlekłej martwicy brodawek nerkowych i w następstwie nefropatii cewkowo-śródmiaższowej (mechanizm zależny od syntazy prostaglandyny). Za toksyczne działanie APAP odpowiada również powstający w procesie deacetylacji nefrotoksyczny p-aminofenol (Lodge i wsp., 2008; Lof i wsp., 1990; Mahe i wsp., 2004).

Paracetamol może wykazywać działanie kardiotoksyczne. Zaburzenia rytmu serca i niewydolność krążenia pojawiają się w przebiegu zatruc u pacjentów z ciężkim uszkodzeniem

wątroby, z encefalopatią wątrobową oraz u osób jednocześnie zatrutych opioidami. Paracetamol zmniejszając powstawanie grup sulfhydrylowych w wątrobie upośledza syntezę czynnika EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor), co prowadzi do niewydolności wieńcowej. Drugi mechanizm kardi toksyczności wynika ze wzrostu w surowicy stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w przebiegu ciężkiej niewydolności wątroby. Podczas sekcji zwłok u takich osób stwierdza się wyraźne nacieki tłuszczowe w wątrobie (Bessems i wsp., 1996).

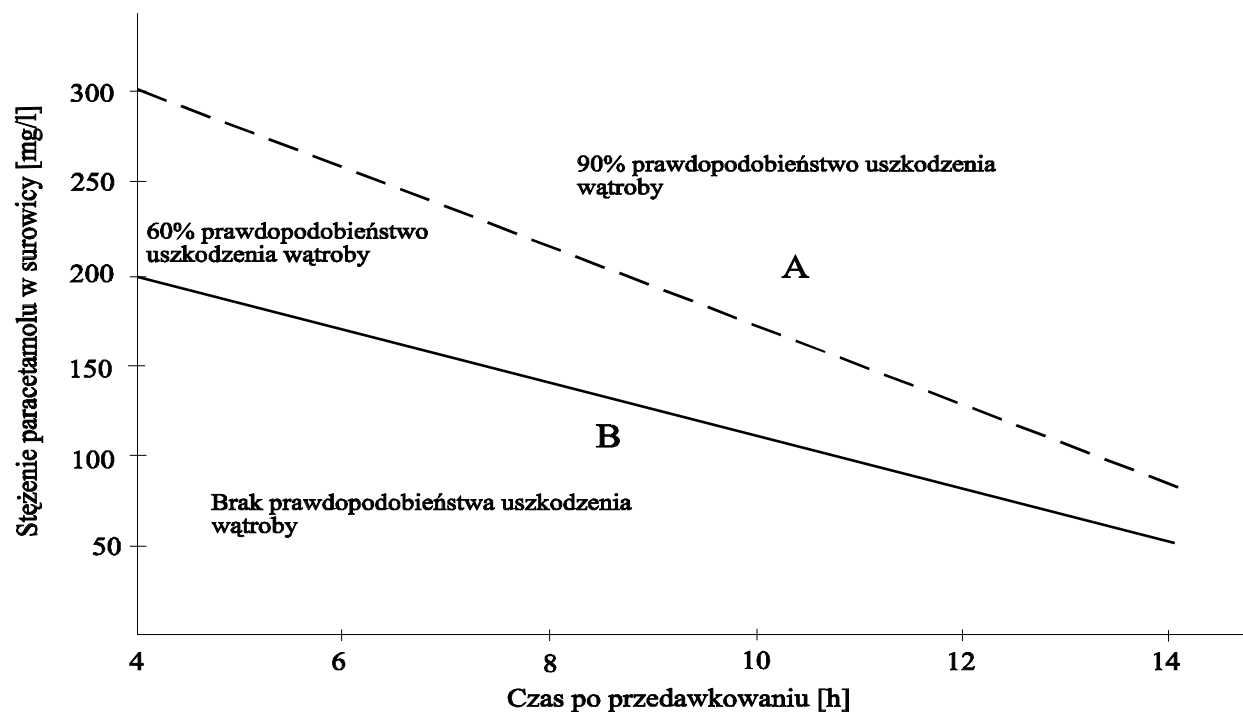
Paracetamol w dawkach terapeutycznych nie wywołuje działania embriotoksycznego. Ying i współpracownicy podawali szczurom APAP w dawkach 125 i 250 mg/kg m.c. od 8 do 19 dnia ciąży i nie stwierdzili działania uszkodzającego płód. Dawka 350 mg/kg m.c. podawana w II trymestrze ciąży powodowała jedynie istotny spadek masy ciała płodów szczurów. Działanie teratogenne i embriotoksyczne wykazano dopiero po podaniu ciężarnym szczurom paracetamolu w dawce 1000 mg/kg m.c. (Ying i wsp., 1993).

Możliwe toksyczne efekty działania paracetamolu przedstawiono na Ryc. 2.



Ryc.2 **Możliwe toksyczne efekty wywoływane przez reaktywne metabolity paracetamolu** (Mankowski i wsp., 2000; Ośrodek Informacji Naukowej „Polfa”, 1995).

Ryc.3. Związek pomiędzy stężeniem paracetamolu w osoczu, czasem od zatrucia i niebezpieczeństwem uszkodzenia wątroby
(Dollery i wsp., 1999; Prescott i wsp., 1979)



A - standardowa linia terapeutyczna
B - sugerowana krzywa terapeutyczna dla alkoholików i przyjmujących leki indukujące enzymy

2.1.10. Leczenie zatruc paracetamolem

Glutation jest aminokwasem odpowiedzialnym za przemiany detoksykacyjne wielu związków, w tym paracetamolu. Jednak w terapii zatruc nie ma on praktycznie żadnego znaczenia, ponieważ nie wnika do hepatocytów. Również stosowanie prekursorów glutationu takich jak cysteamina i metionina posiada liczne wady. Cysteamina hamuje syntezę NAPQI i umożliwia jej przemianę do związku wyjściowego. Wywołuje jednak wiele działań ubocznych w postaci bólów brzucha, nudności i wymiotów oraz niekorzystnego wpływu na OUN. Natomiast metionina pobudza syntezę glutationu w wątrobie, lecz podana zbyt późno (powyżej 10 godzin od zatrucia) może powodować encefalopatię wątrobową (Jollow i wsp., 1973; Mitchell i wsp., 1973). Leki przydatne w leczeniu zatruc paracetamolem można podzielić, w zależności od mechanizmu ich działania, na kilka grup:

1. zwiększające stężenie GSH,
2. inhibitory aktywności CYP P-450,
3. blokery kanałów wapniowych,
4. stymulujące naprawę DNA,
5. przeciwutleniacze (Rannung i wsp., 1995).

W celu zmniejszenia wchłaniania paracetamolu z przewodu pokarmowego, po przedawkowaniu zaleca się prowokowanie wymiotów oraz podawanie leków przeczyszczających (sorbitol). Podjęcie decyzji o sposobie dalszego leczenia w szpitalu zależy od czasu jaki upłynął od chwili zażycia paracetamolu. Jeżeli lek został przyjęty w czasie nie dłuższym niż 4 godziny od zatrucia, celem ograniczenia dalszego wchłaniania wykonuje się płukanie żołądka oraz podaje doustnie węgiel aktywowany w dawce 1g/kg m.c.. Wykazano, że 10g węgla, podane natychmiast po spożyciu 1g paracetamolu, zmniejsza jego wchłanianie o 69 - 77%, natomiast w 60 minut po spożyciu paracetamolu - tylko o 16%. Podobne efekty stwierdza się po podaniu cholestyraminy (Levy i Regardh, 1971). Gdy istnieje możliwość, należy oznaczyć poziom paracetamolu w surowicy krwi oraz czas protrombinowy. W przypadku braku takiej możliwości, każdy chory, który przyjął wysoką dawkę leku (powyżej 12g) powinien być leczony N-acetylocysteiną (NAC). Decyzja o kontynuacji lub przerwaniu postępowania odtruwającego powinna jednak być podjęta dopiero po oznaczeniu poziomu leku we krwi (stężenie paracetamolu powyżej standardowej linii terapeutycznej – Ryc.3). NAC powinno się podawać przez 24 godziny lub do chwili, w której stężenie APAP obniży się poniżej linii toksyczności. W leczeniu odtruwającym NAC podaje się doustnie lub dożylnie. Zalecany sposób dawkowania po podaniu *p.o.* jest następujący: 140 mg/kg m.c. jako dawka inicjująca, a następnie 70 mg/kg m.c. co 4 godziny. Łącznie podaje się 16 dawek w postaci 20% wodnego roztworu NAC, rozcieńczonego w stosunku 4:1 chłodnym napojem

gazowanym lub sokiem owocowym. Jeżeli u chorego występują problemy z przyjmowaniem płynu, NAC można podać sondą do żołądka. Odmienny jest schemat podawania NAC w wlewie dożylnym: dawka inicjująca wynosi 150 mg/kg m.c. (20% roztwór NAC uzupełniony do 200 cm³ 5% roztworem glukozy). Roztwór ten podaje się w szybkiej 15 minutowej kroplówce, później w 4 godzinnym wlewie dożylnym podaje się dawkę podtrzymującą 50 mg/kg m.c. w 500 cm³ 5% glukozy, a przez następne 16 godzin podaje się 100 mg/kg m.c. (rozpuszczone w 1 dm³ 15% glukozy). U dzieci objętość podawanych płynów musi być modyfikowana (Janes i Roudedge, 1992; Prescott i wsp., 1979).

Wcześniej podany węgiel aktywowany może obniżyć skuteczność działania NAC (Makin i Williams, 1997).

Makin wykazał skuteczność hepatochronnego działania NAC po podaniu do 24 godz. od zatrucia. Obecnie istnieją jednak dowody potwierdzające skuteczność NAC, nawet przy znacznie późniejszym zastosowaniu, a także, gdy już rozwinęły się cechy hepatotoksyczności. Badania przeprowadzone w Klinice Chorób Wątroby King`s College Hospital w Londynie wykazały, że zastosowanie NAC nawet w 72 godz. po zatruciu zmniejsza progresję niewydolności wątroby, zapobiega encefalopatii wątrobowej, a w końcowym efekcie zmniejsza śmiertelność spowodowaną ostrą niewydolnością wątroby (FHF) (Makin i Williams, 1997).

Ponadto podanie NAC pozwala obniżyć częstość występowania obrzęku mózgu. U osób z IV stopniem encefalopatii wątrobowej, u których mózgowy wskaźnik metabolizmu tlenowego był obniżony, a stwierdzony był metabolizm anaerobowy, wykazano, że NAC powoduje wzrost przepływu krwi przez mózg i wzrost wskaźnika metabolizmu tlenowego. Stwierdzono też, że leczenie NAC powoduje zwiększenie wyrzutu sercowego, spadek częstości występowania niewydolności nerek i ciężkich zaburzeń krążenia (Makin i Williams, 1997) oraz może zwiększać odporność na raka wątroby (Dawson i wsp., 1984; Hanczko i wsp., 2009) i być pomocny w terapii nowotworowej (Anderson i wsp., 2000; Conrad i wsp., 2006; Danek, 1979; Herda, 2008).

Mechanizm działania i przeciwwskazania do podawania NAC opisano w rozdziale 2.2.3.

Od momentu rozpoczęcia leczenia pacjent powinien być stale monitorowany. Codziennie należy oznaczać INR, a jeżeli wartość wyjściowa była powyżej 2 lub występuje wzrost wskaźnika, należy go oznaczać w odstępach 12 godzinnych. Ponadto należy monitorować wydalanie moczu i stężenie kreatyniny we krwi. Stężenie glukozy należy oznaczać, co 4 godziny, a gazometrię krwi tętniczej wykonać w przypadku, gdy stan chorego nie poprawia się. Nagłe zmiany stanu świadomości mogą być powodowane hipoglikemią, którą zwalcza się podając 10% lub 20% roztwór glukozy *i.v.* (Lee i wsp., 1991).

W przypadku znacznego niedociśnienia uzupełnia się płyny przez podawanie 4% roztworu albuminy ludzkiej przez cewnik umieszczony w tętnicy płucnej. Jeżeli po uzupełnieniu

płynów ciśnienie nie ulega normalizacji to należy podać leki inotropowe. W przypadku niewydolności nerek i kwasicy metabolicznej stosowana jest dializa pozaustrojowa (hemodializa).

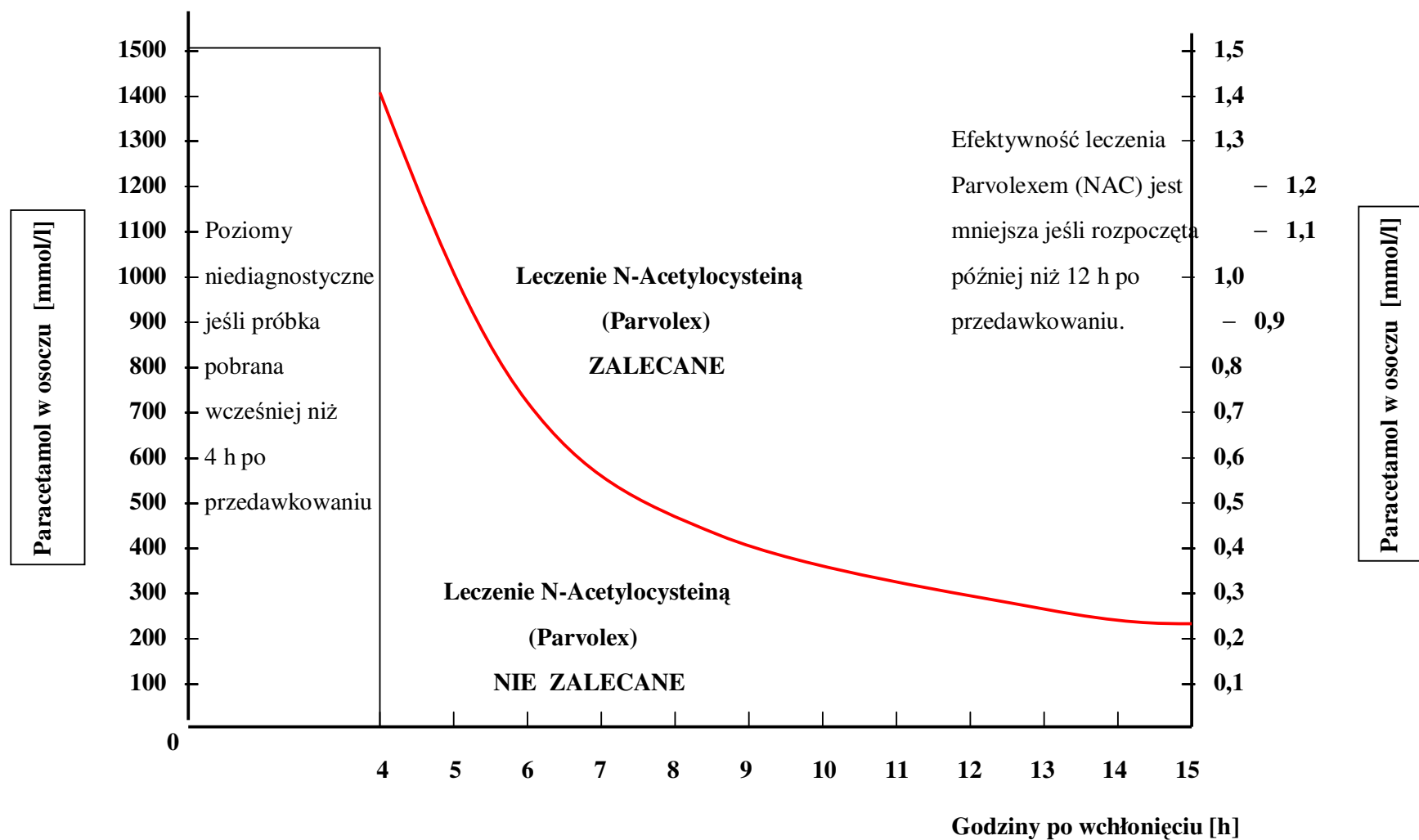
Schemat postępowania leczniczego po zatruciu paracetamolem przedstawiono na Ryc. 4 (Anderson i wsp., 2000; Angielski i Rogulski, 2000).

Leczenie objawowe osób zatrutych paracetamolem polega na pozajelitowym uzupełnieniu płynów w ciągu pierwszych dwóch dni. Podanie preparatu Distalgesic lub dożylnie zastosowanie naloksonu ogranicza depresję oddechową i śpiączkę, wywołane toksyczną dawką APAP. W ciężkich zatruciach manifestujących się skazą krwotoczną należy stosować witaminę K, lecz jest to metoda mało skuteczna. Utrzymanie na odpowiednim poziomie wskaźnika protrombinowego może wymagać podania świeżego, mrożonego osocza lub koncentratu czynników krzepnięcia (Lee i wsp., 1991).

Przy braku specyficznych odtrutek stosuje się hemoperfuzję (efektywniejszą od hemodializy), która jest najskuteczniejsza do 10 godz. od chwili spożycia leku (Dollery i wsp., 1999; Kokot, 1996).

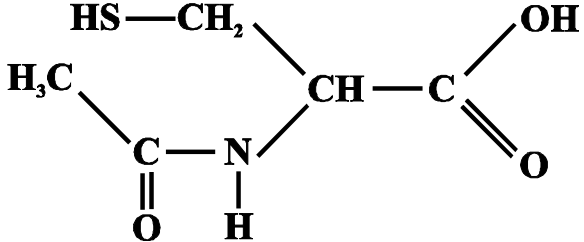
W celu obniżenia stresu oksydacyjnego stosuje się antyoksydanty (przeciwutleniacze, środki redukujące) np.: witamina C, karotenoidy, α -tokoferol (Chruściel i Gliński, 1992; Dollery i wsp., 1999; Kokot, 1996; Liu i wsp., 1992).

Ryc.4. Zasada leczenia zatrucia paracetamolem (Angielski i Rogulski, 2000).



2.2. N-acetylcysteina

2.2.1. Właściwości fizykochemiczne

nazwa chemiczna:	N-acetylo-L-cysteina
synonimy:	N-acetylcysteine, acetylcysteina, NAC, N-AAC
wzór sumaryczny:	C ₅ H ₉ NO ₃ S
wzór strukturalny:	
postać:	biały, krystaliczny proszek o gorzkim smaku i lekko kwaśnym zapachu
masa cząsteczkowa:	163,19
pK _a	3,24
rozpuszczalność:	200 g/dm ³
	dobrze rozpuszcza się w wodzie, kwasach mineralnych i w etanolu
pH:	1,5-2,5
temperatura topnienia:	108-110°C
otrzymywanie:	acetylacja L-cysteiny

2.2.2. Parametry farmakokinetyczne N-acetylcysteiny u człowieka

metabolizm presystemowy	: 10-30%
okres półtrwania	: 1-2 h
objętość dystrybucji	: 0,33 l/kg
wiązanie z białkami osocza	: 50%
dawka śmiertelna	: 5-15 g/kg m.c.; dla 70 kg osoby

W Polsce N-acetylocysteina (NAC) występuje w następujących preparatach:

- Acetylocysteina (200 mg),
- ACC (tabletki musujące, kapsułki, granulat 100, 200, 600 mg),
- Mucisol (proszek do zawiesiny 100, 200, 600 mg),
- Mucomyst (proszek do zawiesiny 100, 200, 600 mg),
- Tussicom (granulat w torebkach 100, 200, 400, 600 mg),
- Fluimucil (granulat w torebkach 100, 200, 600 mg).

2.2.3. Wchłanianie, metabolizm i wydalanie

N-acetylocysteina (NAC, acetylocysteina) należy do pochodnych naturalnego aminokwasu L-cysteiny. Po podaniu *per os* szybko i prawie całkowicie wchłania się z przewodu pokarmowego. We krwi ulega w 50% wiązaniu z białkami natomiast nie związana część leku kumuluje się w płynie śródkomórkowym, głównie w okolicach nerek, wątroby a przede wszystkim płuc. W wątrobie, która jest głównym miejscem biotransformacji, ulega deacetylacji do cysteiny – czynnego metabolitu, N,N-diacetylocysteiny, cystyny i w niewielkiej ilości do tauryny. Biologiczny okres półtrwania leku $t_{0,5}$ u osób zdrowych wynosi 1 – 2 godzin, natomiast w przypadku współistniejącej niewydolności wątroby może ulec wydłużeniu nawet do 8 godzin.

NAC jest wydalana głównie z moczem (Newton i wsp., 1982; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska., 2010).

2.2.4. Mechanizm działania, zastosowanie oraz przeciwwskazania do stosowania

NAC wchodzi w skład wielu preparatów, które są stosowane w ostrych i przewlekłych chorobach dróg oddechowych z obfitą i lepka wydzieliną drzewa oskrzelowego takich jak:

- astma oskrzelowa,
- mukowiscydoza,
- ostre i przewlekłe zapalenie oskrzeli,
- przewlekły spastyczny nieżyt oskrzeli,
- długotrwała sztuczna wentylacja w leczeniu niewydolności oddechowej.

Mechanizm działania leczniczego NAC polega głównie na rozrywaniu wiązań disiarczkowych mukoprotein obecnych w śluzie zalegającym w drogach oddechowych (między innymi mucyny). W wyniku tego procesu dochodzi do fragmentacji mukoprotein z

wytworzeniem hydrofilnych kompleksów, łatwiej rozpuszczalnych i usuwalnych z drzewa oskrzelowego. Ponadto N-acetylocysteina wpływa na ruchy rzęsek oskrzeli poprzez ich pobudzanie do szybszego usuwania wydzieliny oskrzelowej (Diaz i wsp., 1990) oraz wykazuje zdolność do izolowania mykobakterii z płwociny (Lof i wsp., 1990). Podjęto próbę scharakteryzowania flory bakteryjnej drzewa oskrzelowego w okresie wolnym od infekcji i oceny, czy czynniki immunologiczne i leczenie farmakologiczne mają wpływ na występowanie bakterii. Jedynie u pacjentów leczonych N-acetylocysteiną stwierdzono znamienne niższą ilość kultur bakteryjnych w posiewach materiału uzyskanego z drzewa oskrzelowego. W badaniach *in vitro* stwierdzono również zwiększenie aktywności przeciwgrzybiczej makrofagów uzyskanych z krwi obwodowej po podaniu N-acetylocysteiny. N-acetylocysteina stymuluje także wzrost produkcji surfaktantu. Wolne rodniki mogą uszkadzać szkielet cytoplazmatyczny erytrocytów, co powoduje patologiczną zmianę kształtu, która może z kolei upośledzać transport tlenu i wymianę gazową. Porównano erytrocyty u pacjentów z POChP leczonych i nieleczonych N-acetylocysteiną. Okazało się, że podanie N-acetylocysteiny skutecznie zapobiega zmianom w ultrastrukturze erytrocytów oraz ekspresji glikoforyn. N-acetylocysteinę podawano ratownikom likwidującym skutki awarii reaktora w Czernobylu, u których znacznie częściej występowały objawy charakterystyczne dla POChP. W wyniku zastosowanej dobowej dawki 600 mg N-acetylocysteiny przez 12 miesięcy stwierdzono znaczące obniżenie ilości i nasilenia zaostrzeń w przebiegu schorzeń dróg oddechowych oraz szybszy niż w grupie kontrolnej spadek ilości makrofagów zawierających w swoim wnętrzu pył radioaktywny, co można wiązać z szybszą ewakuacją pyłu z drzewa oskrzelowego. Ponieważ stres oksydacyjny odgrywa prawdopodobnie centralną rolę w patogenezie POChP, wydaje się celowe stałe stosowanie N-acetylocysteiny, która w dawce 600 mg/dobę skutecznie redukuje ilość zaostrzeń w łagodnej i umiarkowanej postaci POChP (Szostek-Gaweł, 2002).

NAC wykazuje także właściwości antyoksydacyjne, które mogą wynikać z zapobiegania spadku poziomu glutationu. Ten mechanizm został wykorzystany w leczeniu zatruc muchomorem sromotnikowym (*Amanita phalloides*), w których toksyczne działanie α -amanityny zostaje zniesione przez antyoksydanty (Lauterburg i wsp., 1983; McDaniel i wsp., 2007; Newton i wsp., 1982).

W lecznictwie wykorzystuje się również zdolność NAC do tworzenia kompleksów z metalami ciężkimi. Ma to ogromne znaczenie w leczeniu zatruc związkami złota i rtęci, które z NAC tworzą łatwo rozpuszczalne i szybko usuwalne połączenia tiol-metal. W zatruciach ołowiem podanie NAC znosi niekorzystne działanie tego pierwiastka na poziom immunoglobulin IgA, IgM i IgG w surowicy oraz przywraca do wartości kontrolnych większość parametrów wykorzystywanych w ocenie stresu oksydacyjnego (Kurtovic i Riordan, 2003).

W zatruciach chromem NAC działa jako reaktywny oksydant, redukuje chrom VI do chromu IV, związku o zmniejszonej reaktywności. Zapobiega tym samym działaniu mutagennemu chromu – zwłaszcza uszkodzeniom DNA. Podobny mechanizm działania stwierdza się po ekspozycji na składniki dymu tytoniowego (Heyman i wsp, 2003; Moeschlin, 1960).

Niskie dawki N-acetylocysteiny hamują wymianę siostrzanych chromatyd w ludzkich limfocytach poddanych działaniu 1,8-dinitropyrenu i 1-nitropyrenu (silnie rakotwórcze substancje występujące w oleju napędowym). Przymuszcza się mechanizm działania polega na obniżeniu liczby podziałów krwinek białych. Ten typ działania NAC został wykorzystany w obniżeniu replikacji linii limfocytów u osób zakażonych wirusem HIV (Aremu i wsp., 2008; Kanter, 2006).

Arstall w swoich badaniach, wykazał, że dzięki wlewowi nitratów i NAC stwierdza się lepszą kurczliwość lewej komory. Zagadnieniu temu poświęcono wiele uwagi w badaniach ISLAND (Infarct Size Limitation Acute N-acetylcysteine Defense trial). Zaobserwowano, iż u chorych, u których dokonano skutecznej reperfuzji i podano NAC nastąpiła istotna poprawa objętości wyrzutowej lewej komory. Podanie NAC jest bezpieczne, ponieważ nie powoduje żadnych zaburzeń hemodynamicznych i innych ważnych skutków ubocznych (Arstall i wsp., 1995).

Ponadto NAC rozszerzając tętnice wieńcowe polepsza w nich przepływ krwi, zapobiegając powstawaniu blaszek miażdżycowych, stąd też zalecane jest jej podawanie w leczeniu ostrych objawów wieńcowych (Anderson i wsp., 2000; Reid i Hazell, 2003). NAC poprawia także kurczliwość serca u pacjentów z wirusowym zapaleniem mięśnia sercowego (Reid i Hazell, 2003).

Badania przeprowadzone przez Stolarka miały na celu ocenę wpływu N-acetylocysteiny (NAC) w stężeniach uzyskiwanych po podaniu dożylnym oraz doustnym na wartości spoczynkowe chemiluminescencji oraz wartości parametrów kinetycznych wybuchu oddechowego PMN stymulowanych N-formylo-metionylo-leucylo-fenylalaniną (FMLP) oraz estrami forbolu (PMA). Za pomocą bezpośredniego pomiaru NO metodą elektrochemiczną badano, czy ludzkie granulocyty obojętnochłonne, po stymulacji substancjami działającymi agonistycznie, są zdolne do produkcji tlenu azotu. N-acetylocysteina w stężeniach 20, 100 i 200 μM obniżyła wartości spoczynkowe chemiluminescencji komórek PMN. Zależność ta miała charakter liniowy i była znamienna tylko w czasie kilkunastu sekund po dodaniu N-acetylocysteiny. W stężeniach 100 i 200 μM , odpowiadającym podaniu jej drogą dożylną, obniżała wartość maksymalną, szybkość odpowiedzi oraz całkowitą wartość zależnej od luminolu chemiluminescencji ludzkich granulocytów obojętnochłonnych stymulowanych FMLP.

NAC w stężeniu 100 μM , w porównaniu z ambroksolem w tym samym stężeniu, wykazywała silniejsze bezpośrednie działanie antyoksydacyjne w początkowej fazie odpowiedzi PMN (Stolarek, 2000).

Ponadto Villagrasa wykazał, że dodanie NAC do zawiesiny granulocytów obojętnochłonnych (PMN) w chorobie niedokrwiennej serca redukuje nadmierną produkcję anionów nadtlenkowych (Villagrasa i wsp., 1997). Wyniki te są jednak częściowo sprzeczne z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali, że NAC zmniejsza stymulowaną produkcję nadtlenku wodoru przez granulocyty obojętnochłonne, lecz nie wywiera wpływu na spoczynkowe uwalnianie anionów nadtlenkowych (Gu i wsp., 2005).

Dożylnie podanie leku (60mg/kg) rozszerza zwężone naczynia nerkowe indukowane angiotensyną II, indometacyną, L-NAME (N-nitro-L-arginine). NAC zwiększa również przepływ brodawkowy nerek i wspomaga rozszerzenie naczyń w odpowiedzi na acetylocholinę. Te wszystkie właściwości NAC polepszają funkcję nerek i mogą odgrywać istotną rolę w ich ostrej niewydolności (Hanna i wsp., 1989).

Działanie ochronne i odtruające NAC w zatruciach ksenobiotykami polega między innymi na redukcji metabolitów do związku wyjściowego oraz na dostarczaniu wiązań sulfhydrylowych i obniżaniu w ten sposób poziomu szkodliwych metabolitów w osoczu. Sugeruje się również, że związki zawierające w swojej budowie grupy sulfhydrylowe mogą bezpośrednio inaktywować reaktywne metabolity (Acharya i Lau-Cam, 2010; Petersen, 1993; Saito i wsp., 2010).

Kolejny mechanizm działania ochronnego NAC związany jest z powstającą w trakcie jej biotransformacji cysteiną, która pobudzając wewnątrzkomórkową produkcję glutationu zapobiega obniżeniu jego stężenia w wątrobie (zatrucia paracetamolem), czy w płucach (zatrucia Paraquatem) (Dai i Cederbaum, 1995; Hazai i wsp., 2002).

Glutation spełnia w organizmie podwójną rolę. Jest on pro-oksydantem indukującym stres oksydacyjny w komórkach narażonych na działanie np. selenu. Z drugiej strony jest on anty-oksydantem chroniącym komórki przed indukcją stresu oksydacyjnego i apoptozą. Powstające w wyniku tego procesu nadtlenki wodoru są metabolizowane przez katalazę do H_2O i O_2 lub peroksydazy (w tym peroksydazę glutationową), gdzie utleniania jest reszta SH_2 do S i H_2O . W tej ostatniej reakcji glutation jest kosubstratem dla peroksydazy glutationowej (Gu i wsp., 2005; Przegląd lekarski, 2002; Shen i wsp., 2000). Ponadto NAC zwiększa w organizmie poziom, działającej również jako antyoksydant, dysmutazy nadtlenkowej, a zmniejsza aktywność enzymów związanych z cytochromem P-450, co w przypadku zatruc paracetamolem ogranicza jego przemianę w kierunku toksycznych metabolitów (Necki, 1996).

Właściwości nukleofilowe NAC wykorzystuje się do inaktywacji silnie elektrofilowych związków, np. NAPQI w zatruciu paracetamolem. Nie do końca jednak wiadomo, czy NAC łączy się bezpośrednio z toksycznym metabolitem. Przebadano dwa stereoizomery NAC, porównując zdolność tworzenia pochodnych siarczanowych i stopień uszkodzenia wątroby u myszy po przedawkowaniu APAP. Stwierdzono, że za wzrost nerkowego wydalania nieorganicznych pochodnych siarczanowych paracetamolu i ochronę wątroby przed uszkodzeniami odpowiedzialny jest L-izomer, natomiast D-izomer zwiększa sulfurację tego leku o około 39% bez wzrostu nerkowego wydzielenia. Dane te należy uwzględnić przy ocenie zastosowania NAC w zatruciach paracetamolem (Chen i wsp., 2008; Tokatli, 2007).

Bezwzględny przeciwwskazaniem do stosowania NAC jest nadwrażliwość na lek i ostry stan astmatyczny. Należy zachować ostrożność w przypadkach żylaków przetyku, chorobie wrzodowej żołądka, w nadreaktywności oskrzeli oraz w czasie karmienia piersią. Ograniczenia w podaniu NAC dotyczą dzieci do 2 r.ż. i osób starszych z osłabionym odruchem kaszlowym.

2.2.5. Działania toksyczne oraz niepożądane

Dawka śmiertelna przy zażyciu NAC wynosi 5-15 g/kg m.c. (Gilani i wsp., 1998; Gosselin i wsp., 1984; Nadolski, 1995; Pendyala i Creaven, 1995). Większość niekorzystnych efektów ubocznych opisano po dożylnym podaniu NAC w zatruciach paracetamolem. U pacjentów stwierdzano zmiany w postaci wysypki, rumienia, skurczu oskrzeli, obniżenia ciśnienia, wymiotów, nudności, częstoskurczu (tachykardii), obrzęku płuc czy hemolizy. Wymienione zmiany występowały po 20 min. do 1 h od podania (Newton i wsp., 1982; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010).

Udowodniono embriotoksyczne działanie NAC w postaci zmniejszonej masy płodu, opóźnienia kostnienia i zaburzeń w prawidłowym rozwoju kośćca. Stąd podawanie ksenobiotyku u kobiet w ciąży zalecane jest jedynie w sytuacjach, kiedy korzyści przewyższają ryzyko uszkodzenia płodu bądź poronienia (Moore i wsp. 1985; Ornaghi i wsp., 1993).

Ornaghi wykazał, że w prawidłowym przebiegu procesu kostnienia u płodów mysich poddanych jednoczesnemu działaniu metylochorku rtęci (MMC), korzystniejsze jest jednorazowe niż kilkukrotne podanie NAC w niższych dawkach. Wyniki otrzymane u zwierząt doświadczalnych otrzymujących MMC a następnie jednorazową dawkę NAC były porównywalne do otrzymanych po podaniu samego MMC (zredukowane kostnienie). Natomiast kilkukrotne podanie NAC po uprzedniej intoksykacji MMC korelowało z prawidłowym kostnieniem (Ornaghi i wsp., 1993).

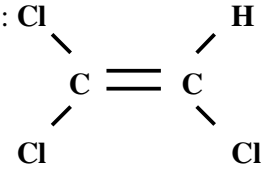
Stwierdzono również, że NAC obniża aktywność krwinek białych (zwłaszcza granulocytów), co wiąże się ze spadkiem klirensu *E. coli* z krwi i wzrostem liczby zakładanych kolonii w płucach, wątrobie i nerkach (Izotti i wsp., 1999; Koch i wsp., 1996).

NAC może indukować apoptozę mięśni gładkich u ludzi i zwierząt, ponadto znane są przypadki wystąpienia zwłóknienia wątroby po podaniu doustnym (106 g) lub doodbytniczym (250 g) pojedynczej dawki NAC. Odpowiedzialny za to mechanizm prawdopodobnie oparty jest na nadmiernym wytwarzaniu H_2O_2 podczas oksydacji tioli (Gu i wsp., 2005; Held i Biaglow, 1994).

Wszystkie powyżej omówione symptomy są łatwo zauważalne i dzięki temu żadna z wymienionych reakcji ubocznych nie stanowi zagrożenia dla życia pacjentów.

2.3 Trichloroetylen

2.3.1. Właściwości fizykochemiczne trichloroetylenu

nazwa chemiczna	: 1,2,2-trichloroetylen
synonimy	: TRI, trichlorek etylenu, trichlorek acetylenu, trichlorek etynylu
wzór sumaryczny	: C ₂ HCl ₃
wzór strukturalny	: 
ciężar cząsteczkowy	: 131,4
temperatura topnienia	: - 73,0°C
temperatura wrzenia	: 86,7°C
gęstość właściwa	: 1.446 (18°C)
prężność par (20 °C)	: 8 kPa (60 mmHg)
współczynnik podziału O/W	: 409
współczynnik podziału W/O	: 2,3
najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS)	: 50 mg/m ³ tj. 0,38 mmol/m ³

Trichloroetylen (TRI) jest bezbarwną, przezroczystą cieczą o zapachu zbliżonym do chloroformu. Trudno rozpuszcza się w wodzie, łatwo w etanolu, eterze, benzenie i innych rozpuszczalnikach organicznych. TRI otrzymywany jest przez odszczepienie chlorowodoru z tetrachloroetanu w reakcji z wodorotlenkiem wapniowym. Jest lotną, niepalną substancją. Pod wpływem światła, wysokich temperatur, wilgoci lub w obecności zasad może ulec rozkładowi do fosgenu, wodzianu chloralu i tlenku węgla.

2.3.2. Źródła emisji trichloroetylenu

Trichloroetylen jest rozpuszczalnikiem organicznym, którego właściwości niepalne przyczyniły się do szerokiego wykorzystania w przemyśle jako rozpuszczalnika farb, emalii,

lakierów, kauczuku, gumy, żywicy, smoły, tworzyw sztucznych i tłuszczów. TRI stosowany jest także do odtłuszczania i czyszczenia metali, prania na sucho i produkcji klejów.

W przemyśle spożywczym TRI był wykorzystywany do ekstrakcji wonnych zapachów z oleożywic oraz kofeiny z kawy, a w rolnictwie i ogrodnictwie również jako środek owadobójczy i bakteriobójczy. Ze względu na właściwości narkotyczne trichloroetylen był używany do krótkotrwałych narkoz w chirurgii i położnictwie (Trilene – znieczulenie ogólne bez pełnego zwiotczenia mięśni gładkich) (Bogdanik, 1992; Bogdanik, 1998; Łuczak i wsp., 1976; Seńczuk, 1994).

2.3.3. Wchłanianie trichloroetylenu

TRI wchłania się głównie w postaci par z dróg oddechowych. Pary rozpuszczalnika mogą także wnikać przez nieuszkodzoną skórę i błony śluzowe, najszybciej w ciągu pierwszych minut narażenia. Retencja trichloroetylenu u ludzi w płucach wynosi średnio 60%, a ciekły TRI może wnikać do organizmu z przewodu pokarmowego oraz przez nieuszkodzoną skórę i błony śluzowe (Poulsen i wsp., 1991; Seńczuk, 1994).

U wszystkich gatunków ssaków obserwuje się podobną kinetykę procesu wchłaniania - szybkie wchłonięcie, a następnie zanikanie z czasem do wartości stałej, wynikającej z ustalenia stanu równowagi pomiędzy szybkością wychwytywania przez krew a szybkością uwalniania z krwi do tkanek (Junod i wsp., 1987; Kryteria Zdrowotne Środowiska, 1993). Maksymalne stężenie trichloroetylenu w krwi jest osiągnięte natychmiast po ekspozycji.

2.3.4. Dystrybucja trichloroetylenu

TRI ulega dystrybucji w następujących kompartmentach:

- tkance tłuszczowej,
- mózgu,
- narządach mięsnych,
- mięśniach.

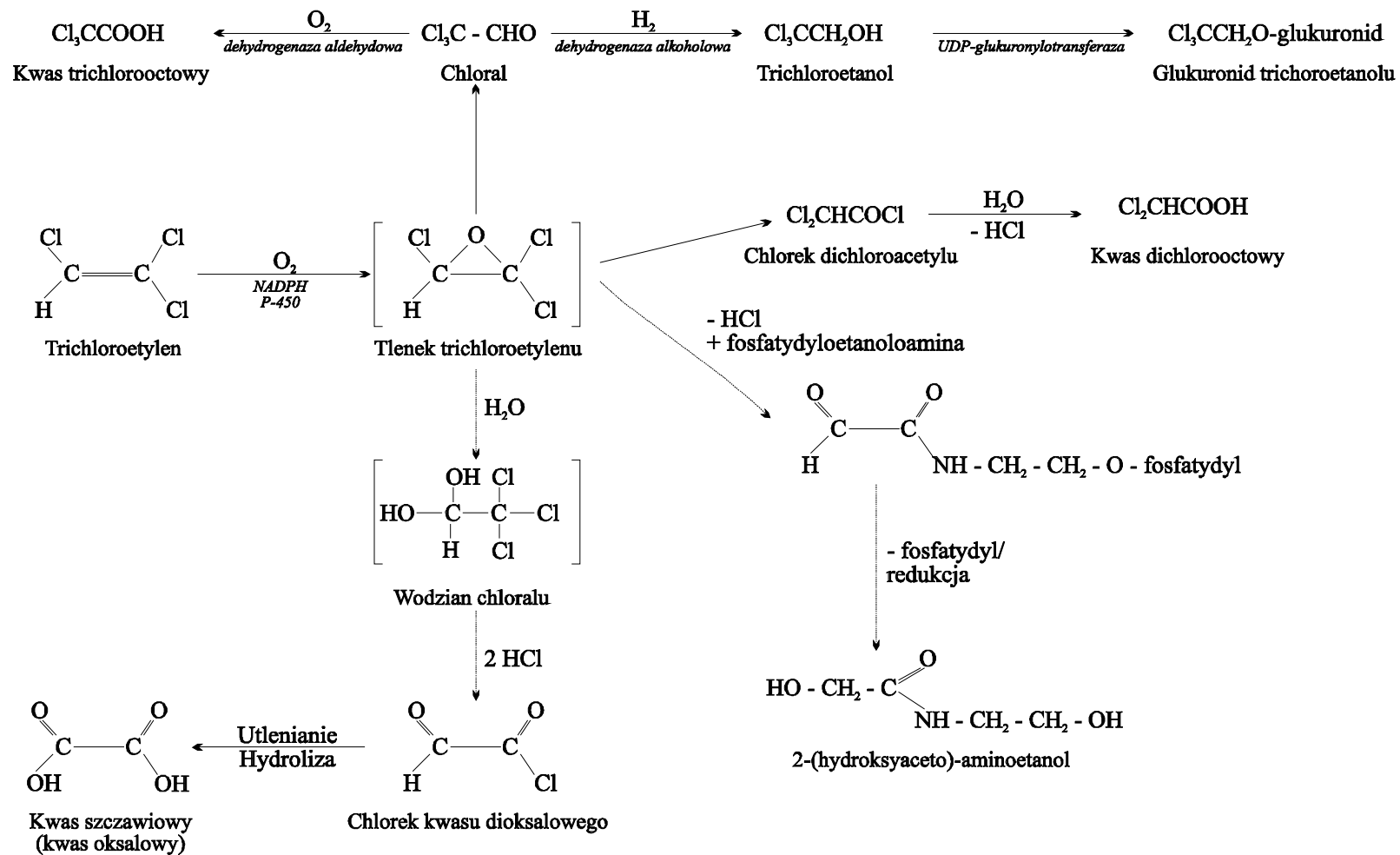
Po przejściu do krwiobiegu jest rozprowadzany przez krew do tkanek, w których rozmieszcza się proporcjonalnie do zawartości lipidów. Najwyższe stężenie trichloroetylenu stwierdzono głównie w tkance tłuszczowej, z której zostaje z powrotem powoli uwalniany do krwi i metabolizowany. Najniższe stężenie stwierdza się w narządach mięsnych i mięśniach (Bogdanik, 1998; Defalogue, 1960; Dekant i wsp., 1983, Seńczuk, 1994).

2.3.5. Biotransformacja trichloroetyleny

TRI ulega biotransformacji głównie w mikrosomach hepatocytów oraz w mniejszym stopniu w śledzionie i płucach. Biotransformacja przebiega kilkoma drogami przy udziale różnych izoform cytochromu P-450, głównie CYP 2E1, a także w kolejności CYP 2C11/6, CYP 2B1/2 i CYP 1A1/2 (Chomicka, 1998; Cort i wsp., 2001; Guengerich i wsp., 2009; Koop i wsp., 1985). Trichloroetylen jest utleniany do 1,1,2-trichloroepoksydu, który jako związek nietrwały szybko ulega dalszej przemianie do trichloroacetaldehydu (chloral) (Bogen i wsp., 1997; Dallner, 1974; Danek, 1979; Dekant i wsp., 1984). Proces ten zachodzi w obecności tlenu i NADPH (zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego). Czynnikiem elektrofilowym w tym procesie jest najprawdopodobniej trójwartościowe żelazo z centrum aktywnego tego enzymu. Chloral ulega dalszemu utlenianiu do kwasu trichlorooctowego (TCA) (10-40% wchłoniętej dawki) i trichloroetanolu (TCE) (30-60%) [240]. Epoksyd może również podlegać spontanicznej przemianie do chlorku dichlorooctowego, który po przyłączeniu cząsteczki wody tworzy kwas dichlorooctowy (DCA) (0,1-2%). Jego dehalogenacja prowadzi do powstania kwasu monochlorooctowego (MCA) (Dawson i wsp., 1984; Dekant i wsp., 1984).

Inna droga biotransformacji TRI, przebiegająca w wyniku enzymatycznej lub nieenzymatycznej reakcji rozszczepienia łańcucha epoksydu, prowadzi do powstania niestabilnego wodzianu chloralu (1,1,1-trichloro-2,2-dihydroksyetan). Po odłączeniu dwóch cząsteczek kwasu solnego związek ten przechodzi w chlorek kwasu dioksalowego, utleniany następnie do kwasu oksalowego (szczawowego). Epoksyd może również reagować ze składnikami błony komórkowej (etanoloaminą, fosfatydyloetanoloaminą). W wyniku redukcji powstaje 2-(hydroksyaceto)-aminoetanol (Dekant i wsp., 1983; Dekant i wsp., 1984; Dorczak i wsp., 1982).

Schemat biotransformacji trichloroetyleny przedstawiono na rycinie 5.



Ryc.5. Schemat biotransformacji trichloroetyleny (Bogdanik, 1992).

2.3.6. Wydalanie trichloroetyleny

TRI jest wydalany w formie niezmienionej głównie przez płuca (ok. 20% dawki) oraz z moczem przez nerki (ok.1%). Metabolity TRI usuwane są przede wszystkim przez nerki (ok. 75%), w tym trichloroetanol wolny i związany z kwasem glukuronowym stanowią odpowiednio 30 i 60%, kwas trichlorooctowy 10-40% i monochlorooctowy ok. 3-5% podanej dawki (Podlewski i wsp., 1998; Seńczuk, 1994). Kinetyka eliminacji z moczem poszczególnych metabolitów jest różna. Wpływa na nią wiele czynników takich, jak choroby układu oddechowego (zaburzenia oddychania, obrzęki, zapalenie płuc, zaburzenia hemodynamiczne), a także stosowane leki (beta-blokery), niewydolność nerek i sprawność czynnościowa wątroby. Po kilku minutach od rozpoczęcia ekspozycji na rozpuszczalnik w moczu pojawia się MCA osiągając maksymalne stężenie po zakończonej ekspozycji. W początkowym okresie z moczem wydalany jest również trichloroetanol, który osiąga wartości maksymalne po 3 – 4 godzinach po ekspozycji i jest oznaczalny dłużej niż MCA. Natomiast wydalanie TCA utrzymuje się średnio około 400 godzin osiągając maksymalne stężenie po 24 – 48 godzinach od zakończenia ekspozycji (Bogdanik, 1998; Monster i wsp., 1976).

Metabolity trichloroetyleny zestawiono w tabeli 4.

Tab.4. Procentowy udział TRI i jego metabolitów wydalanych przez płuca i z moczem.

Wydalanie przez płuca	Wydalanie w (%)
Trichloroetylen wolny	ok.19
Wydalanie z moczem	ok.75
Trichloroetylen wolny	poniżej 1
Trichloroetanol wolny	ok. 10
Trichloroetanol sprzężony z kwasem glukuronowym (kwas urochlorowy)	ok. 30
Kwas trichlorooctowy	10-40
Kwas dichlorooctowy	0,1-2,0
Kwas monochlorooctowy	3,0-5,0
Kwas szczawiowy (oksalowy)	0,7-1,8
N-(hydroksyacetylo)-aminoetanol	4,1-7,2

2.3.7. Mechanizm działania toksycznego trichloroetyleny

Najwyższe dopuszczalne stężenie (NDS) dla trichloroetyleny w środowisku pracy wynosi 50 mg/m³, a w powietrzu obszarów chronionych 0,15 mg/m³ i specjalnie chronionych 0,06 mg/m³. Dopuszczalne stężenie biologiczne (DBS) kwasu trichlorooctowego w moczu pobranym jednorazowo pod koniec ekspozycji dziennej w dowolnym dniu wynosi 20 mg/dm³. Dawkę śmiertelną dla osób dorosłych (doustną lub wziewną) ocenia się na ok. 5 cm³. Do zatrucia dochodzi głównie przez drogi oddechowe lub przewód pokarmowy (Glińska-Serwin i wsp., 1978; Bogdanik, 1992; Pastino i wsp., 2000).

Do ostrego zatrucia TRI może dojść po narażeniu inhalacyjnym, doustnym lub przez skórę. Duże znaczenie ma wielkość dawki, gdyż od niej zależy dynamika narastania zmian i objawów. Wdychanie par ksenobiotyku powoduje początkowo lekkie zamroczenie, oszołomienie i zaburzenia świadomości. Działanie narkotyzujące i euforyzujące TRI może być wykorzystywane przez toksykomanów (narkomania trichloroetylenowa) (Betten i wsp., 2007; Bogdanik, 1998; Dutkiewicz, 1968).

Objawy zatrucia trichloroetylenem można podzielić na wczesne – zmiany w obrazie EKG, w tym zaburzenia rytmu, zaburzenia repolaryzacji komórek, zaburzenia przewodnictwa, pojawiają się bóle i zawroty głowy, nudności, wymioty, zaburzenia żołądkowo jelitowe, biegunka (często krwawa w zatruciach drogą doustną), osłabienie, bóle mięśniowe i drgawki. Do objawów późnych zalicza się śpiączkę toksyczną (nawracająca, często o przebiegu dwufazowym), zapalenie oskrzeli, płuc, a w najcięższych przypadkach uszkodzenie wątroby (podwyższenie aktywności AspAT, ALAT, zmniejszenie stężenia protrombiny, zmniejszenie aktywności cholinoesterazy, niedokrwistość, powiększenie wątroby) (Okino i wsp., 1991; Rusiecki, 1977).

Najczęstsze objawy toksycznego działania TRI związane są z jego oddziaływaniem na układ krążenia. Trichloroetylen działa hamująco na antagonistę amin katecholowych – acetylocholinę, dlatego pobudzenie mięśnia sercowego przez adrenalinę nie jest hamowane i prowadzi do dodatkowych skurczy komorowych. Zaburzenia rytmu i tętna objawiają się przedwczesnymi skurczami nadkomorowymi i komorowymi, tachykardią (ok. 40% przypadków), migotaniem komórek (ok. 15% przypadków). U pojedynczych chorych obserwowano bradykardię, trzepotanie i migotanie przedsionków z niemiarowością całkowitą oraz cechy niedotlenienia mięśnia sercowego. Zmiany w obrazie EKG występują najczęściej do 4 dni po zatruciu. Bezpośrednią przyczyną śmierci jest migotanie komórek (Bogdanik, 1992; Dmochowska-Mroczek, 1972; Pach, 1989).

Kontakt z ciekłym rozpuszczalnikiem lub jego stężonymi parami prowadzi do wystąpienia zmian skórnych takich jak: egzema, rumień, wysięk, pęcherze lub łuszczenie się skóry. Mogą pojawić się także znaczne oparzenia chemiczne skóry krocza i okolicy pośladków (Angielski i Rogulski, 2000; Dmochowska-Mroczek, 1972; Wiernikowski i wsp., 1982). Wysokie stężenie par trichloroetyleny, np. w miejscu pracy, może powodować podrażnienie układu oddechowego, łzawienie, pieczenie, zapalenie oczu, a nawet powierzchniowe uszkodzenie rogówki (Kryteria zdrowotne środowiska, 1993).

W przypadku równoczesnego podrażnienia mechanoreceptorów płucnych i receptorów deflacyjnych, może wystąpić przyspieszenie i spłylenie oddechu oraz znaczne zmniejszenie objętości oddechowej, co w konsekwencji prowadzi do znacznego niedotlenienia (Rolski, 1968; Wiernikowski i wsp., 1982). Dalszym powikłaniem ze strony układu oddechowego jest zapalenie oskrzeli lub rzadziej płuc.

Aromatyczny zapach powietrza wydechowego jest bardzo pomocny w rozpoznaniu ostrego zatrucia trichloroetylenem. Objaw ten nie występuje jednak w przypadku wystąpienia zaburzeń oddechowych i głębokiej śpiączki.

Szczególnie niebezpieczne dla życia jest depresyjne działanie trichloroetyleny na OUN, związane z lipofilnym charakterem rozpuszczalnika oraz łatwą przenikalnością przez błony o strukturze lipidowo-białkowej. Pod wpływem TRI dochodzi do zaburzeń świadomości i zamroczenia, co może prowadzić do długotrwałej śpiączki toksycznej. Objawy te w przypadku jednorazowego ostrego zatrucia nie trwają zbyt długo z wyjątkiem występowania zespołów rzekomonerwicowych i zmian czynności bioelektrycznej mózgu. Przy powtarzających się zatruciach drogą inhalacyjną mogą wystąpić nasilone zespoły neurasteniczne, depresyjno-urojeniowe, zespoły psychoorganiczno-otępienne i otępienno-depresyjne. Zmiany te łączy się z uszkodzeniami struktur podkorowych mózgu. Śpiączka toksyczna występuje niezależnie od drogi wchłaniania trichloroetyleny do organizmu i o większym nasileniu pojawia się przy zatruciach drogą doustną. Jednakże w takich przypadkach nie stwierdzono wyraźnej zależności między głębokością śpiączki a stężeniem kwasu trichlorooctowego w moczu. Występowanie głębokiej śpiączki stwierdzono również u osób, które będąc narażone na TRI jednocześnie spożywały alkohol (Bogdanik, 1992; Wiernikowski i wsp., 1982).

Pod wpływem trichloroetyleny może dojść do porażenia nerwu trójdzielnego, a zwłaszcza jego włókien czuciowych, czego skutkiem jest zupełny zanik czucia w skórze twarzy, przedniej części języka, zanik smaku i powonienia. Narażenie na wysokie dawki trichloroetyleny drogą wziewną prowadzi do relaksacji żuchwy i języka, a tym samym do uduszenia. Ponadto TRI rozszerza naczynia mózgowe oraz zwiększa przepływ mózgowy, co w konsekwencji może

prowadzić do wzrostu ciśnienia śródczaszkowego (Bogdanik, 1992; Glińska, 1978; Plewka i wsp., 2000).

Metabolity trichloroetyleny, tj. kwas trichlorooctowy i trichloroetanol należą do silnych trucizn protoplazmatycznych i enzymatycznych. W wyniku ich działania dochodzi do stłuszczenia i marskości komórek wątrobowych oraz uszkodzenia nerek (Ałapin, 1968; Dutkiewicz, 1968; Seńczuk, 1994). Uszkodzenie narządów mięszzowych występuje głównie w następstwie zatruc przewlekłych (Gattner i Glinecka, 1982).

Badania nad rakotwórczością trichloroetenu nie dostarczyły jednoznacznej odpowiedzi. Uważa się, że za kancerogenne działanie odpowiedzialne są głównie metabolity trichloroetyleny (Keshava i Caldwell, 2006). Według jednego z mechanizmów hepatokancerogenność u myszy spowodowana jest wzrostem liczby dzielących się komórek rakotwórczych wywołanym proliferacją peroksysomów. Wykazano, że hepatocyty ludzkie i małpie są mniej podatne na indukcję proliferacji peroksysomów niż hepatocyty gryzoni (Bogen i Swirsky Gold, 1997).

W warunkach przemysłowych mogą wystąpić zatrucia ostre i przewlekłe. Początkowo pojawiają się zawroty i bóle głowy, nudności, wymioty, pobudzenie, drgawki, a następnie utrata przytomności. Nieregularne tętno wskazuje na zaburzenia rytmu serca. Zgon może nastąpić w ciągu kilku godzin z powodu porażenia ośrodka oddechowego i czynności mięśnia sercowego (Seńczuk, 1994).

W zatruciu przewlekłym obserwuje się nudności, utratę łaknienia, zmniejszenie masy ciała, zmęczenie, upośledzenie wzroku, zapalenie nerwu trójdzielnego, bóle nerwowe, stawowe i mięśniowe. Objawom tym często towarzyszą stany padaczkowe. Rozwija się żółtaczka, stłuszczenie i marskość wątroby oraz uszkodzenia nerek. Występują stany zapalne skóry. Postępujące wyniszczenie może doprowadzić do zaburzeń osobowości (Dutkiewicz, 1968; Seńczuk, 1994).

2.3.8. Leczenie zatruc

Dotychczas nie znaleziono swoistej odtrutki, którą można byłoby zastosować w leczeniu zatruc trichloroetlenem. Postępowanie lecznicze polega obecnie na przeciwdziałaniu niekorzystnym skutkom wywołanym przez rozpuszczalnik. Przy zatruciach drogą pokarmową wykonuje się płukanie żołądka z dodatkiem oleju parafinowego, a następnie podaje środki przeczyszczające oraz dożylnie elektrolity. Celem szybszej eliminacji TRI przez drogi oddechowe stosuje się wspomaganie sztuczne oddychanie. Ponadto stosuje się leczenie objawowe, np. podaje się propranolol w leczeniu zaburzeń mięśnia sercowego, czy leki osłaniające wątrobę. Z uwagi na możliwość wystąpienia zaburzeń homeostazy należy dokładnie monitorować gospodarkę wodno-elektrolitową i kwasowo-zasadową (Defalague, 1960).

W celu oceny stopnia narażenia oznacza się w moczu metabolity trichloroetyleny: trichloroetanol i kwas trichlorooctowy (Seńczuk, 1994).

2.4. Interakcje ksenobiotyków

Interakcją nazywamy takie oddziaływanie związków chemicznych, wynikiem którego jest wzajemna modyfikacja działań dwóch lub więcej substancji równocześnie lub kolejno po sobie wnikających lub wprowadzanych do ustroju (Chien i wsp., 1997). Modyfikacja działań może dotyczyć nie tylko siły i czasu ale również kierunku toksycznego działania ksenobiotyków. W ocenie zjawisk interakcji zawsze należy brać pod uwagę czynniki fizjologiczne, genetyczne i patologiczne.

Interakcje toksykologiczne mogą wystąpić w trzech fazach (Alloui i wsp., 2002; Angielski i Rogulski, 2000; Seńczuk, 1994):

- I Interakcje w fazie dostępności toksykologicznej – obejmują procesy wzajemnego działania i transformacji pozaustrojowej ksenobiotyków w środowisku. Z tych względów mają one niewielki związek z właściwym pojęciem interakcji toksykologicznej. Stanowią przedmiot badań środowiskowych.
- II Interakcje w fazie toksykokinetycznej – obejmują współdziałanie w organizmie dwóch lub więcej związków w zakresie modyfikacji procesów wchłaniania, dystrybucji, wiązania, biotransformacji i wydalania.
- III Interakcje w fazie toksykodynamicznej – obejmują wpływ jednego związku na zdolność lub możliwość drugiego związku do wiązania się z makrocząsteczkami w miejscu działania, a także procesy wstępnego pobudzania, zmiany działania aż do wystąpienia objawów zatrucia.

Efektami działań skojarzonych dwóch związków jest synergizm lub antagonizm. Synergizm określa interakcje dwóch lub kilku związków, prowadzące do jednokierunkowego zwiększenia działania biologicznego, zarówno farmakologicznego jak i toksycznego. Antagonizm natomiast określa przeciwstawne działanie dwóch lub kilku związków chemicznych, osłabiających lub znoszących, jedno lub dwustronne, działanie (Seńczuk, 1994).

Interakcje paracetamolu, trichloroetyleny i N-acetylocysteiny z innymi ksenobiotykami zachodzą głównie w fazie toksykokinetycznej i dotyczą przede wszystkim procesów wchłaniania, biotransformacji i wydalania.

Biotransformacja TRI, podobnie jak paracetamolu, przebiega przy udziale enzymów układu cytochromu P-450, dlatego ich aktywacja lub inhibicja powoduje odpowiednio zwiększenie lub zahamowanie przemian tych związków. Większość interakcji NAC wynika

natomiast z gwałtownego zwiększenia jej ilości w organizmie na skutek uwolnienia z połączeń z białkami krwi przez związki o silniejszym do nich powinowactwie.

Interakcje paracetamolu, NAC i trichloroetyleny nie należą do rzadkości. Poniżej przedstawiono najważniejsze interakcje tych związków.

2.4.1. Interakcje paracetamolu

1. Węgiel aktywowany, leki antycholinergiczne (atropina, butyloskopolamina), cholestyramina, oraz opioidowe leki przeciwbólowe (morfina), zwalniające opróżnianie żołądka, mogą osłabić wchłanianie paracetamolu (Chomicka, 1998; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010).
2. Metoklopramid, domperidon, neostygmina i cizaprid przyspieszając opróżnianie żołądka, przyspieszają wchłanianie paracetamolu do krwi (Chomicka, 1998; Betten i wsp., 2007; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010; Webster i wsp., 1987).
3. Kofeina może nasilać działanie przeciwgorączkowe i przeciwbólowe paracetamolu poprzez łagodną stymulację OUN. Hamując (na drodze współzawodnictwa) biotransformację paracetamolu do reaktywnego metabolitu N-acetylo-p-benzochinoiminy (NAPQI) zmniejsza jego działanie hepatotoksyczne oraz przyspiesza wydalanie z organizmu w postaci glukuronidów (Raińska-Giezek, 1995; USP DI, 1998).
4. Rifampicyna, leki nasenne (fenobarbital), przeciwpadaczkowe i alkohol etylowy zwiększają aktywność enzymów wątrobowych, w efekcie nasilają biotransformację paracetamolu do szkodliwych metabolitów (Raińska-Giezek, 1995; USP DI, 1998).
5. Badania interakcji z alkoholem nie dały jednoznacznej odpowiedzi (od ochronnego wpływu alkoholu, poprzez brak toksyczności APAP u alkoholików, aż do prac dokumentujących toksyczność paracetamolu w połączeniu z alkoholem). Obecnie uważa się, że nie należy spożywać alkoholu w trakcie leczenia paracetamolem (Prescott, 2000; Riordan i Williams, 2002; Thummel i wsp., 1989).
6. Cymetydyna, dekstrapropoxyfen i ranitydyna zmniejszają toksyczność paracetamolu hamując oksydazy zależne od cytochromu P-450 (Davis, 1986).
7. Omeprazol nasila biotransformację i toksyczność APAP na drodze indukcji cytochromu P-450 (Diaz i wsp., 1990; Petersen 1993).
8. Disulfiram (disiarczek tetraetylotiuramu) stosowany w leczeniu choroby alkoholowej, hamuje enzymy cytochromu P-450, zmniejszając tym samym hepatotoksyczne działanie paracetamolu (Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010).
9. Kwas oleanowy zwiększa wydalanie paracetamolu z moczem zmniejszając jego eliminację z żółcią (Liu i wsp., 1993).

10. Salicylamid wydłuża czas działania paracetamolu przez opóźnienie jego eliminacji (Klotz, 1983; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010).
11. Propranolol wydłuża okres półtrwania paracetamolu w surowicy (Klotz, 1983; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010).
12. Paracetamol zwiększa stężenie kortykosteroidów w krwi, konkurując z nimi o wspólną drogę detoksykacji – sprzężanie z kwasem glukuronowym (Rogers i wsp., 1978).
13. Paracetamol może nasilać działanie przeciwzkrzepowe pochodnych kumaryny (warfaryna) i indandionu poprzez zmniejszenie wątrobowej syntezy czynników krzepnięcia (Ray i wsp., 1996; Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010, USP DI, 1998).
14. Paracetamol wzmacnia działanie doustnych leków przeciwcukrzycowych poprzez współzawodnictwo o miejsce wiążące z białkami (Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010; USP DI, 1998).
15. Łączne stosowanie paracetamolu z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń czynności nerek (Klotz, 1983; USP DI, 1998).
16. Stosowanie paracetamolu z inhibitorami MAO (monoaminooksydazy) może wywołać stan pobudzenia i wysoką gorączkę (Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010; Siembab, 1993; Ziółkowski, 1993).
17. Paracetamol wydłuża okres półtrwania chloramfenikolu i w razie wielokrotnego stosowania nasila jego toksyczność, prawdopodobnie na drodze współzawodnictwa na etapie glukuronidacji. Należy monitorować poziom tych leków w surowicy pacjenta przy jednoczesnym stosowaniu tych leków łącznie z paracetamolem (Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010; Stein i wsp., 1989).

2.4.2. Interakcje N-acetylocysteiny

1. NAC istotnie zmniejsza granulocytozę obojętnochłonną we krwi obwodowej u chorych otrzymujących leki fibrynolityczne, w porównaniu do pacjentów, którym podano tylko streptokinazę (Jolly i wsp., 1986).
2. NAC nasila działanie rozszerzające naczynia wywołane przez azotany (zwłaszcza nitroglicerynę) oraz zmniejsza częstość występowania zawału serca (Manov i wsp., 2002; Mrozikiewicz, 1984).
3. NAC ze względu na działanie antyagregacyjne może wzmacniać działanie leków przeciwzkrzepowych (synergizm addycyjny) (Ott i wsp., 1996).
4. NAC podana łącznie z witaminą E hamuje peroksydację lipidów wywołaną kadmem (Shaikh i wsp., 1999).

5. Miedź i żelazo nasilając stres oksydacyjny osłabiają działanie protekcyjne NAC (Lorber i wsp., 1973).
6. N-acetylocysteina podana łącznie z azotowym isosorbitolem redukuje poziom przedsionkowego peptydu sodopędnego (ANP, peptyd natriuretyczny) w osoczu, co zapobiega rozszerzeniu naczyń krwionośnych (Mc Murtry i wsp., 1978).
7. NAC chroni nerki przed toksycznym wpływem cis-platyny tworząc z nią kompleksy nie podlegające resorpcji zwrotnej w cewkach nerkowych (Lodge i wsp., 2008).
8. NAC wykazuje działanie antagonistyczne do niektórych grup antybiotyków: cefalosporyn, penicylin, tetracyklin oraz aminoglikozydów. Należy zachować dwugodzinną przerwę między podaniem tych leków i NAC (Pendyala i Creaven, 1995).
9. Podczas stosowania NAC z silnymi lekami przeciwkaszlowymi (np. kodeiną) w wyniku zmniejszenia odruchu kaszlowego dochodzi do zalegania rozrzedzonej wydzieliny w płucach (Podlewski i Podlewska-Chwalibogowska, 2010).

2.4.3 Interakcje trichloroetyleny

1. Antybiotyki (streptomycyna, gentamycyna, neomycyna) mogą pogłębiać depresyjne działanie TRI na ośrodek oddechowy lub spowodować długotrwałą blokadę przewodnictwa nerwowo-mięśniowego (Monster i wsp., 1960).
2. Pochodne fenotiazyny (chloropromazyna, promazyna) nasilają działanie toksyczne TRI (Mrozikiewicz, 1984).
3. Alkohol etylowy nasila objawy zatrucia TRI (działanie hepatotoksyczne i nefrotoksyczne) (Moeschlin, 1960; Mrozikiewicz, 1984).
4. Fenobarbital indukując enzymy cytochromu P-450 zwiększa toksyczność TRI poprzez nasilenie produkcji toksycznych metabolitów (Moeschlin, 1960; Mrozikiewicz, 1984).
5. TRI łącznie z preparatami tarczycy prowadzi do zaburzeń pracy mięśnia sercowego (Okino i wsp., 1991).
6. TRI z lekami wywołującymi blok polaryzacyjny (tubokuraryna, galamina) doprowadza do porażenia czynności oddechowej (Makin i Williams, 1997; Monster i wsp., 1976).
7. TRI stosowany łącznie z lekami nasennymi, uspokajającymi i psychotropowymi prowadzi do spotęgowania ich działania depresyjnego na OUN (Moeschlin, 1960; Okino i wsp., 1991).
8. TRI konkuruje z ksylenem o układ cytochromu P-450. Dochodzi do zahamowania biotransformacji TRI, co powoduje dłuższe utrzymywanie się niezmienionego TRI w ustroju. Biotransformacja ksylenu zostaje przyspieszona, wynikiem tego jest wzrost wydalania jego metabolitów z moczem (Mrozikiewicz, 1984).
9. TRI znacznie modyfikuje biotransformację benzenu na etapie hydroksylacji i sprzęgania (Okino i wsp., 1991; Zielińska-Psuja i wsp., 1993).
10. TRI potęguje działanie hipotensyjne rezerpiny, co może doprowadzić do zapaści (Moeschlin, 1960; Okino i wsp., 1991).

2.5 Parametry farmakokinetyczne w ocenie działania ksenobiotyków

Farmakokinetyka, wchodząca w skład farmakologii, zajmuje się przebiegiem w czasie procesów decydujących o losach leków i ich metabolitów w organizmach żywych. Przedmiotem zainteresowania jest szybkość procesów wchłaniania (absorpcji), dystrybucji, biotransformacji i wydalania leków (ksenobiotyków) w ustroju biologicznym oraz wpływem drogi podania i dawki na przebieg tych procesów. Informacje te służą do ustalenia czasu działania oraz oceny skutków biologicznych (Herman i Skibińska, 1992; Seńczuk, 1994).

Wystąpienie efektu biologicznego zależy od szybkości transportu leku z miejsca podania do odpowiedniej biofazy (miejsce w obrębie receptora mające znaczenie dla reakcji wiązania ksenobiotyku). Szybkość osiągnięcia tkanki docelowej zależy od kinetyki procesów określanych skrótem LADME (Liberation – uwolnienie, Absorbtion – wchłanianie, Distribution – rozmieszczenie, Metabolism – metabolizm, Excretion – wydalanie). Etapy D, M, E, odpowiadają pojęciowo procesowi biotransformacji (Hładoń, 1997).

Pierwszym etapem warunkującym wystąpienie efektu farmakologicznego jest uwalnianie substancji leczniczej. W każdej pozanaczyniowej drodze podania leku występuje przejście substancji czynnej z danej postaci leku do roztworu. Zależy ono od rozpuszczalności substancji leczniczej (współczynnik podziału o/w i w/o), pH środowiska oraz czynników technologicznych. Na szybkość i wydajność rozpuszczania leku wpływają: charakter substancji leczniczej, stopień rozdrobnienia, postać krystalograficzna, użyte substancje pomocnicze (tenzydy, solubilizatory) a także postać leku (tabletki, tabletki powlekane, czopki, roztwory, syropy, systemy transdermalne, mikrokapsułki, liposomy itp.) (Back i Orme, 1990; Danek, 1979).

Wchłanianie polega na przejściu substancji ze środowiska zewnętrznego do krążenia ogólnego (krew, chłonka). Zależy od rozpuszczalności ksenobiotyku w lipidach, jego masy cząsteczkowej, stopnia jonizacji, konfiguracji przestrzennej, powierzchni absorpcyjnej, oraz ukrwienia miejsca wchłaniania. Proces ten może zachodzić różnymi drogami: pokarmową *p.o.*, skórną (dermalną), wziewną (inhalacyjną), pozajelitową (*i.v.* – dożylnie, *i.m.* – domięśniowo, *s.c.* – podskórną, *i.p.* – dootrzewnowo) i przez jamy ciała (*per rectum* – doodbytniczo) (Hładoń, 1997). W toksykologii największe znaczenie ma droga doustna, wziewna i skórna. Proces wchłaniania zależy od: drogi i sposobu podania ksenobiotyku, jego dawki, przedziału dawkowania i fizykochemicznych właściwości substancji leczniczej. Szybkość wchłaniania wpływa na intensywność działania, nasilenie objawów i czas trwania zatrucia. Ksenobiotyki podane doustnie i niektóre doodbytniczo przechodzą najpierw przez wątrobę, gdzie stykając się z odpowiednimi enzymami mogą ulec biotransformacji, w tzw. procesie pierwszego przejścia (first pass effect).

Dystrybucja, czyli przechodzenie substancji z krwi do tkanek i narządów oraz odwrotnie, to kolejny etap, któremu podlega ksenobiotyki w ustroju. Zależy ona od stopnia wiązania leku z białkami krwi i tkanek, przechodzenia przez błony biologiczne (rodzaj transportu), zdolności pokonywania barier (np.: krew-mózg, łożysko), stopnia ukrwienia tkanek i szybkości przepływu krwi przez tkanki. Właściwe działanie farmakologiczne może wywierać tylko forma ksenobiotyku niezwiązana z białkami ustrojowymi. Miarą rozmieszczenia substancji obcej w organizmie jest objętość dystrybucji V_d . Charakterystyczną cechą dystrybucji jest jej odwracalność, wskutek czego lek obecny we krwi znajduje się cały czas w stanie równowagi z innymi płynami ustrojowymi (Janiec i Krupińska, 1995).

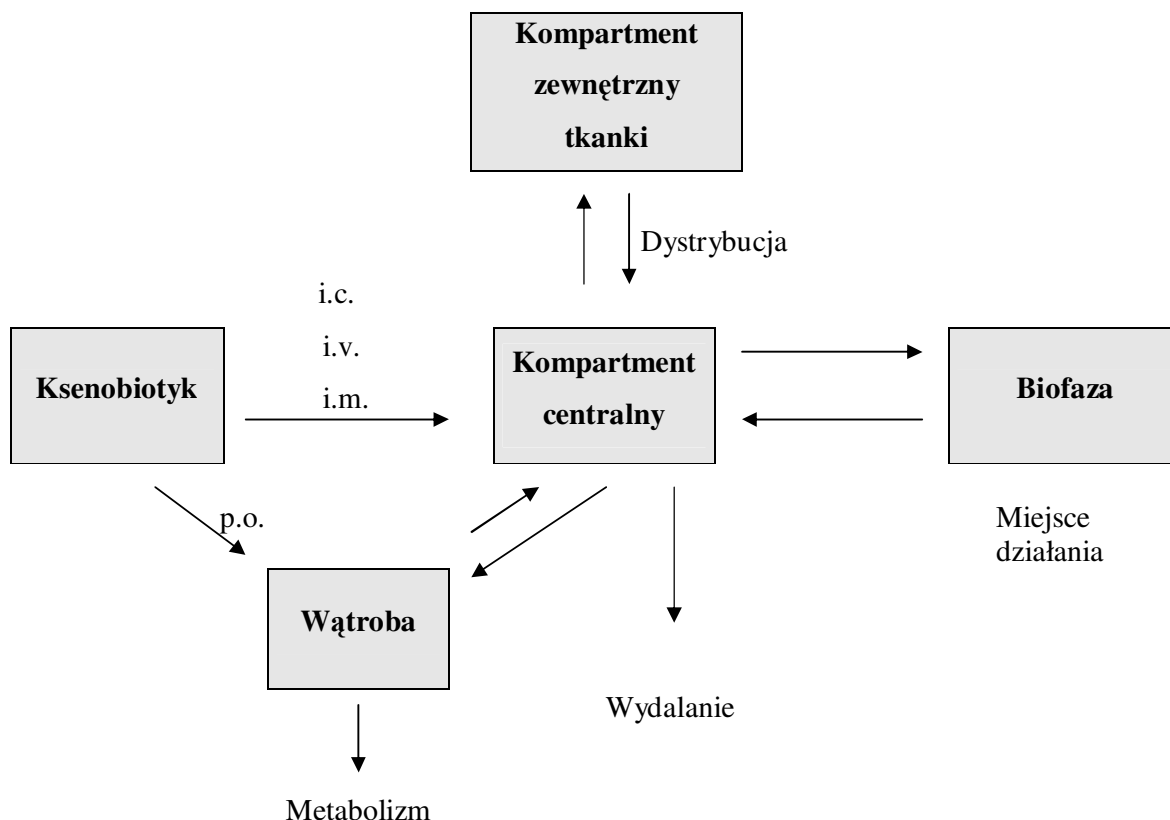
Przechodzenie ksenobiotyku przez błony biologiczne opiera się na kilku mechanizmach, z których najważniejszymi są transporty: bierny i aktywny. Transport bierny (dyfuzja prosta) polega na przejściu ksenobiotyku przez błony białkowo-lipidowe, bez nakładu energii i bez udziału składników błon, ze środowiska o większym stężeniu do środowiska o mniejszym stężeniu. Na szybkość tego procesu ma wpływ wielkość cząsteczek, stopień jonizacji i rozpuszczalność zarówno w lipidach, jak i w wodzie. Transport aktywny wymaga nakładu energetycznego i odznacza się wysycalnością, swoistością oraz hamowaniem kompetycyjnym. Do jego funkcjonowania niezbędny jest również system nośnikowy. Nośnik będący składnikiem błony wiąże się z substancją i transportuje ją na drugą stronę błony. Energia niezbędna do tego procesu pochodzi z hydrolizy ATP przy udziale błonowej ATP-azy. Ksenobiotyki przechodząc z krwi do komórek może ulec związaniu z białkami (albuminy, globuliny, kwaśne α_1 – glikoproteiny, lipoproteiny i inne) do formy nieczynnej, czyli DEPOT (magazyn). Ksenobiotyki z DEPOT może być wyparty przez inne substancje („wypieracze”) o większym powinowactwie do tych białek. Może to spowodować nagłe zatrucie z powodu szybkiego wzrostu stężenia w krwi ksenobiotyku wypartego z wiązania z białkami ustrojowymi przez inną substancję (np. glikozydy nasercowe) (Hładoń, 1997).

Po opuszczeniu biofazy ksenobiotyki przechodzi z powrotem z kompartmentu tkankowego (zewnątrznego) do kompartmentu centralnego, z którego jest wydalany w postaci niezmienionej przez nerki, ślinę, mleko (matki karmiące) lub przedostaje się do wątroby, gdzie jest metabolizowany. Biotransformacja ksenobiotyków może zachodzić również w osoczu, tkankach i innych narządach. W efekcie przemian biotransformacyjnych powstają metabolity, które mogą być aktywne farmakologicznie, nieaktywne lub wywoływać działanie toksyczne. Całkowity wynik metabolizmu (dokładniej – etapu syntezy) i wydalania, objawiający się ubytkiem niezmienionego ksenobiotyku w ustroju, nosi nazwę eliminacji (Danek, 1979; Hładoń, 1997)

Największą rolę w usuwaniu substancji obcych z ustroju odgrywa wydalanie przez nerki. Z moczem wydalane są substancje dobrze rozpuszczalne w wodzie i o małej masie

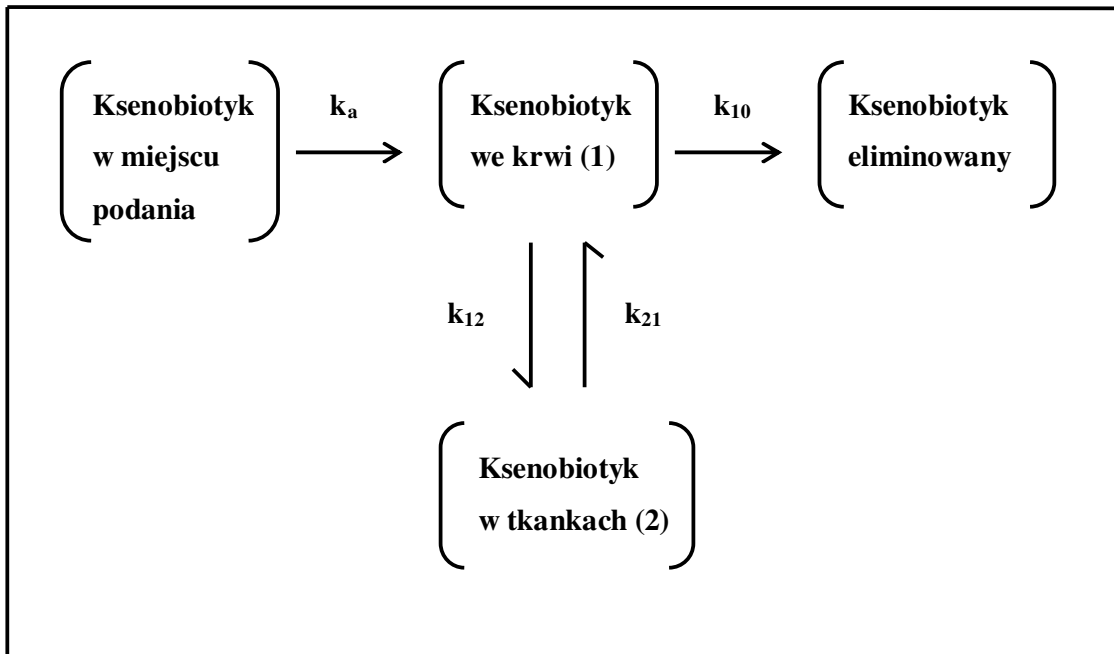
cząsteczkowej. Wydalanie ksenobiotyków z moczem może być zwiększone przez zakwaszenie (wzrost wydalania substancji o charakterze zasadowym) lub alkalizację moczu (wzrost wydalania substancji o charakterze kwaśnym). Uproszczony schemat procesów LADME przedstawiono na ryc. 6.

Ryc. 6 Uproszczony schemat procesów wchłaniania, dystrybucji i eliminacji ksenobiotyku w organizmie (Hładoń, 1997).



Każdy z wymienionych powyżej procesów przebiega z określoną szybkością. Wpływając na dowolny proces kinetyczny przedstawiony na rycinach 6 i 7, można zmienić profil krzywej obrazującej zależność stężenia leku we krwi od czasu, np. zmiana stałej szybkości wchłaniania k_a , stałej szybkości eliminacji ksenobiotyku k_{10} (z moczem i w trakcie biotransformacji), stałej dystrybucji k_{12} leku między tkanki czy redystrybucji z tkanek do krwi k_{21} (Danek, 1982; Danek, 1979).

Ryc. 7. Analiza kompartmentowa (Herman i Skibińska, 1992).



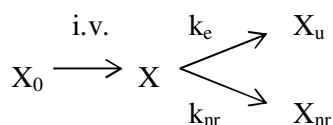
Do matematycznej interpretacji wyników badań farmakokinetycznych niezbędne jest przyjęcie odpowiedniego modelu, zakładającego istnienie w ustroju jednego lub kilku kompartmentów. Kompartament (przedział, pula) to przestrzeń organizmu, w której ksenobiotyk jest rozmieszczony w sposób jednorodny i podlega takim samym procesom kinetycznym. Ponieważ każdy żywy organizm jest strukturalnie bardzo złożony, przyjmuje się, że stanowi on układ wielokompartmentowy. Najczęściej jednak przyjęte przedziały nie pokrywają się ze strukturami anatomicznymi ustroju. Wiele tkanek wykazuje podobne właściwości w odniesieniu do badanego związku, dlatego też celem uproszczenia obliczeń farmakokinetycznych łączy się je w jeden kompartament. Klasyfikacja danej tkanki, czy narządu do konkretnego kompartmentu zależy od właściwości fizykochemicznych badanej substancji, np.: mózg jest narządem silnie ukrwionym, ale wyraźnie oddzielonym od krwi barierą lipidową. W przypadku substancji lipofilnych będzie zaliczał się do kompartmentu centralnego, natomiast w przypadku substancji polarnych do kompartmentu tkankowego.

Na szybkość transportu ksenobiotyku wpływa wiele czynników, z których do najważniejszych należą właściwości błon biologicznych (stanowiących bariery ustrojowe), którymi oddzielone są poszczególne kompartmenty. Organizm może więc stanowić układ jedno-, dwu- lub wielokompartmentowy.

2.5.1. Otwarty model jednokompartментowy

Najprostszym modelem kinetycznym jest otwarty układ jednokompartментowy. Zakłada on natychmiastowe i homogeniczne mieszanie ksenobiotyku w płynach i tkankach organizmu, który stanowi jednostkę jednorodną pod względem kinetycznym. W modelu tym ksenobiotyk do ustroju dostaje się drogą dożylną lub pozanaczyniową, a jego eliminacja jest natychmiastowa. Szybkość zmian masy (stężenia) ksenobiotyku w osoczu odzwierciedla ilościowe zmiany w całym organizmie.

Model ten dla jednorazowej dawki dożylną (*i. v.*) można przedstawić następująco:



gdzie:

X_0 – podana dożylnie masa ksenobiotyku (dawka) w czasie t_0

X – masa ksenobiotyku we krwi (cały kompartмент) w czasie t

X_u – masa ksenobiotyku wydalana do moczu w czasie t

X_{nr} – masa ksenobiotyku wydalana drogami pozanerkowymi

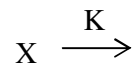
k_e – stała szybkości wydalania ksenobiotyku przez nerki zgodnie z procesem pierwszego rzędu

k_{nr} – stała szybkości pierwszego rzędu wydalania ksenobiotyku drogami pozanerkowymi

Stała szybkości eliminacji ksenobiotyku z ustroju (K) jest sumą stałych wszystkich procesów, które powodują wydalanie ksenobiotyku z kompartментu centralnego drogą nerkową (k_e) i pozanerkową (k_{nr}) (Danek, 1979):

$$K = k_e + k_{nr}$$

Zakładając, że dawka dożylna ulega natychmiastowej dystrybucji powyższy model jednokompartментowy można opisać jeszcze prościej zakładając:



Większość procesów kinetycznych przebiega zgodnie z zasadami kinetyki pierwszego rzędu, dlatego szybkość zmian masy ksenobiotyku we krwi w modelu jednokompartментowym można przedstawić równaniem różniczkowym:

$$\frac{dX}{dt} = -KX$$

po przekształceniu, którego otrzymuje się postać wykładniczą:

$$X = X_0 \cdot e^{-Kt}$$

Praktycznie powyższych równań nie można sprawdzić, ponieważ badając losy danego ksenobiotyku w organizmach żywych otrzymuje się zawsze stężenie ksenobiotyku we krwi (C) a nie jego masę. Dlatego, w celu opisu zależności zmian stężenia ksenobiotyku we krwi od czasu, wprowadzono pojęcie objętości dystrybucji (V_d), czyli hipotetycznej objętości płynów ustrojowych, w których po równomiernym rozmieszczeniu wprowadzonej dawki ksenobiotyk osiągnie takie samo stężenie jak w osoczu krwi. Objętość dystrybucji jest współczynnikiem proporcjonalności między stężeniem ksenobiotyku we krwi, a niedającą się oznaczyć doświadczalnie jego ilością (masą) w ustroju:

$$X = V_d \cdot C$$

Objętość dystrybucji wyraża się w litrach [dm^3], a stężenie ksenobiotyku we krwi (osoczu lub surowicy) w mg/dm^3 lub mol/dm^3 . O hipotetycznym charakterze objętości dystrybucji świadczy fakt, że często jej wartość kilkakrotnie przekracza objętość ciała. Jest ona jednak bardzo przydatnym parametrem, którego wartość jest charakterystyczna dla danego ksenobiotyku i osobnika. Zależy także od masy ciała. Wielkością niezależną od masy ciała BW jest natomiast tzw. względna objętość dystrybucji (Δ'):

$$\Delta' = \frac{V_d}{BW}$$

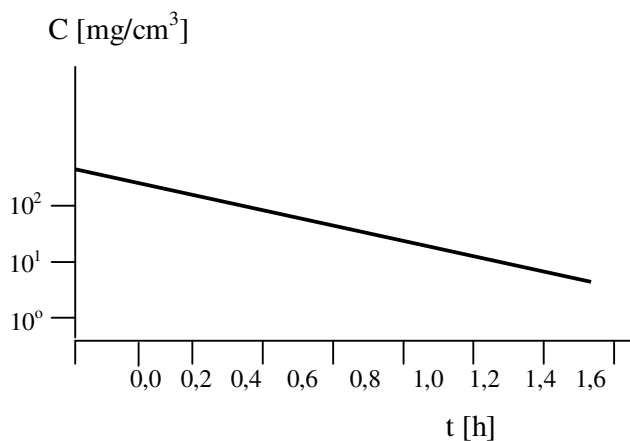
Objętość dystrybucji pozwala także na ocenę, w jakim stopniu ksenobiotyk wiąże się z białkami osocza i tkanek. Poniżej przedstawiono dane dla człowieka o masie ciała 70 kg:

- $V_d \sim 5 \text{ dm}^3$ ksenobiotyk tylko w kompartmentcie centralnym (stanowi to ok. 4% m.c. – głównie układ krążenia)
- $V_d \sim 10 - 20 \text{ dm}^3$ ksenobiotyk znajduje się w płynie zewnątrzkomórkowym (ok. 15 – 27% m.c.)
- $V_d \sim 25 - 30 \text{ dm}^3$ ksenobiotyk w płynie wewnątrzkomórkowym (ok. 40% m.c.)
- $V_d \sim 40 \text{ dm}^3$ ksenobiotyk we wszystkich płynach ustrojowych (ok. 60% m.c.)
- V_d kilkaset dm^3 kumulacja ksenobiotyku w tkankach i jego łączenie się ze strukturami wewnątrzkomórkowymi (kompartament głęboki: tkanka tłuszczowa, kości)

Jeżeli V_d maleje to stopień wiązania ksenobiotyku z białkami krwi rośnie – wówczas występuje on tylko i wyłącznie w krwi. Natomiast, gdy wartość V_d rośnie to także rośnie stopień wiązania ksenobiotyku z białkami tkanek (Danek, 1982; Danek, 1979; Janiec i Krupińska, 1995).

Stężenie ksenobiotyku po podaniu jednorazowej dawki dożylniej można przedstawić jako funkcję czasu w skali półlogarytmicznej. Otrzymana wówczas linia prosta jest charakterystyczna dla tego modelu (Danek, 1982).

Ryc.8. Półlogarytmiczny wykres zależności stężenia ksenobiotyku we krwi od czasu (Danek, 1982).



Stała szybkości eliminacji leku K umożliwia obliczenie biologicznego okresu półtrwania ($t_{0,5}$), czyli czasu po upływie którego stężenie niezmiennego ksenobiotyku zmaleje do połowy po uprzedniej dystrybucji i przy założeniu, że eliminacja ksenobiotyku z ustroju jest procesem pierwszego rzędu. Wówczas $t_{0,5}$ jest określany równaniem:

$$t_{0,5} = \frac{0,693}{K}$$

Im większa jest wartość stałej K, tym mniejsza jest wartość $t_{0,5}$, czyli krótszy jest okres półtrwania ksenobiotyku w organizmie (ksenobiotyk jest szybciej eliminowany). Im wartość stałej K jest niższa, tym samym $t_{0,5}$ przyjmuje wartości wyższe (w organizmie jest wyższa koncentracja ksenobiotyku – wolniejsza eliminacja) (Danek, 1982). Ze wzoru wynika również jednostka stałej K – $[h^{-1}]$; wartość stałej K nie zależy od sposobu wyrażenia stężeń leku we krwi (np. mg/dm^3 lub mol/dm^3 itp.) Jest to charakterystyczna cecha jedynie stałej szybkości pierwszego rzędu (Hładoń, 1997).

Biologiczny okres półtrwania, podobnie jak stała szybkości eliminacji, jest wielkością charakterystyczną dla danego ksenobiotyku, uzależnioną jednocześnie od czynników genetycznych, wieku, płci, rasy, a nawet pozycji człowieka (stojąca, siedząca). Na wartość $t_{0,5}$ wpływa również stan fizjologiczny pacjenta oraz schorzenia, szczególnie nerek, układu krążenia, wątroby a także inhibicja lub indukacja układów enzymatycznych (Hładoń, 1997).

W celu oceny eliminacji ksenobiotyku z ustroju wprowadzono pojęcie klirensu (współczynnik oczyszczania). Klirens ogólnoustrojowy stanowi sumę klirensów narządowych, wpływających na eliminację związków. Wyraża się go stosunkiem szybkości eliminacji wprowadzonej masy ksenobiotyku (X) do jego stężenia (C) we krwi lub osoczu (Danek, 1982; Hermann, 2002).

$$Cl_s = \frac{dX / dt}{C}$$

całkując równanie w przedziale czasu od $t = 0$ do $t = \infty$ (nieskończoność) otrzymuje się:

$$Cl_s = \frac{\int_0^{\infty} (dX / dt) \cdot dt}{\int_0^{\infty} C \cdot dt}$$

gdzie licznik odpowiada całkowitej masie wyeliminowanego leku, czyli podanej dożylnie dawce D, a mianownik równa się polu pod krzywą stężenia leku AUC (area under the curve) we krwi lub osoczu jako funkcji czasu:

$$Cl_s = \frac{D}{AUC} \quad [cm^3/min]$$

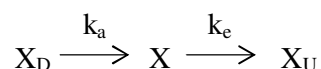
Dla obliczenia pola powierzchni pod krzywą stosowane są następujące wzory:

$$AUC = \frac{C_o}{K}$$

oraz
$$AUC = \frac{D_{iv}}{V_d \cdot K} \quad \left[\frac{mg \cdot h}{cm^3} \right]$$

Parametr AUC można wyznaczyć także planimetrycznie lub metodą trapezoidalną (Hładoń, 1997).

Dla każdej innej drogi podania ksenobiotyku, z wyjątkiem iniekcji dożylniej, można przyjąć następujący otwarty model jednokompartментowy (Hermann, 2002):



gdzie:

X – ilość (masa) ksenobiotyku w krwi

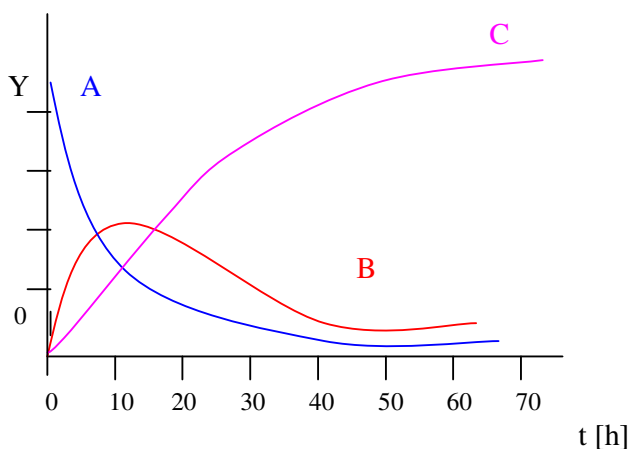
X_D – ilość (masa) ksenobiotyku w żołądku (jelicie grubym, mięśni itp.)

X_U – ilość leku wydalona do moczu

k_a – stała szybkości absorpcji ksenobiotyku pierwszego rzędu.

k_e – stała szybkości wydalania ksenobiotyku pierwszego rzędu przez nerki

Model ten można również przedstawić graficznie:



Ryc.9. Krzywe zmian stężeń leku w organizmie (Y) w czasie (t) po podaniu pozanaczyniowym (Hermann, 2002).

A – stężenie leku w żołądku

B – stężenie leku we krwi

C – kumulowana ilość leku w moczu

W jednorazowym podaniu pozanaczyniowym proces wchłaniania ksenobiotyku jest poprzedzony szeregiem zjawisk wynikających z właściwości postaci ksenobiotyku (stan skupienia, szybkość uwalniania, rozpuszczania, a także możliwy częściowy rozkład substancji czynnej). Szybkość tych zjawisk ma istotny wpływ na tzw. dostępność biologiczną ksenobiotyku (Danek, 1979; Herman i Skibińska, 1992; Hermann, 2002).

Dostępność biologiczna określa ułamek dawki ksenobiotyku dostającej się do krążenia ogólnego do szybkości z jaką ten proces zachodzi. Wyznaczenie dostępności biologicznej ksenobiotyku (zwłaszcza leku) jest szczególnie ważne, gdy dotyczy substancji trudno rozpuszczalnych w sokach trawiennych i płynach ustrojowych lub gdy podana postać leku ma zagwarantować utrzymanie pewnego minimalnego stężenia terapeutycznego we krwi przez jakiś okres czasu.

Parametrami określającymi dostępność biologiczną są :

- Wielkość powierzchni pola pod krzywą zmian stężenia ksenobiotyku we krwi (AUC);
- Maksymalne stężenie ksenobiotyku we krwi (C_{max});
- Czas, po którym zostaje osiągnięte stężenie maksymalne (t_{max}).

Dla określenia dostępności biologicznej ksenobiotyku lub nowej postaci leku należy wyznaczyć wszystkie trzy wymienione parametry (Danek, 1982; Danek, 1979).

Model jednokompartментowy dla podania pozanaczyniowego stosuje się, gdy szybkość dystrybucji znacznie przewyższa szybkość eliminacji ksenobiotyku lub gdy jest ona maskowana przez proces jego wchłaniania, przebiegający w fazie eliminacji (Danek, 1982).

Stężenie ksenobiotyku w osoczu krwi w modelu jednokompartментowym można obliczyć z wzoru Batmana (Gyamlani i wsp., 2002).

$$C = \frac{k_a * X_{D(0)}}{V_d * (k_a - k_e)} * (e^{-k_e * t} - e^{-k_a * t})$$

gdzie:

k_a – stała szybkości eliminacji [h^{-1}]

k_e – stała szybkości dystrybucji [h^{-1}]

$X_{D(0)}$ – ilość (masa) ksenobiotyku w żołądku w czasie $t = 0$

Równanie to dotyczy sytuacji, w której wprowadzona dawka ksenobiotyku uległa całkowitemu wchłonięciu do krwi, tzn. że ułamek wchłoniętej dawki $F = 1$. Gdy warunek ten nie może być spełniony, to wtedy należy wprowadzić F do powyższego równania (Gymlani i wsp., 2002):

$$C = \frac{k_a \cdot X_{D(0)} \cdot F}{V_d \cdot (k_a - k_e)} \cdot (e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t})$$

Czas, w którym stężenie substancji w osoczu osiąga wartość maksymalną jest określany jako t_{max} :

w chwili t_{max} , $C = C_{max}$

$$t_{max} = \frac{\ln\left(\frac{k_a}{k_e}\right)}{k_a - k_e}$$

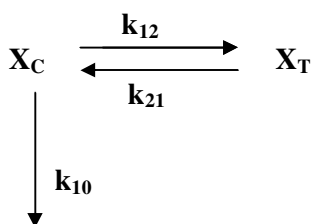
2.5.2. Otwarty model dwukompartментowy

Model dwukompartментowy jest bardziej realnym modelem farmakokinetycznym od modelu jednokompartментowego. Po podaniu dożylnym, oznaczone w krótkich przedziałach czasowych stężenie ksenobiotyku w osoczu krwi, umożliwia określenie przebiegu półlogarytmicznego wykresu zmian stężenia jako funkcji czasu i stwierdzenie czy ma on przebieg dwufazowy czy trójfazowy. Równanie opisujące taką krzywą jest równaniem dwu- lub trójwykładniczym. Szybkie i nieukładające się w linię prostą zmiany stężenia ksenobiotyku w osoczu charakteryzują fazę dystrybucji, natomiast końcowy, liniowy odcinek określa fazę jego eliminacji z ustroju. Faza dystrybucji może trwać kilka minut lub godzin, a nawet dni. Szybka dystrybucja ksenobiotyków odbywa się w narządach i tkankach silnie ukrwionych, jak wątroba i nerki.

Stężenie ksenobiotyku powinno obniżać się szybciej we wszystkich tkankach i płynach kompartментu centralnego podczas fazy dystrybucji niż podczas następnych faz. Natomiast poziom ksenobiotyku w słabiej ukrwionych tkankach (mięśnie, tkanka tłuszczowa), stanowiących kompartмент tkankowy (peryferyjny), najpierw wzrasta aż do osiągnięcia wartości maksymalnej a następnie spada podczas fazy dystrybucji. Pod koniec fazy dystrybucji zostaje osiągnięty stan równowagi w kompartmentach centralnym i peryferyjnym. Przynależność do danego kompartментu zależy często od właściwości danego ksenobiotyku (Herman i Skibińska, 1992; Hermann, 2002).

Zwykle zakłada się, że eliminacja następuje wyłącznie z kompartmentu centralnego. Podstawą tego założenia jest fakt, że miejsca biotransformacji i wydalania ksenobiotyków (wątroba, nerki) są dobrze ukrwione i dlatego łatwo dostępne dla związku znajdującego się w układzie krwionośnym.

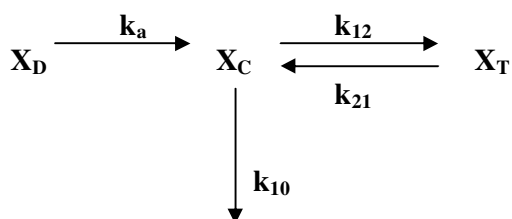
Najprostszy model dwukompartментowy dla jednorazowej dawki dożylniej można przedstawić wg następującego schematu (Hermann, 2002):



gdzie:

- X_C i X_T – masa leku w kompartmentcie centralnym i tkankowym
- k_{12} , k_{21} , k_{10} – stałe szybkości pierwszego rzędu, kolejno: dystrybucji leku z kompartmentu centralnego (1) do tkankowego (2); z tkankowego (2) do centralnego (1) i eliminacji z kompartmentu centralnego (1) na zewnątrz kompartmentu centralnego (0)

Natomiast w jednorazowej dawce pozanaczyniowej model ten jest następujący:



gdzie:

- X_D , X_C i X_T – masa leku w miejscu podania, kompartmentcie centralnym i tkankowym
- k_a , k_{12} , k_{21} , k_{10} – stałe szybkości pierwszego rzędu kolejno: absorpcji ksenobiotyku z miejsca podania do kompartmentu centralnego, dystrybucji leku z kompartmentu centralnego (1) do tkankowego (2); z tkankowego (2) do centralnego (1) i eliminacji z kompartmentu centralnego (1) na zewnątrz kompartmentu centralnego (0)

W modelu dwukompartamentowym, dla jednorazowej dawki dożyłnej, stężenie substancji w osoczu (C) w dowolnym czasie (t) można obliczyć z równania dwuwykładniczego (Hermann, 2002):

$$C = A * e^{-\alpha t} + B * e^{-\beta t} \quad (1)$$

gdzie:

α – hybryda (określa nachylenie krzywej w fazie dystrybucji),

β – hybryda (określa nachylenie krzywej w fazie eliminacji),

$(A * e^{-\alpha t})$ – wyrażenie obrazujące fazę dystrybucji,

$(B * e^{-\beta t})$ – wyrażenie obrazujące fazę eliminacji.

W celu obliczenia stałych A, B, α i β stosuje się tzw. technikę odejmowania i metodę najmniejszych kwadratów.

Wartość α jest z reguły większa od wartości β . W związku z tym, gdy wartość $A * e^{-\alpha t}$ będzie bliska zeru, stężenie ksenobiotyku w kompartmencie centralnym (osoczu) wyznacza równanie :

$$C = B * e^{-\beta t} \quad (2)$$

czyli:

$$\ln C_1 = \ln B - \beta * t \quad (3)$$

Parametry toksykokinetyczne fazy dystrybucji A i α można wyznaczyć z równania :

$$\ln C_2 = \ln A - \alpha * t \quad (4)$$

Faza dystrybucji (A) może trwać od kilku do kilkuset minut. W przypadku bardzo krótkiego okresu dystrybucji, gdy nie daje się zaobserwować na wykresie fazy α , przyjmuje się model jednokompartamentowy.

Stałe szybkości pierwszego rzędu dla procesów: dystrybucji (k_{12}), redystrybucji (k_{21}), i eliminacji (k_{10}) oblicza się z następujących równań (Gyamlani i wsp., 2002; Herman i Skibińska, 1992):

$$k_{21} = \frac{\alpha B + \beta A}{A + B} \quad (5)$$

αB

$$k_{10} = \frac{\quad}{k_{21}} \quad (6)$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10} \quad (7)$$

Stała szybkości eliminacji (k_{10}) nie określa tego samego procesu co stała β , jak to ma miejsce w przypadku modelu jednokompartimentowego. Pierwsza z nich określa eliminację substancji z kompartmentu centralnego, druga – eliminację z całego organizmu. Stała β służy do wyznaczania biologicznego okresu półtrwania $t_{0,5}$:

$$t_{0,5} = \frac{0,693}{\beta} \quad (8)$$

W przypadku podania pozanaczyniowego wzór (1) na stężenie substancji w osoczu ulega przekształceniu, dzięki któremu możemy obliczyć stężenie leku w dowolnym czasie t :

$$C = A * e^{-\alpha t} + B * e^{-\beta t} - C_0 * e^{-k_a t} \quad (9)$$

gdzie: C_0 – stężenie początkowe leku w miejscu podania pozanaczyniowego; wylicza się je ze wzoru:

$$C_0 = A + B \quad (10)$$

Wzory na pozostałe stałe, występujące w tym modelu są następujące:

$$k_{12} = \frac{A * B * (\beta - \alpha)^2}{C_0 * (A * \beta + B * \alpha)} \quad (11)$$

$$k_{21} = \frac{A * \beta + B * \alpha}{C_0} \quad (12)$$

$$k_{10} = \frac{C_0}{A/\alpha + B/\beta - C_0/k_a} = \frac{C_0}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (13)$$

$$A = \frac{(\alpha - k_{21}) * k_a}{(\alpha - \beta) * (k_a - \alpha)} \cdot \frac{X_D * F}{V_C} \quad (14)$$

$$B = \frac{(k_{21} - \beta) * k_a}{(\alpha - \beta) * (k_a - \beta)} \cdot \frac{X_D * F}{V_C} \quad (15)$$

W modelu dwukompartmentowym dla podania pozanaczyniowego obliczanie objętości dystrybucji jest dość skomplikowane. Trudność ta wynika z dystrybucji ksenobiotyku pomiędzy kompartment centralny i tkankowy, w wyniku której ilość leku w kompartmentie centralnym maleje (początkowo szybko, a później liniowo w skali półlogarytmicznej), natomiast ilość leku w kompartmentie obwodowym (tkankowym) początkowo wzrasta, osiągając pewne maksimum, a następnie maleje. Objętość dystrybucji leku obliczona w momencie osiągnięcia stanu stacjonarnego będzie inna niż po ustaleniu się fazy β i inna od obliczonej metodą ekstrapolacji (tak jak liczy się dla modelu jednokompartmentowego) oraz różna od objętości kompartmentu centralnego. Wzór na objętość dystrybucji kompartmentu centralnego przedstawiono poniżej (Herman i Skibińska, 1992):

$$V_c = \frac{k_a \cdot F \cdot D \cdot (k_{21} - k_a)}{-C_0 \cdot (\beta - k_a) \cdot (\alpha - k_a)} \quad (16)$$

gdzie:

V_c – objętość kompartmentu centralnego,

k_a – stała szybkości pierwszego rzędu dla procesu wchłaniania ksenobiotyku z miejsca podania, wyrażona w jednostce [h^{-1}],

F – ułamek dawki wchłoniętej,

D – dawka leku wyrażona w jednostce [mg],

k_{21} – stała szybkości pierwszego rzędu dla procesu dystrybucji leku pomiędzy kompartment tkankowy i centralny,

β – stała szybkości eliminacji w modelu dwukompartmentowym,

α – stała szybkości dystrybucji w modelu dwukompartmentowym.

Objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym (V_{dss}) (czyli, gdy $dT/dt=0$ wg Riggsa, gdzie T odpowiada ilości leku w kompartmentie tkankowym) określa się wzorem (Hermann, 2002):

$$V_{dss} = \frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} \cdot V_c \quad (17)$$

gdzie:

k_{12} – stała szybkości pierwszego rzędu dla procesu dystrybucji leku pomiędzy kompartment centralny i tkankowy.

Znając V_c i V_{dss} można wyliczyć V_T , czyli objętość dystrybucji w kompartmentie tkankowym:

$$V_T = V_{dss} - V_c \quad (18)$$

Wykorzystując do obliczeń objętości dystrybucji wielkość pola powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku w krwi, otrzymamy wzór:

$$V_{d(area)} = \frac{D \cdot F}{AUC \cdot \beta} \quad (19)$$

gdzie:

AUC – pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia mierzonym od czasu $t = 0$ do $t = \infty$, wyrażone w jednostce $[\text{mg} \cdot \text{h}/\text{dm}^3]$.

Jak wykazał Gibaldi, objętość dystrybucji obliczona w ten sposób jest równa objętości dystrybucji obliczonej dla sytuacji, gdy mamy do czynienia wyłącznie z fazą β eliminacji :

$$V_{d\beta} = \frac{Cl_{total}}{\beta} \quad (20)$$

Objętość $V_{d\beta}$ można więc przyrównać do $V_{d(area)}$:

$$V_{d\beta} \cong V_{d(area)} \quad (21)$$

Parametr ten określa objętość zastępczego modelu jednokompartamentowego, o stałej prędkości eliminacji β , który ma ten sam klirens co rozpatrywany model dwukompartamentowy. Klirens całkowity Cl_{total} wylicza się z przekształcenia powyższego wzoru (Gibaldi i wsp., 1971; Hermann, 2002):

$$Cl_{total} = V_{d(area)} \cdot \beta \quad (22)$$

i wyraża się w jednostce $[\text{dm}^3/\text{h}]$.

Klirens jest to objętość osocza, która w jednostce czasu jest całkowicie oczyszczona z danej substancji X w wyniku wydzielniczej czynności nerek. Wielkość tę można wyliczać również z poniższego równania (Gu i wsp., 2005):

$$Cl = \frac{U_x \cdot V}{P_x} \quad (23)$$

gdzie:

U_x – stężenie substancji X w moczu,

P_x – stężenie formy nie związanej w osoczu

V – objętość moczu wydalana w jednostce czasu [dm^3/h].

Do obliczenia szybkości przesączania kłębuszkowego (GFR) stosuje się substancje, które są całkowicie przesączone przez kłębki, dla których wydalanie, jak i wchłanianie zwrotne nie odgrywają żadnej roli, a klirens zależy wyłącznie od przesączenia. Substancją taką jest m.in. inulina, której klirens jest w zasadzie równy GFR. Jeżeli klirens substancji X jest niższy od GFR, to należy sądzić, że nerka nie jest w stanie jej eliminować w wystarczającym stopniu. Wartość klirensu większa od GFR wskazuje na aktywne wydalanie ksenobiotyku do światła cewek nerkowych. Wartość GFR u człowieka wynosi w przybliżeniu $120 \text{ cm}^3/\text{min}$ (Gu i wsp., 2005; Janiec i Krupińska, 1995).

Czas, w którym stężenie substancji w osoczu osiąga wartość maksymalną (t_{\max}) oblicza się z wzoru:

$$t_{\max} = \frac{\ln \left[\frac{k_a}{\alpha} \right]}{k_a - \alpha} \quad (24)$$

i wyraża w godzinach [h].

Stężenie maksymalne C_{\max} można wyliczyć ze wzoru (9), podstawiając za $t - t_{\max}$.

Zmiany stężenia ksenobiotyku w osoczu, badane jako funkcja czasu, można uważać za procesy podlegające prawom prawdopodobieństwa i statystyki. W farmakokinetyce stosuje się teorię momentów statystycznych (zerowy, pierwszy, drugi) niezależnych od modelu lub tzw. bezmodelowych. Jednym z momentów statystycznych jest tzw. średni czas przebywania ksenobiotyku w organizmie (MRT; Mean Residence Time). Stanowi on statystyczny odpowiednik biologicznego okresu półtrwania i przedstawia się wzorem:

$$\text{MRT} = \frac{C_o}{K^2} \cdot \frac{K}{C_o} = \frac{1}{K} \quad (25)$$

$$\text{czyli:} \quad t_{0,5} = 0,693 \cdot \text{MRT} \quad [\text{h}] \quad (26)$$

Przez MRT rozumie się w procesach pierwszego rzędu czas niezbędny do wyeliminowania 63,21% podanej dawki (Gyamlani i wsp., 2002; Hermann, 2002).

2.6. Toksyczne uszkodzenia wątroby

2.6.1. Enzymy biorące udział w biotransformacji ksenobiotyków

Wątroba spełnia główną rolę w biotransformacji ksenobiotyków zarówno endo- jak i egzogennych. Zachodzi tu wiele przemian, tj. białkowa, węglowodanowa, tłuszczowa, barwnikowa z procesami odtruwania oraz wytwarzania i wydzielania żółci (Bogdanik, 1998).

Większość ksenobiotyków, których przemiany zachodzą w wątrobie to substancje niepolarne, lipofilne. Tylko niewielka liczba substancji organicznych nie ulega biotransformacji. Należą do nich związki silnie polarne (kwas szczawiowy, czwartorzędowe zasady amoniowe) lub bardzo lotne (eter etylowy), które szybko ulegają wydaleniowi przez nerki lub płuca (Bogdanik, 1998).

Enzymy mikrosomalne hepatocytów biorą udział w reakcjach pierwszej fazy biotransformacji, tj. utleniania, redukcji i hydrolizy oraz reakcjach drugiej fazy, czyli sprzęgania (biosyntezy). Enzymy biorące udział w utlenianiu ksenobiotyków są zaliczane do monooksygenaz (oksydazy o funkcji mieszanej). Katalizują one także inne reakcje i reagują ze związkami o bardzo różnej budowie. Jedynym warunkiem jest lipofilny charakter ksenobiotyków, dzięki któremu mogą one przenikać w głąb siateczki śródplazmatycznej, w której zlokalizowane są monooksygenazy. Mimo, że monooksygenazy charakteryzują się małą liczbą cykli i wydajnością reakcji, to jednak katalizowane przez nie reakcje są bardzo efektywne, co wynika z ich dużej zawartości w narządach istotnych dla biotransformacji. Najwyższe stężenie monooksygenaz występuje w siateczce śródplazmatycznej hepatocytów, gdzie stanowią około 20% ogólnej zawartości białka. Głównymi monooksygenazami siateczki śródplazmatycznej są enzymy grupy cytochromu P-450, w skład którego wchodzi: cytochrom P-450, reduktaza NADPH-cytochrom P-450 oraz czynnik fosfolipidowy (Bogdanik, 1998; Desta i wsp., 2001).

Cytochrom P-450 jest hemoproteiną zbudowaną z apoproteiny i żelazoproporfiryny IX będącą grupą prostetyczną. Ksenobiotyk najczęściej wiąże się z częścią hydrofobową apoproteiny, ale może również łączyć się z atomem żelaza (Fe^{2+}) grupy prostetycznej.

Cytochrom P-450 występuje w postaci wielu izoenzymów, które różnią się od siebie budową apoproteiny, właściwościami spektralnymi i immunologicznymi oraz masą cząsteczkową (47000 – 550000). Każdy z izoenzymów charakteryzuje się szeroką specyfiką substratową. Ich obecność w poszczególnych tkankach i narządach zależy od gatunku, płci, wieku. W ostatnich latach wyizolowano i scharakteryzowano geny kodujące poszczególne rodzaje cytochromu P-450. Pierwsze cztery rodziny genów cytochromu P-450 są zlokalizowane głównie w siateczce śródplazmatycznej wątroby i biorą udział w biotransformacji ksenobiotyków. Izoenzymy 1A1 i

1A2 są indukowane przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, izoenzymy 1B1 i 1B2 przez fenobarbital, izoenzymy 4A1 i 4A2 przez klofibrat i leki hipoglikemiczne, izoenzym 2E1 przez etanol i aceton. W mitochondriach występuje CYP 11. Cztery rodziny CYP 17, CYP 19, CYP 20 i CYP 22 biorą udział głównie w biosyntezie hormonów steroidowych (Dyderski, 1997; Emoto i wsp., 2000; Poulsen i wsp., 1991; Seńczuk, 1994; Zakia, 2008).

CYP2E1 jest jedynym genem ludzkiej podrodziny CYP2E. Wykryto kilka odmian polimorficznych tego genu. Największe ilości można znaleźć w centralnych częściach wątroby. To nierównomierne rozmieszczenie *CYP2E1* może wyjaśniać, dlaczego niektóre hepatotoksyczne związki w pierwszym rzędzie powodują uszkodzenie właśnie tego regionu wątroby (Pendyala i Creaven, 1995).

2.6.2. Diagnostyka toksycznych uszkodzeń wątroby – metody biochemiczne

Toksyczne uszkodzenie wątroby może być wynikiem bezpośredniego działania ksenobiotyku uszkadzającego struktury protoplazmatyczne. Działanie hepatotoksyczne pojawia się po skumulowaniu określonej dawki, a siła działania zależy od jej wielkości.

Pomimo znacznego postępu w badaniach diagnostycznych, jak dotąd nie znaleziono idealnego biomarkera, który pozwalałby na ocenę stopnia uszkodzenia wątroby. Zróżnicowanie czynnościowe oraz znaczne zdolności kompensacyjne wątroby sprawiają, iż zaburzenia biochemiczne stwierdza się dopiero przy zaawansowanych zmianach jej struktury.

Obecnie w diagnostyce schorzeń wątroby stosowane są 3 grupy biomarkerów. Żadna z tych grup nie może być jednak uważana za bardziej czułą niż pozostałe, gdyż umożliwia ocenę innego zakresu czynności narządu. Stąd w postępowaniu diagnostycznym wykorzystuje się szereg różnych prób i na ich podstawie ocenia się łącznie funkcję wątroby (James i wsp., 2003; Kokot, 1996).

- I. Próby czynnościowe – polegają na ocenie zdolności syntetycznych oraz funkcji komórek wątrobowych. Próby te opierają się na metabolizmie barwników żółciowych, syntezie albumin oraz czynników krzepnięcia krwi. Obejmują także oznaczenia stężenia albumin w surowicy, czasu protrombinowego i czynników układu krzepnięcia krwi, stężenia aminokwasów w surowicy oraz porfiryn w moczu. Ponadto do oceny wykorzystuje się oznaczanie poziomu glikoprotein, estrów cholesterolu i transferyny w surowicy.
- II. Próby klirensowe – o charakterze dynamicznym, związane są z odtruwającą i wydalniczą rolą wątroby. Opierają się one na badaniach eliminacji z krwi substancji egzogennych i endogennych np. próba hipurowa, bromosulfoftaleinowa, z zielenią indocyjanową. Klirens wątrobowy tych barwników koreluje z nasileniem i rozległością uszkodzeń

wątroby. Klirens zieleni indocyjanowej pozwala na ocenę zmian w wątrobowym przepływie krwi oraz zdolności jej wychwytywania z krążenia przez hepatocyty. Badania przy zastosowaniu stopniowo większych dawek barwnika są wykorzystywane do ilościowego czasowego monitorowania poprawy stanu czynnościowego wątroby.

III. Próby enzymatyczne – o charakterze statycznym, stosowane w różnych układach mają w chwili obecnej największe znaczenie. Enzymami najczęściej stosowanymi w diagnostyce wątroby są aminotransferaza alaninowa (AlAT), aminotransferaza asparaginianowa (AspAT), dehydrogenaza mleczanowa (LDH), γ -glutamylotranspeptydaza (GGTP) oraz esteraza cholinowa, fosfataza zasadowa (AP) i ceruloplazmina. Za specyficzne wskaźniki uważa się dehydrogenazę sorbitolową (SDH) i dehydrogenazę izocytrynianową (ICD). Oznaczenie aktywności AlAT, AspAT, LDH w surowicy krwi określa stopień przepuszczalności błony hepatocyta w procesie chorobowym. Natomiast zmiany w aktywności fosfatazy zasadowej, stężenia bilirubiny w surowicy, wskazują na schorzenia wątroby typu cholestatycznego, związane z uszkodzeniem dróg odprowadzających żółć. Czułymi wskaźnikami wydolności wątroby są także cholinesteraza i GGTP.

Ogólnie enzymy dzieli się na:

1. wskaźnikowe (indykatorowe) – nie występują w surowicy krwi lub ich aktywność jest niewielka. Po uszkodzeniu komórek przedostają się do krwi. Enzymy te mogą być narządowo swoiste lub nieswoiste. Enzymy cytoplazmatyczne pojawiają się we krwi już przy niewielkich uszkodzeniach błon komórkowych, np. aminotransferaza alaninowa (AlAT), aminotransferaza asparaginianowa (AspAT), γ -glutamylotranspeptydaza (GGTP), dehydrogenaza sorbitolowa (SDH), dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Enzymy te związane z siateczką endoplazmatyczną, mitochondriami, rybosomami i lizosomami pojawiają się w krwiobiegu jedynie w przypadku bardzo dużych uszkodzeń wątroby - dehydrogenaza glutaminianowa (GLDH).
2. wydzielnicze (sekrecyjne) – są syntetyzowane w rybosomach komórek, głównie wątroby, a następnie wydzielane do krwi. Wykazują zmniejszoną aktywność w surowicy krwi w uszkodzeniu hepatocytów np. esteraza cholinowa.
3. wydalnicze (ekskrecyjne) – występują w niewielkich ilościach w surowicy krwi. Są wydalane przez wątrobę do żółci, dlatego w uszkodzeniu narządu bądź upośledzonym odpływie żółci zwiększa się ich stężenie w surowicy np. fosfataza zasadowa (AP), ceruloplazmina.

Aminotransferazy alaninowa (AlAT) i asparaginianowa (AspAT) występują głównie w sercu, wątrobie, mięśniach, nerkach, erytrocytach, trzustce i mózgu. Jako enzymy cytoplazmatyczne stanowią czuły wskaźnik procesów chorobowych, ponieważ pojawiają się w krwi już przy niewielkim uszkodzeniu błony komórkowej. Podwyższone aktywności enzymów w

osoczu wskazują raczej na uszkodzenie komórek, niż na zaburzenie funkcji narządu. W ostrym uszkodzeniu wątroby aktywność aminotransferaz może wzrastać 50 do 100-krotnie. Najwyższe wartości, jako dominujący enzym cytozolowy, osiąga AlAT. W diagnostyce jest także stosowany wskaźnik de Ritisa (jest to stosunek AspAT/AlAT). W schorzeniach ostrych wartość wskaźnika Ritisa jest większa od 1, natomiast w schorzeniach przewlekłych nie przekracza jedności. Cytozolowa AspAT pojawia się w osoczu w przebiegu zawału serca i uszkodzenia wątroby. Następnie pojawia się forma mitochondrialna enzymu. Przenikanie mitochondrialnej formy AspAT przez błonę jest związane z utratą zdolności do fosforylacji oksydatywnej i wiąże się ze śmiercią komórki. Przyjmuje się, że błona komórkowa jest w większym stopniu podatna na długotrwały niszczący proces niż błona mitochondrialna.

Najwyższe aktywności aminotransferaz występują zwykle po 72 godzinach od momentu zatrucia. U ludzi aktywność AlAT w surowicy wynosi 3-16 U/dm³ a AspAT 6-22 U/dm³. Oba enzymy stanowią czuły, aczkolwiek nieswoisty wskaźnik. Czas półtrwania AlAT w surowicy wynosi 47 ± 10 godzin, a AspAT 17 ± 5 godzin. W okresie zdrowienia aktywność AlAT jest wyższa od AspAT. Związane jest to z wolniejszą eliminacją AlAT z układu krążenia (James i wsp., 2003).

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem cytozolowym, tetramerem zbudowanym z dwóch podjednostek (H – przemiany oksydacyjne, M – przemiany beztlenowe). Ze względu na różne kombinacje wyróżnia się pięć izoenzymów: LDH₁₋₂ występują w sercu i erytrocytach, LDH₄₋₅ w wątrobie, LDH₃ w mięśniach szkieletowych, LDH₂₋₄ w innych narządach oraz tkankach nowotworowych. Izofornie różnią się nie tylko miejscem występowania, ale także właściwościami fizyko-chemicznymi, kinetycznymi i biologicznymi, przy czym najistotniejszy jest czas półtrwania, który może się wynosić od 100 godzin dla LDH₁ do 10 godzin dla LDH₅. Różni je także ruchliwość elektroforetyczna – izoenzym, który najszybciej wędruje do anody określany jest LDH₁, a najwolniej - jako LDH₅. W ostrym zapaleniu wątroby początkowo wzrastają jedynie izoenzymy LDH₄₋₅, dopiero po pewnym czasie pojawiają się pozostałe izofornie. Choroby przewlekłe charakteryzują się podwyższeniem aktywności LDH₅ i LDH₁. U osób z marskością wątroby występuje głównie LDH₃. Zwiększenie aktywności LDH₅ świadczy o istnieniu ognisk martwicy. LDH₁ jest czułym markerem zawału serca, ze względu na jego swoistość i wydłużoną obecność w osoczu. Zawartość enzymu w surowicy w przebiegu chorób może wzrastać 10 do 20-krotnie, np. w przypadku WZW, nowotworów, zatorów płuc. Prawidłowa aktywność LDH w surowicy ludzi wynosi 120-240 U/dm³.

Dehydrogenaza sorbitolowa (SDH) występuje głównie w cytoplazmie komórek wątrobowych, a w mniejszych ilościach w prostaty, nerkach, śledzionie i mięśniach. Jest hamowana przez cyjanki, cysteinę, glutation. SDH jest wysoce selektywnym wskaźnikiem

uszkodzenia hepatocytów. Wzrost aktywności SDH obserwuje się w toksycznym uszkodzeniu bądź ostrym zapaleniu wątroby. Dochodzi wtedy do 10 do 30-krotnego podwyższenia zawartości enzymu w surowicy. Aktywność enzymu w surowicy krwi wzrasta także w wirusowym zapaleniu wątroby, chorobach trzustki i dróg żółciowych. Wadą tego parametru jest szybki spadek aktywności SDH w porównaniu z AlAT i AspAT. W przewlekłym zapaleniu i marskości wątroby nie obserwuje się zmian aktywności dehydrogenazy sorbitolowej. Wartości prawidłowe u ludzi wynoszą 0-2,8 U/dm³.

Dehydrogenaza izocytrynianowa (ICD) posiada dwie izoformy, cytozoolową związaną z NADP i mitochondrialną wykorzystującą NAD, których najwyższe aktywności obserwuje się w hepatocytach. Ponadto w mniejszych ilościach ICD występuje w sercu, mięśniach szkieletowych, nerkach, krwinkach, jelitach i nadnerczach. W surowicy występuje izoenzym cytoplazmatyczny. Wzrost aktywności ICD w surowicy świadczy o uszkodzeniu miększu w wątroby. 10 do 20-krotne podwyższenie zawartości enzymu obserwuje się w przebiegu WZW a 2 do 4-krotne w marskości wątroby. Może pojawić się również w przypadku przerzutów raka do wątroby. Wartości prawidłowe u ludzi wynoszą 1,1-6,3 U/dm³ (Anderson i wsp., 2000; Bogdanik, 1998; Borowski i wsp., 1986; Hanna i wsp., 1989; Łuczak i wsp., 1976; Stewart i wsp., 1974; Tee i wsp., 1987; Thabrew i wsp., 1995).

Glutation (GSH, *gamma-glutamyl-L-cysteinylglycine*) jest trójpeptydem zbudowanym z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Ma właściwości przeciwutleniające (dzięki odwracalnej reakcji odrywania lub przyłączania elektronów), co umożliwia regenerację grup tiolowych -SH w białkach, w których uległy one utlenieniu do grup sulfonowych -SO₃H lub wiązań disiarczkowych -S-S-. Bierze też udział w procesie oddychania i jest koenzymem niektórych enzymów oksydo-redukcyjnych. W formie zredukowanej, dzięki wolnej grupie tiolowej służy do redukcji nadtlenków (np. nadtlenku wodoru). Wychwytuje reaktywne czynniki elektrofilowe ochraniając komórki przed uszkodzeniem ze strony toksyn.

Glutation koncentruje się głównie w wątrobie, gdzie odgrywa funkcje głównego czynnika detoksyfikacyjnego - umożliwia m.in. usuwanie z ustroju związków azotowych i chlorowcopochodnych toksyn. Nadmierne lub długotrwałe podawanie paracetamolu, przy równoczesnej małej podaży metioniny w pokarmie powoduje zużycie glutationu zawartego w ustroju, co z kolei jest przyczyną martwicy wątroby. Żywność bogata w glutation to: awokado, szparagi, brokuły, brukselka, czosnek, cebula, kapusta (najlepiej stosować soki z tych warzyw) (Martensson i wsp., 1990).

Glutation, jako antyoksydant neutralizuje wolne rodniki w wątrobie, detoksyfikuje pestycydy (nawet do 60%), stabilizuje błony lizosomów i hamuje uwalnianie katabolicznych enzymów lizosomalnych. Jako transporter aminokwasów w cyklu gamma glutamylowym,

ułatwia syntezę białka i sprzyja tworzeniu dodatniego bilansu azotowego. Zwiększa uwodnienie komórek oraz zasoby glikogenu mięśniowego. Zwiększa poziom hormonu wzrostu, obniża poziom kortyzolu, przyspiesza redukcję tkanki tłuszczowej, wspomaga odporność, łagodzi objawy zmęczenia, obniża poziom kwasu mlekowego.

Zredukowany glutation jest syntetyzowany w każdej komórce organizmu w obecności witaminy C i N-acetylocysteiny, dlatego aminokwas endogenny, jakim jest cysteina musi być dostarczany z pożywieniem. Zredukowany glutation jest przeciwutleniaczem pełniącym wiele funkcji komórkowych, takich jak detoksyfikacja, transport aminokwasów, produkcja koenzymów oraz przemiany witamin E i C. Glutation jest substancją wykorzystywaną, na poziomie komórkowym, na pierwszym miejscu w obronie organizmu. Odgrywa on kluczową rolę w funkcjonowaniu oraz rozmnażaniu limfocytów. Przy nieodpowiednim poziomie glutationu komórki "popęniają samobójstwo" poddając się procesowi nazywanemu zaprogramowaną śmiercią komórkową (apoptoza). Niestety wraz z wiekiem poziom glutationu obniża się.

Niski poziom glutationu we krwi wskazuje na stan chorobowy. Glutation jest naturalną substancją przeciwutleniającą, a spadek jego poziomu oznacza, że organizm nie radzi sobie z usuwaniem wolnych rodników, uszkadzających komórki w mózgu, wątrobie i innych narządach. Dochodzą do tego problemy z trawieniem pokarmów i spadek odporności organizmu.

3. Cel pracy, hipotezy badawcze

Paracetamol jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwbólowym i przeciwgorączkowym, skutecznym w zalecanych dawkach. Jest lekiem ogólnodostępnym przeznaczonym do odręcznej sprzedaży w aptekach, również w różnego rodzaju placówkach handlowych, w tym w super- i hipermarketach, kioskach, czy na stacjach benzynowych. Duża liczba preparatów farmaceutycznych, o różnych nazwach handlowych, zawierających w swoim składzie paracetamol, stwarza jednak ryzyko wystąpienia nieumyślnych zatruć tym lekiem, co w konsekwencji może doprowadzić do poważnych uszkodzeń wątroby i nerek. Ryzyko to wzrasta w przypadku równoczesnego narażenia na inne związki działające jako induktory lub inhibitory ustrojowych przemian metabolicznych. Związkiem takim może być trichloroetylen, który podobnie jak paracetamol, ulega biotransformacji przy udziale tych samych izoenzymów cytochromu P-450 (CYP 2E1, CYP 1A1/2). Jednoczesne narażenie na te ksenobiotyki może prowadzić do wystąpienia interakcji, których efektem może być między innymi wpływ na parametry farmakokinetyczne paracetamolu a także nasilenie jego hepatotoksycznego działania.

W leczeniu zatruć ostrych paracetamolem standardowo w terapii stosuje się N-acetylocysteinę, której hepatoprotekcyjne działanie związane jest między innymi z uzupełnianiem rezerw endogennego glutationu, niezbędnego w procesie detoksykacji toksycznego, aktywnego metabolitu (N-acetylo-p-benzochinonoiminy) leku.

Działanie N-acetylocysteiny zostało dobrze opisane, niemniej brak jest danych o skuteczności stosowania NAC w zatruciach mieszanych paracetamolem i trichloroetylenem.

Celem podjętych badań eksperymentalnych było ocena farmakokinetyki paracetamolu po narażeniu łącznym z trichloroetylenem oraz wykazanie i porównanie skuteczności terapeutycznej N-acetylocysteiny w ostrym zatruciu łącznym tymi ksenobiotykami. W związku z założonym celem badań sformułowano główną hipotezę badawczą:

Trichloroetylen istotnie zmienia farmakokinetykę paracetamolu oraz nasila jego działanie hepatotoksyczne a N-acetylocysteina, standardowo stosowana w leczeniu ostrych zatruć paracetamolem, wykazuje podobną skuteczność również w przypadku zatruć mieszanych paracetamolem i trichloroetylenem.

Ponadto sformułowano szczegółowe hipotezy badawcze:

1. Pomędzy badanymi ksenobiotykami zachodzą interakcje kinetyczne prowadzące do zmian w wielkościach parametrów farmakokinetycznych paracetamolu.
2. Trichloroetylen i NAC zmieniają profil metaboliczny paracetamolu.
3. Łączne narażenie na paracetamol i trichloroetylen zwiększa działanie hepatotoksyczne leku.

4. Zatrucie łączne paracetamolem i trichloroetylenem prowadzi do wzrostu aktywności układu mikrosomalnego, w tym wybranych izoform cytochromu P-450.
5. N-acetylocysteina, niezależnie od czasu wprowadzenia do terapii, wykazuje podobną skuteczność hepatoprotekcyjną w przypadku łącznego zatrucia ostrego paracetamolem i trichloroetylenem.

Założony cel badań i wyznaczone hipotezy badawcze zrealizowano w oparciu o ocenę u zwierząt doświadczalnych następujących parametrów:

1. stężenia paracetamolu w osoczu krwi
2. stężenia paracetamolu i jego glukuronidu w moczu.
3. aktywności enzymów (ALAT, AspAT, LDH, SDH, ICD) wykorzystywanych w diagnostyce laboratoryjnej, jako biomarkery uszkodzenia wątroby.
4. układu enzymów mikrosomalnych zależnych od cytochromu P-450 i wybranych izoform CYP450 oraz stężenia glutationu w wątrobie.

Uzyskane dane pozwoliły na prześledzenie losów paracetamolu w organizmie, oraz ich matematyczną interpretację. Ponadto, posłużyły do oceny funkcji wątroby oraz wpływu na układ enzymów mikrosomalnych biorących udział w biotransformacji paracetamolu do toksycznego metabolitu, który podlega detoksykacji w reakcjach sprzęgania z endogennym glutationem.

4. Część doświadczalna

4.1. Schemat doświadczenia

4.1.1. Zwierzęta

Badania przeprowadzono na 180 szczurach, samcach szczepu Wistar, o masie ciała 290 ± 10 g, pochodzących z hodowli Katedry Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zwierzęta karmiono standardową paszą laboratoryjną Murigran z dostępem do wody *ad libitum*.

Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej nr 17/2003 z dnia 5 maja 2003 roku.

4.1.2. Przebieg badań

Badania wykonano w dwóch etapach. W pierwszym etapie podawano jednorazowo zwierzętom sondą dożołądkową paracetamol (APAP), trichloroetylen (TRI) i N-acetylocysteinę (NAC) w 2,5 % roztworze glukozy o objętości 5 cm^3 . Paracetamol pojedynczo lub łącznie z trichloroetylenem podawano równocześnie, natomiast N-acetylocysteinę w dwóch wariantach czasowych, tj. równocześnie (0h) lub po dwóch godzinach (2h) od podania ksenobiotyków. Paracetamol podawano w dawkach 250 i 500 mg/kg m.c., trichloroetylen w dawce 250 mg/kg m.c., N-acetylocysteinę w dawce 150 mg/kg m.c. Badania przeprowadzono w 6 grupach doświadczalnych wg następującego schematu:

Grupa I – APAP

- a) APAP – 250 mg/kg m.c.
- b) APAP – 500 mg/kg m.c.

Grupa II – APAP łącznie z N-acetylocysteiną

- a) APAP – 250 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c.(0h)
- b) APAP – 500 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c.(0h)

Grupa III – APAP i po 2 godzinach N-acetylocysteina

- a) APAP – 250 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c.(2h)
- b) APAP – 500 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c.(2h)

Grupa IV – APAP łącznie z TRI

- a) APAP – 250 mg/kg m.c., TRI – 250 mg/kg m.c.
- b) APAP – 500 mg/kg m.c., TRI – 250 mg/kg m.c.

Grupa V – APAP łącznie z N-acetylocysteina i TRI

- a) APAP – 250 mg/kg m.c., TRI – 250 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c. (0h)
- b) APAP – 500 mg/kg m.c., TRI – 250 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c. (0h)

Grupa VI – APAP łącznie z TRI i po 2 godzinach N-acetylocysteina

- a) APAP – 250 mg/kg m.c., TRI – 250 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c. (2h)
- b) APAP – 500 mg/kg m.c., TRI – 250 mg/kg m.c., NAC – 150 mg/kg m.c. (2h)

Po podaniu ksenobiotyków zwierzęta umieszczono w klatkach metabolicznych. Mocz do badań zbierano w porcjach po 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 i 72 godzinach od podania ksenobiotyku. Po zmierzeniu objętości próbki, mocz przechowywano w lodówce do chwili wykonania oznaczeń stężenia niezmienionego paracetamolu oraz glukuronidu paracetamolu.

W drugim etapie zwierzęta podzielono na identyczne grupy I-VI. Zwierzęta również otrzymywały dożołądkowo paracetamol, TRI i NAC w 2,5 % roztworze glukozy o objętości 5 cm³ w jednorazowej dawce pojedynczo lub łącznie. Zwierzęta kontrolne, hodowane w tych samych warunkach, otrzymywały sondą dożołądkowo 2,5% roztwór glukozy. Po upływie czasu: 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 90 minut oraz 4, 12, 24, 48 i 120 godzinach zwierzęta usypiano w lekkiej narkozie eterowej. Pobierano krew z serca do badań, a następnie oznaczano w surowicy stężenie APAP metodą TDx i aktywność enzymów (biomarkerów uszkodzenia wątroby). W wątrobach oznaczono aktywność układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P450 (stężenie wątrobowego cytochromu P-450, cytochromu b₅ oraz aktywność współpracujących z nimi reduktaz) oraz stężenie białka i glutationu całkowitego. Ponadto w wybranych grupach oznaczono izoenzymy cytochromu P-450: CYP 2E1, CYP 2B1/2 oraz CYP1A2. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

4.2. Oznaczanie paracetamolu w krwi i moczu

4.2.1 Metoda oznaczania paracetamolu w surowicy krwi

Paracetamol oznaczano immunologiczną metodą fluorescencyjno – polaryzacyjną TDx/FLx na aparacie firmy Abbott. Badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Farmacji Klinicznej Akademii Medycznej w Poznaniu.

4.2.1.1 Zasada metody

Immunologiczna metoda fluorescencyjno – polaryzacyjna (FPIA – Fluorescence Polarization ImmunoAssay) oparta jest na zjawisku wzbudzenia cząsteczek antygenu znakowanego fluoroforem o osiach równoległych do płaszczyzny światła spolaryzowanego. Cząsteczki te rotują między stanami wzbudzenia i emisji, będąc źródłem promieniowania fluorescencyjnego niespolaryzowanego. Stopień depolaryzacji jest uzależniony od szybkości rotacji, która jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości cząsteczek rotujących. Związanie małowcząsteczkowego znakowanego fluoroforem antygeny z przeciwciałem, w przeciwieństwie do wolnego antygeny, powoduje znaczne zahamowanie rotacji, a więc promieniowanie fluorescencyjne stanowi w dalszym ciągu przede wszystkim światło spolaryzowane. Nieznany antygen (lek), konkuruje z antygenem znakowanym fluoroforem o miejsce wiążące przeciwciała. W ten sposób stopień depolaryzacji emitowanego promieniowania fluorescencyjnego, jest proporcjonalny do stężenia leku obecnego w próbie.

Stężenie APAP odczytuje się z wykresu kalibracyjnego stworzonego na potrzeby tego testu.

4.2.1.2 Odczynniki

Zestaw odczynników do oznaczania paracetamolu przy użyciu aparatu TDx/FLx firmy Abbott (USA).

1. Roztwory do oznaczania paracetamolu P, S, T (Paracetamol Reagent Pack):
 - P – roztwór o działaniu powierzchniowym w buforze
 - S – przeciwciała paracetamolu w buforze
 - T – paracetamol znaczone fluoresceiną w buforze z roztworem o działaniu powierzchniowym
- Roztwory konserwowane 0,1% azotynem sodowym.

2. Roztwory kalibracyjne paracetamolu A, B, C, D, E, F w surowicy ludzkiej (Paracetamol Calibrators) [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]:

A – 0,0 D – 50,0
B – 10,0 E – 100,0
C – 20,0 F – 200,0

- Roztwory konserwowane 0,1% azotynem sodowym.

3. Roztwory kontrolne paracetamolu L, M, H w surowicy ludzkiej [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]:

L – 13,5 – 16,5
M – 31,5 – 38,5
H – 135,0 – 165,0

- Roztwory konserwowane 0,1% azotynem sodowym.

4.2.1.3 Tok postępowania

Do plastikowych pojemników umieszczonych w kolektorze prób, odmierzano 100 μl badanej surowicy. Następnie kolektor wraz z zestawem odczynników do oznaczeń paracetamolu wstawiono do aparatu TDx/FLx, dokonującego samoczynnie pomiaru stężeń APAP w kolejnych próbach.

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ($X \pm \text{SD}$) z trzech niezależnych pomiarów.

Zakres stężeń paracetamolu w met.TDx możliwych do oznaczeń waha się pomiędzy 1,00 (czułość metody) a 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (roztwór kalibracyjny F). Odczyt wyższych stężeń jest możliwy po wykonaniu „protokołu rozcieńczeń”.

Precyzja metody TDx została określona na podstawie 9 różnych odczytów dla 5 prób o stężeniach 15 i 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ oraz 10 odczytów dla 5 prób o stężeniu 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$:

stężenie [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	15	35	150
(n =)	45	50	45
średnia \pm SD	14,70 \pm 0,72	36,33 \pm 1,10	145,68 \pm 5,73
błąd [%]	4,92	3,03	3,93

4.2.1.4. Metodyka obliczeń farmakokinetycznych.

Dla wyznaczenia niezbędnych parametrów farmakokinetycznych zastosowano metodę dekompozycji graficznej, polegającą na wielokrotnym stosowaniu regresji liniowej.

Przy opisie stężenia w kompartmentcie centralnym modelu n -kompartmentowego wg wzoru:

$$c_I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-a_i t} \quad (27)$$

gdzie:

c_I – stężenie w czasie (t),

t – czas,

A_i, a_i – współczynniki;

i spełnieniu warunku:

$$a_1 \gg a_2 \dots \gg a_n$$

możliwe jest oddzielne analizowanie odcinków przebiegu $\ln c_I(t) = f(t)$ i kolejne wyznaczenie par współczynników A_i, a_i (Chien i wsp., 1997; Gu i wsp., 2005; Gyamlani i wsp., 2002).

Po przekształceniu wzoru (27) dla modelu dwukompartmentowego otrzymuje się:

$$c_I(t) = A_2 e^{-a_2 t} \left[1 + \frac{A_1}{A_2} e^{-(a_1 - a_2)t} \right] \quad (28)$$

Jeżeli a_1 jest znacznie większe od a_2 , wtedy dla dużych wartości czasu t składnik wykładniczy w nawiasie kwadratowym można pominąć. Po zlogarytmowaniu uzyskuje się wzór:

$$\ln c_I(t) \approx \ln A_2 - a_2 t \quad (29)$$

Jest to znane równanie linii prostej

$$y = b - ax \quad (30)$$

gdzie:

a – współczynnik kierunkowy prostej,

b – punkt przecięcia z osią y dla $x = 0$

x, y – współrzędne;

n punktów pomiarowych o współrzędnych $x_1, y_1 \dots x_n, y_n$. W celu znalezienia parametrów równania korzysta się z zależności:

$$a = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (31)$$

$$b = \frac{\sum y}{n} - a \frac{\sum x}{n} \quad (32)$$

Zastosowana metoda nosi nazwę metody najmniejszych kwadratów (Court i wsp., 2001; Gyamlani i wsp., 2002).

Pierwszym krokiem w metodzie regresji liniowej jest wyznaczenie z krzywej punktów należących do fazy eliminacji, gdzie:

$$-a = \beta$$

$$b = \ln C_0$$

$$-e^b = A_2$$

$$\ln C = b - At$$

Dla wartości t leżących na krzywej obrazującej fazę absorpcji i dystrybucji oblicza się stężenie regresji $C_{(reg)}$, a następnie od wartości doświadczalnej odejmuje się wyliczone teoretyczne $C_{(reg)}$. Otrzymane w ten sposób punkty $(C - C_{(reg)})$ nanosi się na wykres. Następnie wyznacza się punkty, które należą do fazy dystrybucji, korzystając ze wzorów (28)-(32), gdzie:

$$-a = \alpha$$

$$-b = \ln C_0$$

$$-e^b = A_1$$

$$t = x$$

$$\ln (C - C_{(reg)}) = y$$

Kolejnym krokiem jest podstawienie otrzymanych wartości do wzoru:

$$\ln C = b - At \quad (33)$$

co pozwala na wyliczenie wartości $C_{(reg)}$ (dla fazy absorpcji).

Po odjęciu od $C_{(reg)}$ ($C - C_{(reg)}$) wylicza się parametry a , b , korzystając ze wzorów (31)-(32), natomiast r wyznacza się ze wzoru:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \cdot \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}} \quad (34)$$

Wyliczone parametry pozwalają na wyliczenie stałej absorpcji k_a gdzie:

$$-a = k_a$$

$$-e^b = A_3$$

Znając parametry A_1 , A_2 , A_3 oraz β , α i k_a , korzystając ze wzoru (9), można wyliczyć stężenie w dowolnym czasie t , a także stałe k_{21} , k_{10} , k_{12} , według wzorów (6), (7), (12). Obliczone wartości pozwalają na wyznaczenie V_c ze wzoru (16), V_{dss} z (17) i V_t z (18).

AUC oblicza się korzystając ze wzoru:

$$AUC_{(całk.)} = AUC_{(obl.)} + AUC_{(resztk.)} \quad (35)$$

$$AUC_{(resztk.)} = \frac{\text{wartość ostatniego stężenia}}{\beta} \quad (36)$$

β – hybryda stałej szybkości eliminacji (faza β).

Po zsumowaniu $AUC_{(obl.)}$ i $AUC_{(resztk.)}$ otrzymuje się $AUC_{(całk.)}$, które następnie można wykorzystać do obliczenia $V_{d(area)}$ (19). Po podstawieniu do wzoru (21) można określić klirens całkowity Cl_{total} ze wzoru (22), a $t_{0,5}$ i t_{max} odpowiednio ze wzorów (8), (24) oraz C_{max} (Guengerich i wsp., 2009).

4.2.2. Metoda oznaczania wolnego paracetamolu i jego metabolitu w moczu

Wolny paracetamol i jego metabolit – glukuronid oznaczono w moczu metodą HPLC stosowaną przez Aguilara (Aguilar i wsp., 1988).

4.2.2.1. Zasada metody

Do badań użyto HPLC firmy Beckman (układ pomp 126, detektor 168). Przygotowane próby nastrzykiwano w objętości 20 μ l na kolumnę Eclipse[®] XDB-C18 250 x 4,6 mm wypełnioną cząstkami 5 μ m. Piki rejestrowano przy długości fali $\lambda=254$ nm. Jako fazę ciekłą stosowano mieszaninę wody, metanolu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 86,5 : 12,5 : 1, z szybkością przepływu 1 cm^3/min . Czas retencji wynosił ok. 13 min., natomiast całkowity czas oznaczania 1 próbki to 16 min. Oznaczenia przeprowadzono w temp. pokojowej.

4.2.2.2. Odczynniki i roztwory

- metanol, HPLC
- kwas octowy, HPLC
- woda destylowana, HPLC
- metanolowy roztwór wzorcowy paracetamolu o stężeniu 4 mg/cm³
- metanolowy roztwór wzorcowy teofiliny o stężeniu 8 mg/cm³ (wzorzec wewnętrzny)
- metanolowy roztwór wzorcowy glukuronidu paracetamolu o stężeniu 4 mg/cm³

4.2.2.3. Tok postępowania

Próbki przygotowano przez zmieszanie wody destylowanej, moczu i teofiliny (wzorzec wewnętrzny) w ilościach: 1960 µl, 20 µl i 20 µl, uzyskując rozcieńczenie 1:100. Przygotowane próby nastrzykiwano na kolumnę.

4.2.2.4. Wykres wzorcowy i dokładność oznaczeń.

Z roztworu wzorcowego paracetamolu/glukuronidu paracetamolu przygotowano roztwory robocze o następujących stężeniach: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6; 4,0 mg/cm³. Następnie postępowano wg toku opisanego w punkcie 4.2.2.3.

Wykresy wzorcowe sporządzono metodą najmniejszych kwadratów na podstawie zależności stosunku pola powierzchni piku paracetamol/teofilina od stężenia paracetamolu oraz pola powierzchni piku glukuronid paracetamolu/teofilina od stężenia glukuronidu paracetamolu.

Tab.5. Zależność powierzchni piku od stężenia wolnego paracetamolu

Lp.	Stężenie wolnego paracetamolu [mg/cm ³]	Stosunek pola powierzchni piku paracetamolu/teofiliny
1	0	0
2	0,4	1,060
3	0,8	2,070
4	1,2	2,961
5	1,6	3,741
6	2,0	4,913
7	2,4	5,769
8	2,8	6,680
9	3,2	7,745
10	3,6	9,021
11	4,0	9,670

- w tabeli zestawiono średnie z 3 niezależnych pomiarów

Tab.6. Zależność powierzchni piku od stężenia glukuronidu paracetamolu

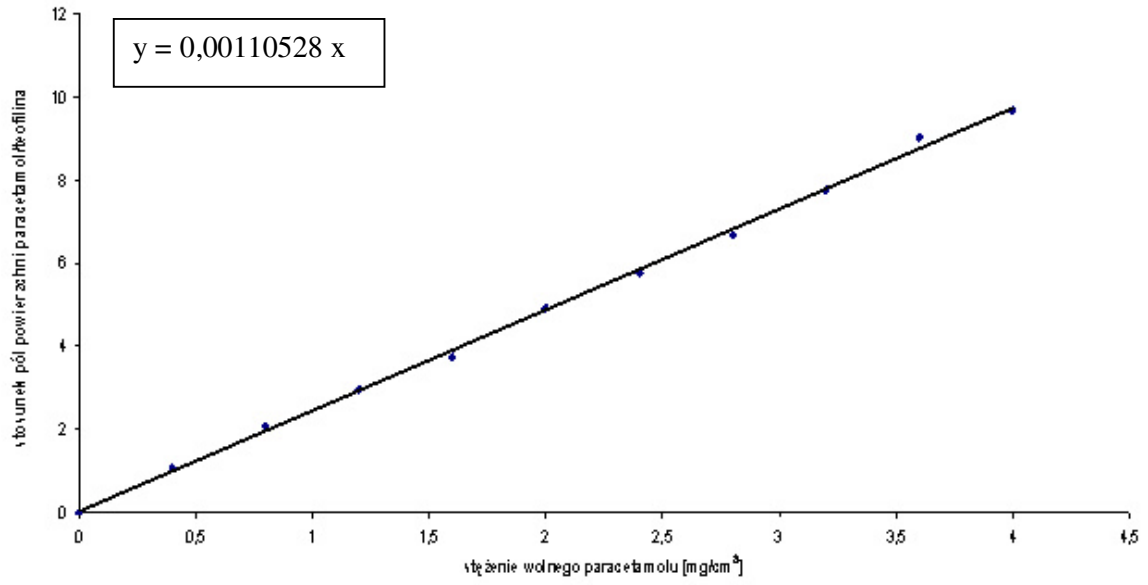
Lp.	Stężenie glukuronidu [mg/cm ³]	Stosunek pole powierzchni piku glukuronidu/teofiliny
1	0	0
2	0,4	0,507
3	0,8	0,966
3	1,2	1,350
4	1,6	1,761
6	2,0	2,193
7	2,4	2,585
8	2,8	3,094
9	3,2	3,509
10	3,6	4,091
11	4,0	4,366

- w tabeli zestawiono średnie z 3 niezależnych pomiarów

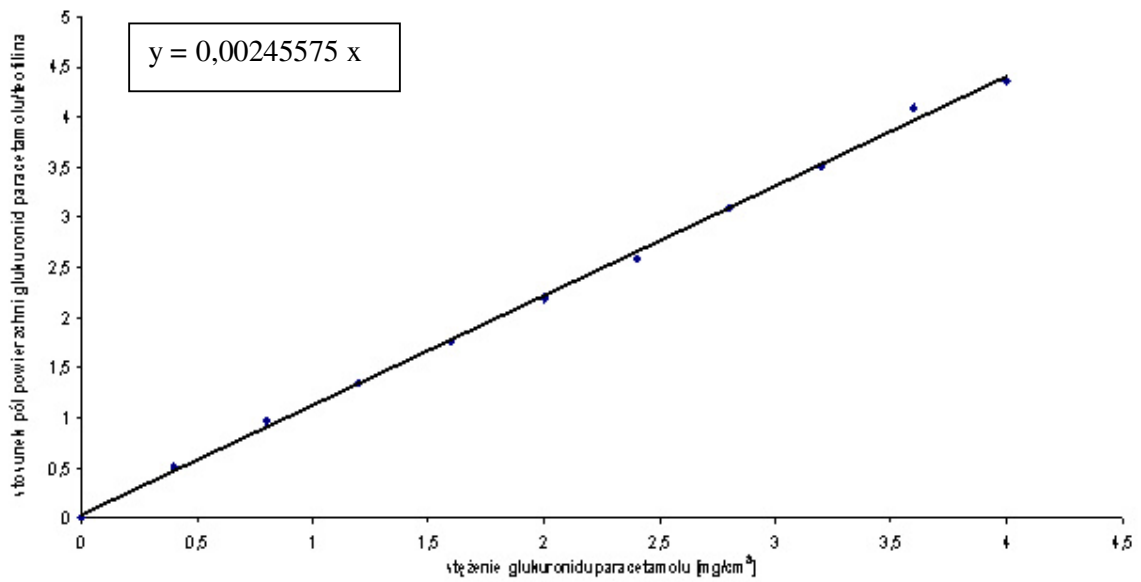
Tab.7. Parametry statystyczne dla krzywych wzorcowych paracetamolu i glukuronidu paracetamolu

Parametry statystyczne	Paracetamol	Glukuronid paracetamolu
1. Współczynnik korelacji $r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 * \sum y^2}}$	$r = 0,9991$	$r = 0,9991$
2. Odchylenie standardowe $Sb = \sqrt{\frac{(1-r^2)\sum y^2}{n-1}}$	$Sb = 0,2584$	$Sb = 0,1175$
3. Współczynnik zmienności $Wz = \frac{n * Sb}{y} * 100\%$	$Wz = 4,78\%$	$Wz = 4,81\%$
4. Współczynnik kierunkowy $a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$	$a = 0,245575$	$a = 0,110528$

Ryc. 10a. Wykres wzorcowy paracetamolu w moczu (y=ax)



Ryc. 10b. Wykres wzorcowy glukuronidu paracetamolu w moczu (y=ax)



4.2.2.5. Metodyka obliczeń farmakokinetycznych

Do porównania krzywych, przedstawiających proces wydalania wolnego paracetamolu lub jego glukuronidu w czasie, zastosowano test istotności dla współczynnika regresji liniowej, korzystając z przekształcenia prostoliniowego:

$$C(t) = C_{gr}(1 - e^{-k \cdot t})$$

$$kt = \ln \frac{C_{gr}}{C_{gr} - C(t)}$$

gdzie:

- C_{gr} - skumulowana ilość graniczna
- k - współczynnik regresji
- t - czas [h]

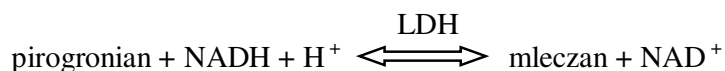
4.3. Oznaczanie aktywności enzymów w surowicy krwi

4.3.1. Oznaczanie aktywności aminotransferazy alaninowej

Aktywność aminotransferazy alaninowej w surowicy krwi oznaczono za pomocą testu firmy bioMerieux

4.3.1.1. Zasada metody

Aminotransferaza alaninowa, przenosi grupę aminową z alaniny na kwas α -ketoglutarowy, a w wyniku reakcji powstaje kwas pirogronowy (ketokwas) i kwas glutaminowy. Ketokwas w reakcji odwracalnej, katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową (LDH), jest redukowany do mleczanu.



4.3.1.2. Odczynniki

1. Odczynnik I

Tris bufor pH = 7,5	100 mmol/dm ³
α-alanina (L-alanina)	500 mmol/dm ³

2. Odczynnik II

α-ketoglutaran	15 mmol/dm ³
enzym-koenzym NADH	0,18 mmol/dm ³
LDH	≥ 1200 U/dm ³

3. Odczynnik roboczy

mieszanina odczynników I i II w stosunku 1:1

4.3.1.3. Tok postępowania

Do 1 cm³ odczynnika roboczego, dodano 100 μl surowicy. Następnie w temp. 25°C dokonano pomiaru absorbancji po 1, 2 i 3 minutach, dla długości fali 340 nm, stosując wodę jako odnośnik.

Aktywności AlAT obliczono ze wzoru:

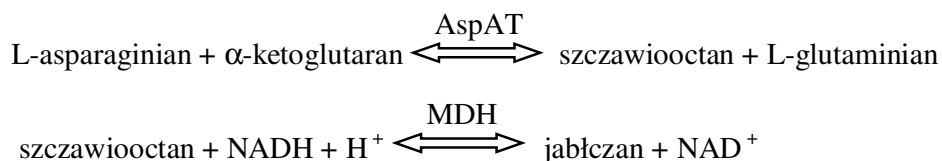
$$\text{AlAT (U/dm}^3\text{)} = \Delta A/\text{min.} * 1746$$

4.3.2. Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginianowej

Aktywność aminotransferazy asparaginianowej w surowicy krwi oznaczono za pomocą testu firmy bioMerieux

4.3.2.1. Zasada metody

Aminotransferaza asparaginianowa, przenosi grupę aminową z kwasu asparaginowego na kwas α-ketoglutarowy, w wyniku redukcji powstaje kwas szczawiooctowy (ketokwas) i glutaminowy. Powstały ketokwas w reakcji odwracalnej jest redukowany do jabłczanu przez dehydrogenazę jabłczanową (MDH).



4.3.2.2. Odczynniki

1. Odczynnik I

Tris bufor pH = 7,8	80 mmol/dm ³
kwasy asparaginowy (L-asparaginian)	200 mmol/dm ³

2. Odczynnik II

α -ketoglutaran	12 mmol/dm ³
enzym-koenzym NADH	0,18 mmol/dm ³
MDH	≥ 500 U/dm ³
LDH	≥ 1200 U/dm ³

3. Odczynnik roboczy

mieszanina odczynników I i II w stosunku 1:1

4.3.2.3. Tok postępowania

Do 1 cm³ mieszaniny roboczej, dodano 100 μ l surowicy. Następnie w temp. 25°C dokonano pomiaru absorbancji po 1, 2 i 3 minutach dla długości fali 340 nm, stosując wodę jako odnośnik.

Aktywności AspAT obliczono z wzoru:

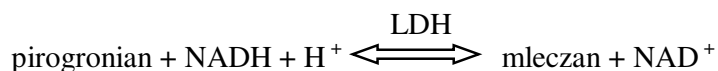
$$\text{AspAT (U/dm}^3\text{)} = \Delta A/\text{min.} * 1746$$

4.3.3. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej icky krwi oznaczono za pomocą testu firmy bioMerieux.

4.3.3.1. Zasada metody

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH), katalizuje odwracalną reakcję redukcji pirogronianu do mleczanu.



4.3.3.2. Odczynniki

1. Odczynnik I

	bufor fosforanowy pH = 7,5	50 mmol/dm ³
substrat	pirogonian	0,6 mmol/dm ³
	NaN ₃	1 g/dm ³

2. Odczynnik II

koenzym	NADH	0,18 mmol/dm ³
---------	------	---------------------------

3. Odczynnik roboczy

mieszanina odczynników I i II w stosunku 1:1

4.3.3.3. Tok postępowania

Do 1 cm³ odczynnika roboczego, dodano 20 µl surowicy. Następnie po 1 minucie dokonano pomiaru absorbancji w temp. 25°C po 1 i 2 minutach dla długości fali 340 nm, stosując wodę jako odnośnik.

Aktywności LDH obliczono z wzoru:

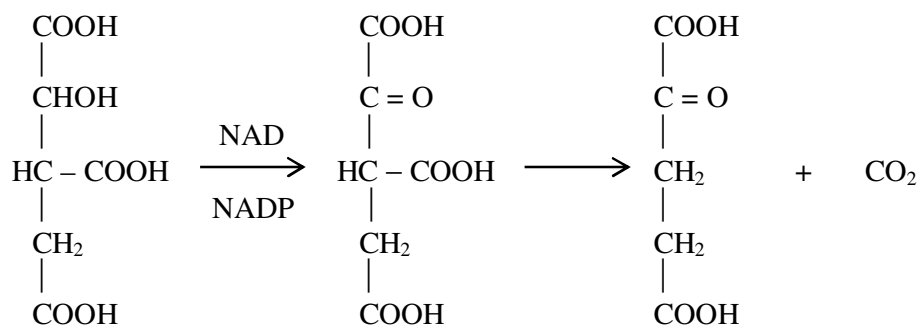
$$\text{LDH (U/dm}^3\text{)} = \Delta A/\text{min.} * 8095$$

4.3.4. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej

Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w surowicy krwi oznaczono za pomocą testu firmy SIGMA DIAGNOSTIC

4.3.4.1. Zasada metody

Dehydrogenaza izocytrynianowa katalizuje dwie kolejne reakcje cyklu Krebsa: utlenianie izocytrynianu i dekarboksylację szczawio-bursztynianu według niżej przedstawionego schematu:



Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej (ICD) w osoczu krwi, oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc występujący podczas redukcji NADP do NADPH przyrost absorbancji w ciągu 5 minut dla długości fali 340 nm.

Aktywność ICD jest proporcjonalna do stężenia NADPH.

4.3.4.2. Odczynniki

SIGMA DIAGNOSTIC (Procedure No. 153 – UV)

1. NADP o stęż. 1,0 mg/fiolkę;
2. Substrat izocytrynianowy o pH = 7,8 i stęż. 10 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$;
3. Roztwór chlorku manganu (0,1 mol/dm^3 MnCl_2 w 0,15 mol/dm^3 NaCl).

4.3.4.3. Tok postępowania

Przygotowanie roztworu NADP: do 1,0 mg NADP dodano 1,5 cm^3 H_2O , mieszano aż do rozpuszczenia i następnie umieszczano w łaźni wodnej o temp. 37°C.

Do fiolki zawierającej 1,2 cm^3 substratu izocytrynianowego dodano 2 krople roztworu chlorku manganu (MnCl_2), 0,5 cm^3 surowicy i 1,2 cm^3 przygotowanego wcześniej roztworu NADP. Następnie po 1 i 5 minutach od momentu dodania roztworu NADP dokonano pomiaru absorbancji w temp. 25°C dla długości fali 340 nm, stosując wodę jako odnośnik.

Obliczeń aktywności ICD dokonano ze wzoru:

$$\text{ICD (Sigma U}/\text{dm}^3) = \Delta A/5 \text{ min.} * 12/0,5 * 0,002 * \text{TCF}$$

gdzie:

12 – przemiana $\Delta A/5$ min. w stosunku do $\Delta A/h$

0,5 – objętość surowicy (cm^3)

0,002 – absorbancja 1 nmol NADPH mierzona dla dł. fali 340 nm

TCF – czynnik korygujący temperaturę (TCF = 0,37 w temp. 37°C)

Jednostki SIGMA ICD przeliczono na jednostki międzynarodowe stosując wzór:

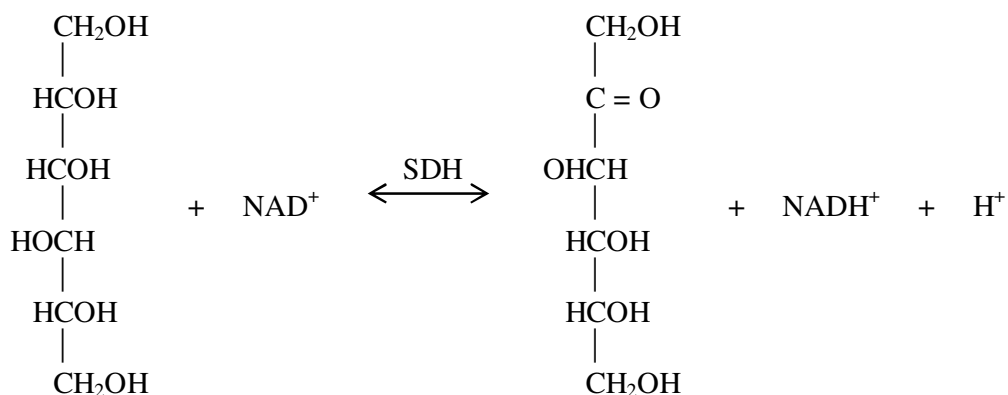
$$\text{ICD (SIGMA U}/\text{dm}^3)/60 = \text{ICD (U}/\text{dm}^3)$$

4.3.5. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy sorbitolowej

Aktywność dehydrogenazy sorbitolowej w surowicy krwi oznaczono za pomocą testu firmy SIGMA DIAGNOSTIC

4.3.5.1. Zasada metody

Dehydrogenaza sorbitolowa katalizuje reakcję utleniania sorbitolu do fruktozy według niżej przedstawionej reakcji:



Aktywność SDH w osoczu krwi, oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc spadek absorbancji w ciągu 1 minuty w układzie zawierającym enzym oraz fruktozę jako substrat.

4.3.5.2. Odczynniki

SIGMA DIAGNOSTIC (Procedure No. 50 – UV)

1. NADH o stęż. 0,2 mg/fiolkę;
2. Bufor TRIZMA (Tris(hydroksymetylo)aminometan) o pH = 7,5 i stęż. 0,1 mol/dm³;
3. Roztwór fruktozy o stęż. 0,72 g/cm³.

4.3.5.3. Tok postępowania

Do fiołki zawierającej 0,2 mg NADH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) dodano 2 cm³ buforu TRIZMA i 0,5 cm³ osocza krwi. Ze względu na obecność w osoczu ciał reagujących z NADH-Na₂, przed dodaniem roztworu fruktozy całość inkubowano przez 10 minut w temp. 25°C. Następnie dodano 0,5 cm³ roztworu β-D(-)fruktozy o stężeniu 0,72 g/cm³. W temp. 25°C mierzono spadek absorbancji dla długości fali 340 nm po 1 i 5 minutach, stosując wodę jako odnośnik.

Aktywność SDH obliczano ze wzoru:

$$\text{SDH (Sigma U/dm}^3) = \Delta A/\text{min.} * 3 * 60 / 0,00622 * 0,5 = \Delta A/\text{min.} * 58.000 * \text{TC}$$

gdzie:

3 – objętość roztworu reakcyjnego (cm³)

60 – przemiana $\Delta A/\text{min.}$ w stosunku do $\Delta A/\text{h}$

0,00622 – mikromolarny współczynnik absorbancji NADH przy 340 nm

0,5 – objętość próbki (cm³)

TC – korekta temperatury (TC = 1 dla temp. 25°C)

Jednostki SIGMA SDH przeliczano na jednostki międzynarodowe korzystając ze wzoru:

$$\text{SDH (SIGMA U/dm}^3)/60 = \text{SDH (U/dm}^3)$$

4.3.6. Uwagi

Ze względu na obecność AlAT, AspAT, LDH, ICD, SDH w erytrocytach – hemoliza powoduje zawyżenie wyników.

Przechowywanie surowicy w temperaturze pokojowej powoduje spadek aktywności SDH o 8% po 8 godzinach, natomiast w temperaturze 4°C – jedynie o 6,5% po 7 dniach.

4.4. Badanie układu monooksygenaz zależnych od cytochromu P-450 w wątrobie

4.4.1. Izolacja frakcji mikrosomalnej wątroby

4.4.1.1. Odczynniki

- sacharoza, cz.d.a. (0,25 M roztwór wodny)
- bufor Tris-HCl o pH 7,4, cz.d.a. (10 mM roztwór wodny)
- KCl, cz.d.a. (0,15 M roztwór wodny)
- glicerol, cz.d.a. (20%)
- NaCl, cz.d.a. (0,17M roztwór wodny)

4.4.1.2. Tok postępowania

Wątrobową frakcję mikrosomalną izolowano stosując met. Dallnera [45]. Po kilkukrotnym przepłukaniu wątroby roztworem 0,17M NaCl, tkankę cięto na niewielkie skrawki i

rozdrabniano w homogenizatorze Pottera-Elvehjema z tłokiem teflonowym, przy 400 obrotach na min. i 4 pełnych ruchach tłoka. Środowiskiem homogenizacyjnym był 0,25 M roztwór sacharozy w 10 mM buforze Tris-HCl o pH 7,4. Na 1g tkanki dodawano 5 cm³ wymienionego uprzednio roztworu sacharozy. Wszystkie czynności prowadzono w temp. 2-4 °C.

Uzyskane homogenaty, celem osadzenia frakcji jądrowej i błon komórkowych, wirowano przy 900g przez 10min.. Otrzymane supernatanty odwirowano ponownie przy 10000g przez 20min., celem oddzielenia frakcji mitochondrialnej. Supernatant postmitochondrialny posłużył do izolacji frakcji mikrosomalnej. W tym celu poddano go ultrawirowaniu przy 105000g przez 90min. Uzyskane osady mikrosomalne oczyszczano przez zawieszanie w 0,15 M KCl i ponownie ultrawirowano przy 105000g przez 45 min.

Czyste frakcje mikrosomalne zawieszano w środowisku zawierającym 0,25 M sacharozy w 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) i 20% roztwór glicerolu. Próby zamrażano w temperaturze -20 °C i przechowywano do następnego dnia. Po stopniowym rozmrożeniu wykonywano oznaczenia biochemiczne.

4.4.2. Oznaczanie zawartości cytochromu P-450

Zawartość cytochromu P-450 z małymi modyfikacjami oznaczano metodą Estabrooka i Werringloera (Estabrook i Werrongloer, 1978) Pomiary wykonano rejestrując tzw. widmo różnicowe.

4.4.2.1. Odczynniki

- bufor Tris-HCl pH 7,4 (50 mM roztwór wodny)
- ditionin sodowy, cz.d.a.
- tlenek węgla

4.4.2.2. Tok postępowania

Zawiesinę mikrosomów rozcieńczano w buforze Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), aby uzyskać stężenie białka rzędu 0,3 mg/cm³. Tak rozcieńczoną zawiesinę umieszczano w dwóch kuwetach i zredukowano ją ditioninem sodowym. Następnie próbę przyjętą za doświadczalną wysycano tlenkiem węgla przez około 20 sek. Widmo różnicowe rejestrowano w przedziale 400-500 nm. Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej.

Korzystając z widm wyliczano różnicę absorbancji dla 450 i 490 nm, którą następnie przeliczano na zawartość cytochromu P-450, korzystając z milimolowego współczynnika

absorbancji, równego $91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Omura i Sato, 1964). Zawartość cytochromu wyrażano w nanomolach cytochromu na 1 mg białka mikrosomalnego.

4.4.3. Oznaczanie zawartości cytochromu b_5

Cytochrom b_5 oznaczano metodą Estabrooka i Werringloera (Estabrook i Wellongloer, 1978).

4.4.3.1. Odczynniki

- NADH, cz.d.a. (30 mM roztwór wodny)

4.4.3.2. Tok postępowania

Do próby doświadczalnej o objętości 3 cm^3 dodawano $5 \mu\text{l}$ 30 mM roztworu NADH i rejestrowano widmo różnicowe w zakresie 400-450 nm, wobec próby kontrolnej zawierającej czystą zawiesinę mikrosomalną. Dodanie NADH powoduje szybką redukcję cytochromu b_5 , co powoduje pojawienie się charakterystycznego widma z minimum przy 409 nm i maksimum przy 426 nm. Stosując współczynnik absorbancji $185 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Omura i Sato, 1964), z różnicy absorbancji przy podanych długościach fali oznaczano stężenie hemoproteiny w nanomolach na 1 mg białka mikrosomalnego.

4.4.4. Oznaczanie aktywności reduktazy NADPH-cytochrom c (P-450)

4.4.4.1. Odczynniki

- KCN, cz.d.a. (50 mM roztwór wodny)
- cytochrom c, cz.d.a. (0,45 mM roztwór wodny)
- bufor Tris-HCl o pH 7,4 (50 mM roztwór wodny)
- NADPH, cz.d.a. (3 mM roztwór wodny)

4.4.4.2. Tok postępowania

Oznaczenia prowadzono w temperaturze pokojowej mierząc szybkość redukcji cytochromu c dla 550 nm (Hauer i wsp.), w kuwetach o pojemności 3 cm^3 . Mieszanina reakcyjna zawierała $0,1 \text{ cm}^3$ (około 30 μg białka) zawiesiny mikrosomalnej, $0,1 \text{ cm}^3$ 50 mM roztworu

KCN, 0,2 cm³ 0,45 mM roztworu cytochromu c i 2,5 cm³ 50 mM buforu Tris-HCl o pH 7,4. Reakcję zapoczątkowywano przez dodanie 0,1 cm³ 3 mM roztworu NADPH, a pomiary wykonywano względem próby zerowej, do której zamiast nukleotydu dodawano odpowiednią ilość wymienionego powyżej buforu. Z otrzymanych wykresów wyznaczano szybkość reakcji.

Stężenie zredukowanego cytochromu c wyliczano, stosując współczynnik absorbancji molowej 18,5 mM⁻¹cm⁻¹.

4.4.5. Oznaczanie aktywności reduktazy NADH-cytochrom b₅

4.4.5.1. Odczynniki

- KCN, cz.d.a. (50 mM roztwór wodny)
- cytochrom c, cz.d.a. (0,45 mM roztwór wodny)
- bufor Tris-HCl o pH 7,4 (50 mM roztwór wodny)
- NADH, cz.d.a. (3 mM roztwór wodny)

4.4.5.2. Tok postępowania

Oznaczanie aktywności tego enzymu wykonano analogicznie jak w przypadku reduktazy cytochromu c, z tą różnicą, że reakcję zapoczątkowywano przez dodanie 0,1 cm³ 3 mM roztworu NADH.

Aktywność obu reduktaz wyrażano w mikromolach zredukowanego cytochromu c na 1 minutę na 1 mg białka mikrosomalnego.

4.4.6. Oznaczanie białka we frakcji mikrosomalnej wątroby

4.4.6.1. Zasada metody

Metoda wykorzystuje czułą reakcję, jakiej ulegają wiązania peptydowe i aminokwasy aromatyczne z odczynnikiem Folina-Ciocalteu (FC). Pierwszy etap polega na przyłączeniu jonów Cu²⁺ do wiązań peptydowych, natomiast w drugim etapie zachodzi reakcja kwasu fosforowolframowego i fosforomolibdenowego do odpowiednich tlenków (Lowry i wsp., 1951).

4.4.6.2. Odczynniki

1. Odczynnik miedziowy

A- 2,0 g bezwodnego Na₂CO₃ w 100 cm³ 0,1 M. NaOH

B- 0,5 g CuSO₄ × 5 H₂O w 100 cm³ 1% roztworu cytrynianu sodowego.

Przed użyciem zmieszano roztwór A i B w stosunku 1:50

2. Odczynnik Folina – Ciocalteau (FC)
3. Roztwór wzorcowy albuminy 0,1 cm³/mg

4.4.6.3. Tok postępowania

Frację mikrosomalną rozcieńczono wodą destylowaną w stosunku 1:500. Pobrano 0,5 cm³ rozcieńczonej frakcji i dodawano 2,5 cm³ odczynnika miedziowego. Mieszano i odstawiono na 10 minut. Następnie dodawano 0,25 cm³ odczynnika FC i zostawiono na 60 minut. Wzorzec przygotowano analogicznie dodając kolejno wymienione odczynniki do 0,5 cm³ wzorcowego roztworu albuminy. Absorbancję odczytywano dla długości fali $\lambda = 750$ nm wobec próby ślepej.

Stężenie białka obliczono ze wzoru:

$$C_B = \frac{A_{próby} \times C_{wz} \times W}{A_{wz}} \text{ [mg/cm}^3 \text{ homogenatu]}$$

$A_{próby}$ - absorbancja próby badanej

C_{wz} - stężenie wzorca

W - rozcieńczenie

A_{wz} - absorbancja wzorca

4.4.7. Oznaczanie izoenzymów cytochromu P-450

4.4.7.1. Zasada metody

Oznaczenia procentowych zmian poziomu izoform cytochromu P-450 (2E1, 2B1/2, 1A2), względem grupy kontrolnej, w mikrosomach wątroby szczura wykonano metodą immunochemiczną Western Blot. Mikrosomy poddawano elektroforezie na żelu poliakrylamidowym (8%) w obecności SDS zgodnie z metodą Laemmli. Białka po elektroforezie przenoszono elektroforetycznie na membranę PVDF i barwiono immunochemicznie. Przeciwciała do poszczególnych izoform, uzyskane od królików pochodziły z Chemicon Int. Analizę ilościową przeprowadzono na podstawie pomiarów densytometrycznych blotów.

4.4.7.2. Tok postępowania

Podłożem roboczym używanym do rozdzielania elektroforetycznego białek był żel poliakrylamidowy o grubości 1 mm i długości 15 cm. W swoim początkowym odcinku podłoże było 4% żelem (tzw. starting gel) w 0.125 milimolowym buforze Tris-HCl (pH 6.8) zawierającym 0.1% SDS. Część robocza podłoża to 10% żel (tzw. running gel) w 0.375 milimolowym Tris-HCl (pH 8.8) zawierającym także 0.1% SDS. W przestrzeniach wokół elektrodowych stosowano 0.1% roztwór SDS, zawierający w 1 dm³ 6g Tris i 2,8g glicyny. W miarę potrzeby pH tego roztworu ustawiono na 8.5. Po nałożeniu próby proces elektroforezy prowadzono przy natężeniu prądu 30 mA (co odpowiada napięciu 120 V). Z chwilą przejścia próby na właściwe podłoże robocze, natężenie prądu zmniejszono do 8 mA. Rozdział prowadzono przez całą noc. Na początku rozdzielania napięcie wynosiło około 40 V, a w końcowym etapie tego procesu wzrastało do 70 V. Po zakończeniu rozdzielania żel utrwalano 20% kwasem trichlorooctowym (TCA) przez dwie godziny, a następnie barwiono przez 30 minut w 0.2% Coomassie Brilliantblue R-250. Barwnik rozpuszczano w 45% wodnym roztworze alkoholu metylowego. Odbarwienie prowadzono w dwóch etapach. W fazie pierwszej, trwającej jedną godzinę, wybarwiony uprzednio żel umieszczano w wodnym roztworze mieszaniny 50% alkoholu metylowego i 70% kwasu octowego. Następnie żel umieszczano w analogicznym roztworze 70% kwasu i 10% alkoholu. Ten etap odbarwienia trwający całą noc przerywano, gdy wybarwione prążki znajdowały się w bezbarwnym tle podłoża.

4.4.7.3. Analiza Western Blot izoform cytochromu P-450

Poziom poszczególnych izoform cytochromu P-450 względem grupy kontrolnej (%) w mikrosomach wątroby szczura oznaczano metodą immunochemiczną Western Blot. Próbkę mikrosomów (5g białka) poddawano (jak opisano powyżej) elektroforezie na żelu poliakrylamidowym (8%) w obecności SDS zgodnie z metodą Laemmli. Białka po elektroforezie przenoszono na błonę PVDF (Milipore) i barwiono immunochemicznie. Przeciwciała do poszczególnych izoform CYP-ów uzyskane z królików, pochodziły z Chemicon Int. Wiązanie przeciwciał było uwidaczniane w reakcji z wtórnym przeciwciałem sprzęgniętym z fosfatazą alkaliczną. Reakcję rozwijano z substratem BCIP/NBT (Sigma). Uzyskane immunoelektroforegramy poddano analizie densytometrycznej za pomocą programu One D-scan (Scanalytics).

4.5. Oznaczanie glutationu w wątrobie

Całkowity glutation (tj. zredukowany i utleniony) w wątrobie szczura oznaczano zgodnie z metodą Adamsa et al. Próby (około 50 mg tkanki wątroby) ważono i homogenizowano w 10 mM/dm³ DNTB rozpuszczonym w 100 mM buforze fosforanowym (pH 7.5) zawierającym 5 mM/dm³ EDTA (bufor A), a następnie rozcieńczano 10 razy buforem A. Po odwirowaniu (2000g) przez 5 minut do oznaczeń pobierano 0,1 cm³ supernatantu. Mieszanina reakcyjna, oprócz supernatantu, zawierała 0,1 cm³ 5 mM/dm³ roztworu DNTB w buforze A, 0,1 cm³ reduktazy glutationowej (5 U/cm³ w buforze A). Próba zerowa, zamiast supernatantu, zawierała bufor A. Reakcję zapoczątkowywano dodając 0,7 cm³ 0,3 mM/dm³ NADPH w buforze A. Mierzono zmianę absorbancji dla 412 nm przez 6 minut (spektrofotometr Hitachi U-3210). Zawartość glutationu obliczano z krzywej kalibracyjnej, na którą naniesiono (A/6 min. dla znanych stężeń glutationu w próbie. Wyniki zawartości glutationu przeliczano na jeden gram tkanki wątrobowej.

4.6. Metodyka obliczeń statystycznych

Rozkład normalny uzyskanych wyników sprawdzono za pomocą testu Shapiro – Wilka. Uzyskane wyniki aktywności enzymów nie podlegały rozkładowi normalnemu, dlatego przedstawiono je w postaci mediany. Ocenę statystyczną przeprowadzono korzystając z testu U Mann`a – Whitney`a.

W przypadku pozostałych wyników, po stwierdzeniu rozkładu normalnego, wartości średnie w poszczególnych grupach porównywano ze sobą za pomocą testu istotności różnic pomiędzy średnimi t-Studenta, poprzedzonego testem F-Fishera–Snedecora dla dwóch wariancji.

5. Wyniki badań.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 8 – 38 oraz na rycinach 10 – 13.

Tabela 8. Stężenie APAP w surowicy [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$] po jednorazowym podaniu leku w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	CZAS									
	[MIN.]							[H]		
	5	10	15	20	30	60	90	4,0	12,0	24,0
APAP 250	34,843 $\pm 0,673$	69,573 $\pm 2,358$	111,510 $\pm 1,864$	114,445 $\pm 7,945$	91,433 $\pm 5,855$	82,197 $\pm 6,515$	41,893 $\pm 4,510$	20,867 $\pm 2,315$	1,540 $\pm 0,746$	0,140 $\pm 0,000$
APAP 250 + TRI 250	27,607 $\pm 1,227^*$	32,637 $\pm 2,205^*$	54,613 $\pm 3,385^*$	49,957 $\pm 4,991^*$	38,870 $\pm 2,196^*$	34,133 $\pm 3,213^*$	31,467 $\pm 3,547^*$	21,207 $\pm 1,756$	1,060 $\pm 0,000$	0,020 $\pm 0,000^*$
APAP 250 + NAC 150 (0h)	32,083 $\pm 0,326^*$	50,267 $\pm 1,558^*$	91,990 $\pm 6,638^*$	74,543 $\pm 2,078^*$	62,850 $\pm 3,803^*$	48,507 $\pm 5,915^*$	39,803 $\pm 2,397$	24,543 $\pm 5,118$	1,403 $\pm 0,535$	0,183 $\pm 0,104$
APAP 250 + NAC 150 (2h)	34,843 $\pm 0,673$	69,573 $\pm 2,358$	111,510 $\pm 1,864$	114,447 $\pm 7,945$	91,433 $\pm 5,855$	82,197 $\pm 6,514$	41,893 $\pm 4,510$	17,690 $\pm 2,786$	1,507 $\pm 0,476$	0,167 $\pm 0,058$
APAP 250 + TRI 250 + NAC 150 (0h)	42,383 $\pm 5,291^*$	70,203 $\pm 6,631$	72,037 $\pm 14,696^*$	58,557 $\pm 3,570^*$	47,823 $\pm 3,511^*$	36,347 $\pm 4,587^*$	29,960 $\pm 6,761^*$	21,890 $\pm 1,680$	1,767 $\pm 0,709$	0,267 $\pm 0,058^*$
APAP 250 + TRI 250 + NAC 150 (0h)	27,607 $\pm 1,227^*$	32,637 $\pm 2,205^*$	54,613 $\pm 3,385^*$	49,957 $\pm 4,991^*$	38,870 $\pm 2,196^*$	34,133 $\pm 3,213^*$	31,467 $\pm 3,547^*$	23,247 $\pm 3,900$	2,067 $\pm 0,252$	0,233 $\pm 0,058^*$

*różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej paracetamol na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 9. Stężenie APAP w surowicy [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$] po jednorazowym podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	CZAS									
	[MIN.]							[H]		
	5	10	15	20	30	60	90	4,0	12,0	24,0
APAP 500	141,233 $\pm 8,967$	240,733 $\pm 12,003$	278,633 $\pm 7,453$	251,633 $\pm 14,814$	208,533 $\pm 12,983$	158,367 $\pm 5,532$	134,233 $\pm 7,788$	54,867 $\pm 2,873$	23,967 $\pm 2,470$	3,567 $\pm 0,513$
APAP 500 + TRI 250	61,500 $\pm 4,996^*$	134,333 $\pm 7,353^*$	186,200 $\pm 4,158^*$	197,367 $\pm 6,385^*$	153,767 $\pm 4,701^*$	133,767 $\pm 3,009^*$	126,967 $\pm 6,087$	51,500 $\pm 4,246$	12,367 $\pm 0,971^*$	1,500 $\pm 0,100^*$
APAP 500 + NAC 150 (0h)	55,517 $\pm 6,985^*$	99,350 $\pm 1,307^*$	155,417 $\pm 2,226^*$	125,177 $\pm 5,547^*$	118,267 $\pm 1,815^*$	113,897 $\pm 2,404^*$	103,997 $\pm 3,278^*$	41,553 $\pm 3,522$	2,947 $\pm 0,432^*$	0,800 $\pm 0,000^*$
APAP 500 + NAC 150 (2h)	141,233 $\pm 8,967$	240,733 $\pm 12,003$	278,633 $\pm 7,453$	251,633 $\pm 14,814$	208,533 $\pm 12,983$	158,367 $\pm 5,532$	134,233 $\pm 7,788$	41,343 $\pm 6,801^*$	26,557 $\pm 4,927$	3,233 $\pm 0,681$
APAP 500 + TRI 250+ NAC 150 (0h)	42,177 $\pm 4,477^*$	87,870 $\pm 5,208^*$	120,577 $\pm 3,952^*$	110,560 $\pm 2,817^*$	103,907 $\pm 2,161^*$	68,867 $\pm 5,997^*$	38,120 $\pm 3,571^*$	26,710 $\pm 0,890^*$	1,367 $\pm 0,635^*$	0,200 $\pm 0,100^*$
APAP 500 + TRI 250+ NAC 150 (2h)	61,500 $\pm 4,996^*$	134,333 $\pm 7,353^*$	186,200 $\pm 4,158^*$	197,367 $\pm 6,385^*$	153,767 $\pm 4,701^*$	133,767 $\pm 3,009^*$	126,967 $\pm 6,087^*$	51,670 $\pm 15,441^*$	2,123 $\pm 0,370^*$	0,500 $\pm 0,346^*$

*różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej paracetamol na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 10. Parametry farmakokinetyczne APAP podanego w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

Parametry	APAP 250	APAP 250 TRI 250	APAP 250 NAC 150 [0 h]	APAP 250 NAC 150 [2 h]	APAP 250 TRI 250 NAC 150 [0 h]	APAP 250 TRI 250 NAC 150 [2 h]
	AUC [$\mu\text{g}/\text{cm}^3 \times \text{h}$]	296,0±6,9	215,0±15,3*	274,4±30,5	276,6±13,7 [•]	215,2±15,3* [▲]
C _{max} [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	109,667±4,470	45,201±1,450*	76,713±2,700* [•]	102,663±3,483* ^{•,▲}	75,9±1,045* ^{•,▲}	43,983±2,994* ^{•,▲}
t _{max} [h]	0,282±0,076	0,740±0,063*	0,419±0,038* [•]	0,238±0,043* ^{•,▲}	0,121±0,026* ^{•,▲}	0,699±0,080* ^{•,▲}
t _{0,5} [h]	3,696±0,761	2,113±0,168*	4,248±2,345 [•]	3,108±0,037 [•]	3,205±0,085 [•]	3,862±0,687 [•]
V _c [dm^3]	1,508±0,217	2,100±0,013*	2,352±0,076* [•]	1,254±0,120* ^{•,▲}	2,048±0,265* [▲]	3,878±0,111* ^{•,▲}
k _a [h^{-1}]	11,648±3,304	3,574±0,461*	7,776±0,465* [•]	11,244±3,565* ^{•,▲}	22,874±11,812* ^{•,▲}	4,590±0,948* ^{•,▲}
α [h^{-1}]	0,619±0,246	0,328±0,003*	0,355±0,079*	1,097±0,327* ^{•,▲}	2,228±0,825* ^{•,▲}	0,227±0,026* ^{•,▲}
β [h^{-1}]	0,193±0,040	0,482±0,003*	0,174±0,064 [•]	0,223±0,003 [•]	0,216±0,006 [•]	0,183±0,030 [•]
Cl [dm^3/h]	0,591±0,014	0,821±0,051*	0,643±0,077 [•]	0,633±0,009* [•]	0,816±0,057* ^{•,▲}	0,742±0,084* [▲]
k ₂₁ [h^{-1}]	0,310±0,153	0,383±0,003	0,224±0,092	0,490±0,122 [▲]	1,448±0,678* ^{•,▲}	0,210±0,018 [▲]
k ₁₂ [h^{-1}]	0,109±0,092	0,011±0,010*	0,026±0,013*	0,335±0,181* ^{•,▲}	0,652±0,367* ^{•,▲}	0,005±0,008* [▲]
k ₁₀ [h^{-1}]	0,392±0,046	0,228±0,020*	0,279±0,046*	0,495±0,032* ^{•,▲}	0,344±0,074 [▲]	0,195±0,004* ^{•,▲}
V _{ss} [dm^3]	1,972±0,128	2,103±0,015*	2,667±0,238* [•]	2,054±0,245 [▲]	3,052±0,722* ^{•,▲}	3,864±0,389* ^{•,▲}
V _{d area} [dm^3]	3,164±0,720	3,232±0,042	4,095±1,674 [•]	2,838±0,072	3,776±0,326 [▲]	4,173±1,136* ^{•,▲}

* różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP

▲ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC

• różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i TRI

▲ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC [2h]

Tabela 11. Parametry farmakokinetyczne APAP podanego w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

Parametry	APAP 500	APAP 500 TRI 250	APAP 500 NAC 150 [0 h]	APAP 500 NAC 150 [2 h]	APAP 500 TRI 250 NAC 150 [0 h]	APAP 500 TRI 250 NAC 150 [2 h]
	AUC [$\mu\text{g}/\text{cm}^3 \times \text{h}$]	1023,9±18,4	721,7±11,4*	560,9±57,8*•	962,5±79,9*•♣	317,6±13,5*•♣,▲
C _{max} [$\mu\text{g}/\text{dm}^3$]	255,167±8,050	192,833±3,976*	133,00±4,47*•	248,734±5,149*•♣	115,43±3,98*•♣,▲	181,035±4,712*•♣,▲
t _{max} [h]	0,158±0,040	0,194±0,009	0,383±0,026*•	0,166±0,044♣	0,212±0,034♣,▲	0,315±0,039*•▲
t _{0,5} [h]	4,858±0,294	3,909±0,77*	6,658±0,966*•	5,292±0,121*•♣	4,692±1,939♣	5,130±2,693
V _c [dm^3]	1,148±0,067	1,566±0,112*	2,357±0,145*•	1,200±0,053*•♣	3,200±0,077*•♣,▲	1,814±0,076*•♣,▲
k _a [h^{-1}]	19,213±7,174	15,019±2,363	8,785±0,905*•	21,530±9,129♣	18,289±3,878♣	11,420±2,850
α [h^{-1}]	1,324±0,203	1,031±0,301	0,361±0,107*•	0,877±0,191*•♣	0,446±0,055*•,▲	0,381±0,121*•,▲
β [h^{-1}]	0,143±0,009	0,177±0,004*	0,107±0,012*•	0,131±0,03*•	0,163±0,054	0,160±0,074
Cl [dm^3/h]	0,342±0,006	0,475±0,023*	0,628±0,062*•	0,365±0,031♣	1,102±0,012*•♣,▲	0,541±0,079*•♣,▲
k ₂₁ [h^{-1}]	0,649±0,089	0,619±0,149	0,136±0,027*•	0,372±0,080*•♣	0,208±0,082*•	0,209±0,123*•
k ₁₂ [h^{-1}]	0,527±0,106	0,296±0,135	0,051±0,030*•	0,327±0,111♣	0,048±0,019*•,▲	0,036±0,024*•,▲
k ₁₀ [h^{-1}]	0,291±0,018	0,293±0,019	0,281±0,062	0,308±0,013	0,353±0,007*•♣	0,296±0,050
V _{ss} [dm^3]	2,073±0,087	2,284±0,016*	3,168±0,226*•	2,230±0,059*•♣	4,008±0,477*•♣,▲	2,191±0,327♣
V _{d area} [dm^3]	2,396±0,118	2,736±0,066*	5,903±3,22*•	2,789±0,230*•♣	7,472±3,132*•♣,▲	3,910±1,891*•♣

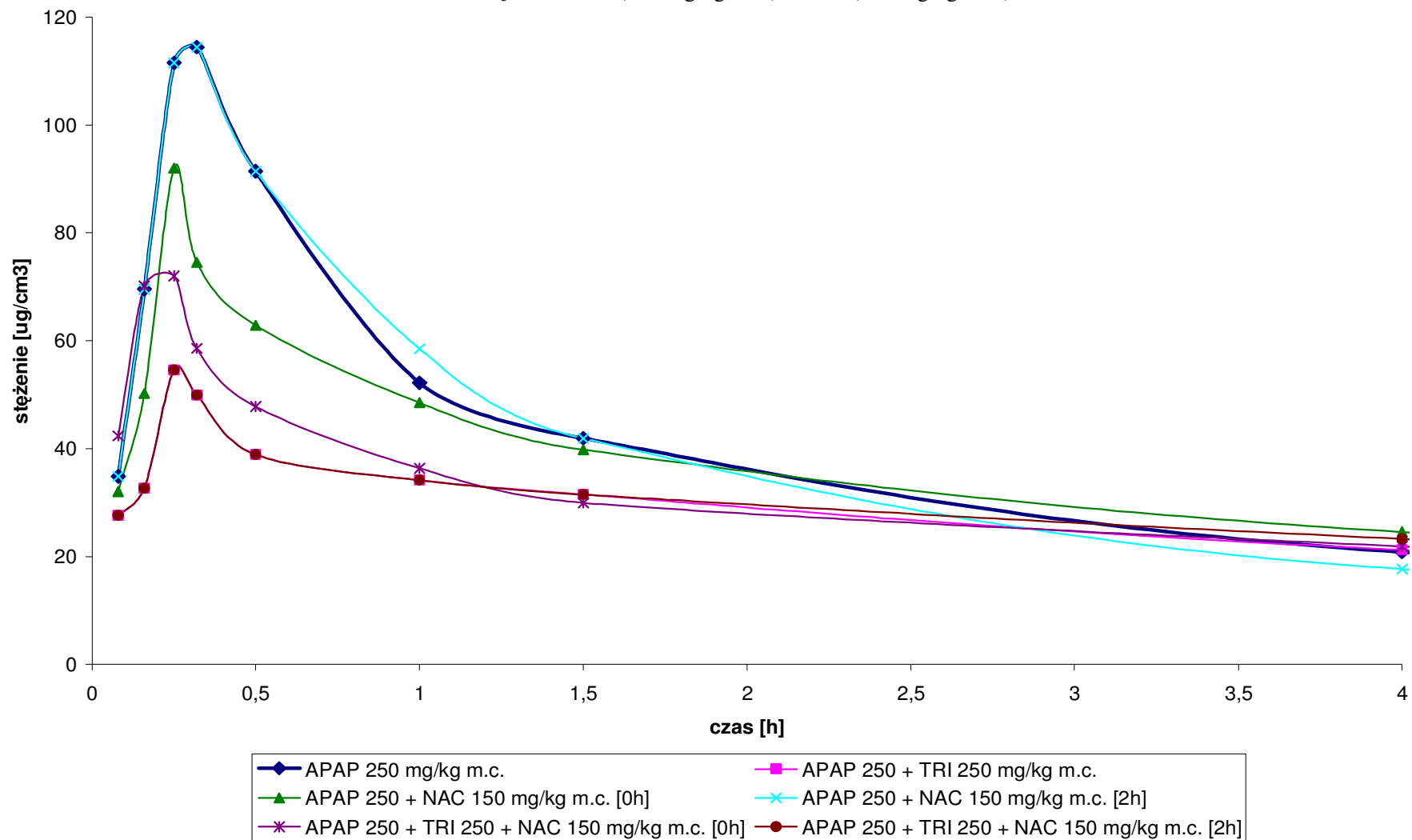
* różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP

♣ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC

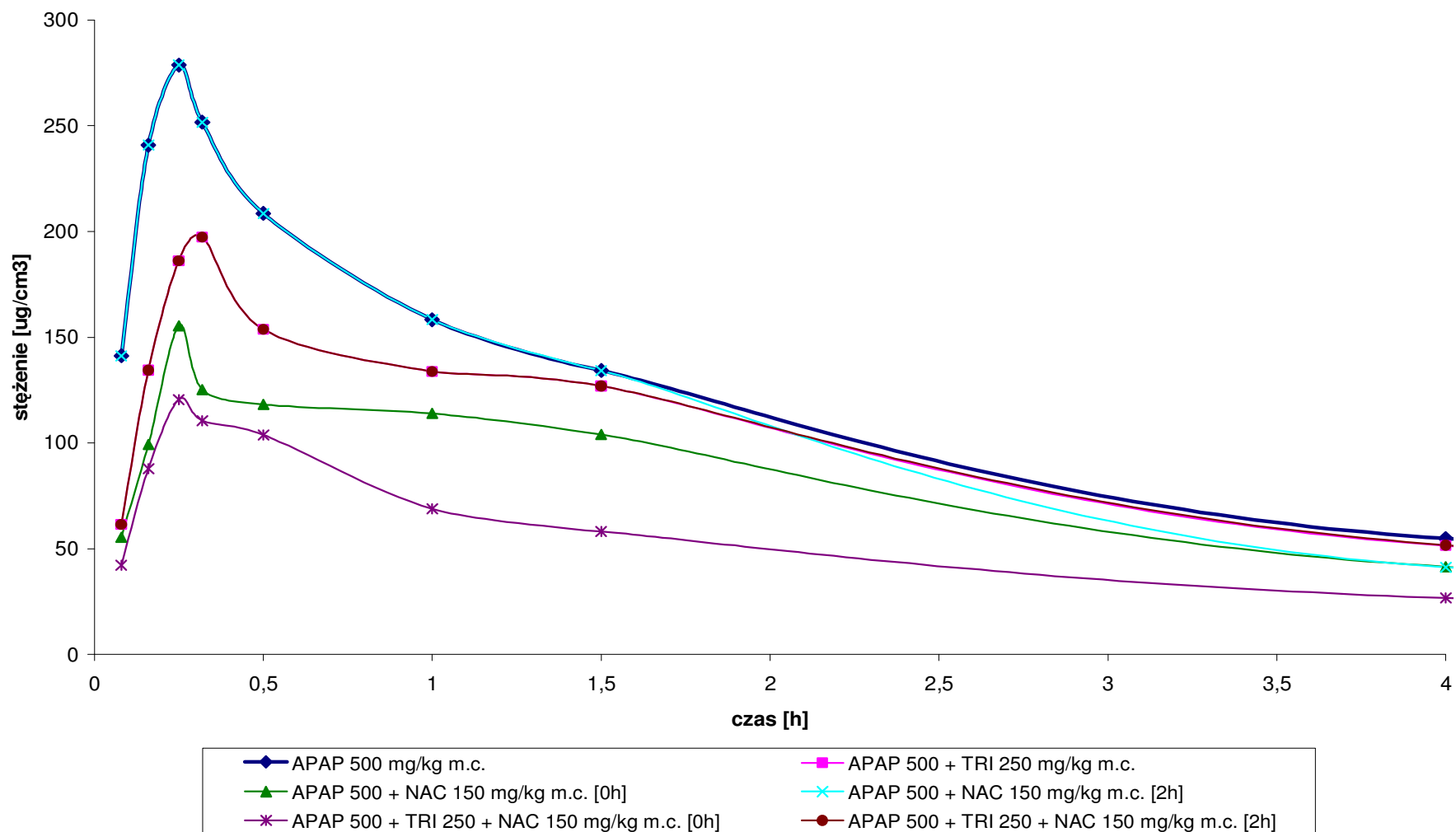
• różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i TRI

▲ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC [2h]

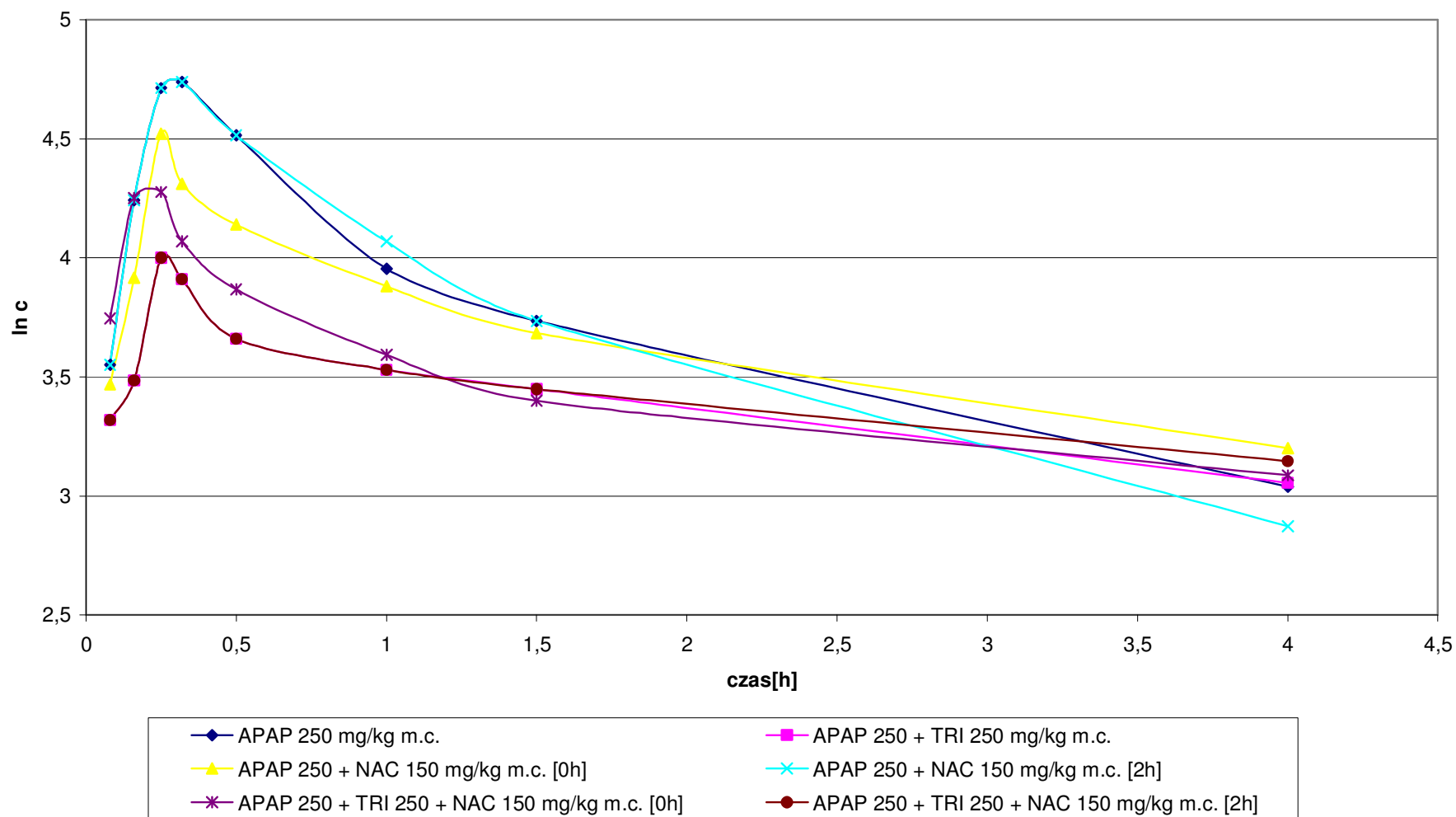
Ryc. 11 Wykres zależności stężenie paracetamolu w surowicy po jednorazowym podaniu leku w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).



Ryc. 12 Wykres zależności stężenia paracetamolu w surowicy po jednorazowym podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).



Ryc. 13 Wykres zależności $\ln C=f(t)$ po jednorazowym podaniu paracetamolu w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).



Ryc. 14 Wykres zależności $\ln C=f(t)$ po jednorazowym podaniu paracetamolu w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).

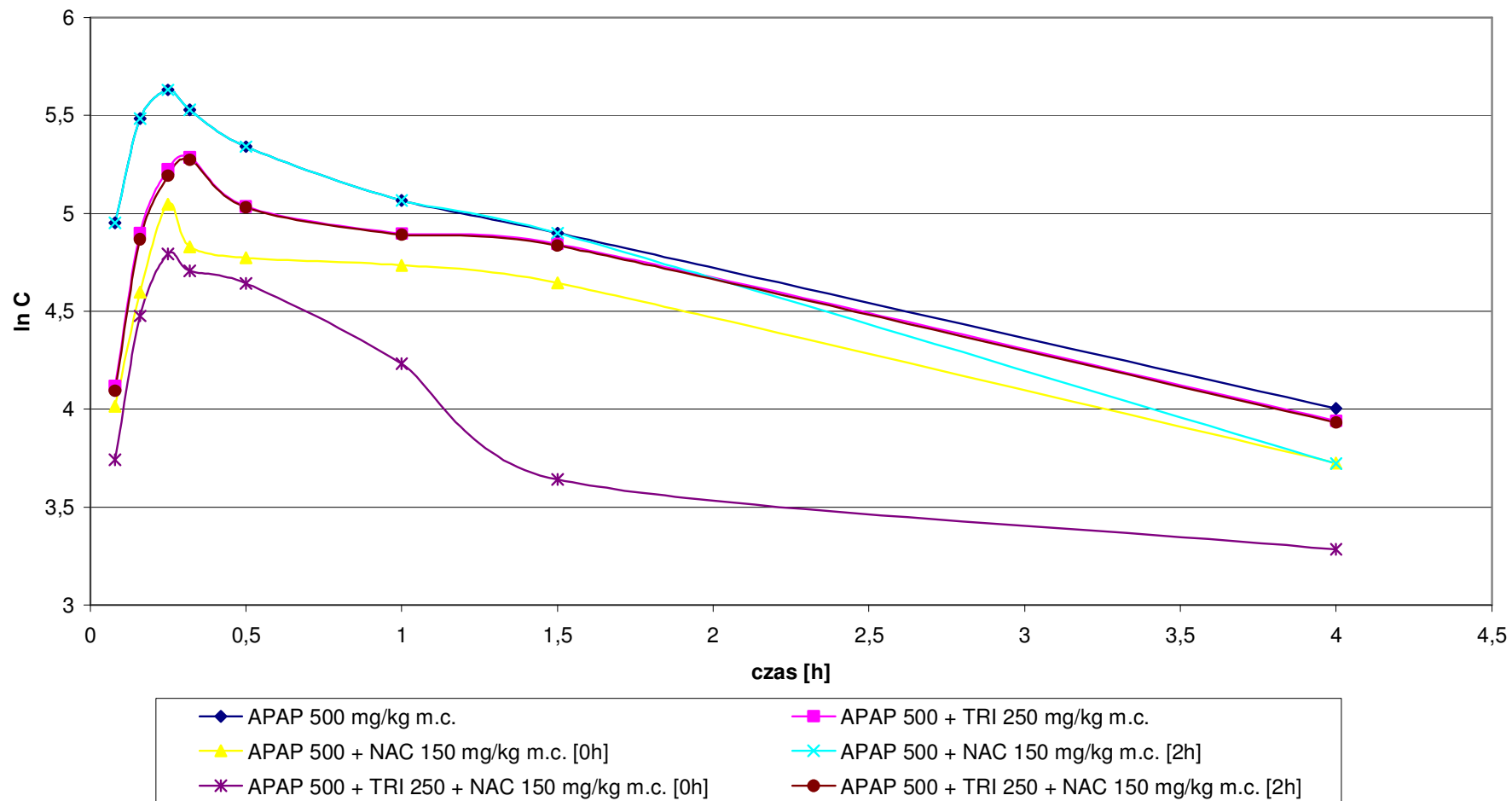


Tabela 12. Ilość wydalonego paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI

(250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

Czas [h]	APAP 250 mg/kg m.c.		APAP 250 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c.		APAP 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]		APAP 250 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 250 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]	
	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)
2	2,96 ± 1,02	2,96 ± 1,02	2,06 ± 0,89	2,06 ± 0,89	2,32 ± 0,62	2,32 ± 0,62	2,64 ± 1,20	2,64 ± 1,20	1,58 ± 0,56	1,58 ± 0,56	0,94 ± 0,05	0,94 ± 0,05
4	4,17 ± 1,59	1,21 ± 0,78	3,68 ± 1,33	1,62 ± 0,44	4,38 ± 0,45	2,06 ± 0,87	4,70 ± 1,15	2,06 ± 0,13	4,04 ± 1,23	2,46 ± 0,91	1,38 ± 0,05	0,44 ± 0,10
6	4,80 ± 1,52	0,63 ± 0,07	4,35 ± 1,34	0,67 ± 0,06	4,75 ± 0,42	0,37 ± 0,03	5,15 ± 1,20	0,45 ± 0,07	4,91 ± 1,31	0,87 ± 0,11	1,51 ± 0,02	0,13 ± 0,02
8	5,47 ± 1,24	0,67 ± 0,30	5,21 ± 1,14	0,86 ± 0,20	4,91 ± 0,43	0,16 ± 0,04	5,60 ± 1,24	0,45 ± 0,34	5,41 ± 1,49	0,50 ± 0,17	1,63 ± 0,05	0,11 ± 0,03
12	5,60 ± 1,23	0,13 ± 0,02	5,46 ± 1,18	0,25 ± 0,06	4,97 ± 0,43	0,06 ± 0,01	5,80 ± 1,16	0,20 ± 0,10	5,72 ± 1,45	0,31 ± 0,03	1,65 ± 0,05	0,02 ± 0,01
24	5,72 ± 1,30	0,12 ± 0,11	5,59 ± 1,16	0,13 ± 0,02	5,04 ± 0,43	0,07 ± 0,01	5,87 ± 1,18	0,07 ± 0,03	5,82 ± 1,49	0,10 ± 0,04	1,67 ± 0,06	0,02 ± 0,01
36	5,77 ± 1,34	0,05 ± 0,02	5,64 ± 1,15	0,05 ± 0,01	5,09 ± 0,44	0,05 ± 0,03	5,91 ± 1,19	0,04 ± 0,02	5,92 ± 1,46	0,10 ± 0,01	1,69 ± 0,07	0,02 ± 0,01
48	5,82 ± 1,33	0,05 ± 0,02	5,69 ± 1,15	0,05 ± 0,01	5,12 ± 0,44	0,03 ± 0,01	5,96 ± 1,17	0,05 ± 0,02	6,0 ± 1,48	0,08 ± 0,03	1,71 ± 0,07	0,01 ± 0,01
72	5,87 ± 1,34	0,05 ± 0,01	5,76 ± 1,13	0,07 ± 0,02	5,18 ± 0,45	0,06 ± 0,02	6,01 ± 1,17	0,05 ± 0,01	6,07 ± 1,50	0,07 ± 0,01	1,72 ± 0,10	0,01 ± 0,01

Tabela 13. Ilość wydalonego glukuronidu paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

Czas [h]	APAP 250 mg/kg m.c.		APAP 250 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c.		APAP 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]		APAP 250 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 250 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]	
	Wydalona ilość metabolitu	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość metabolitu	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość metabolitu	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość metabolitu	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość metabolitu	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość metabolitu	(U _∞ -U _t)
2	13,54 ± 3,78	13,54 ± 3,78	6,08 ± 1,78	6,08 ± 1,78	8,83 ± 2,51	8,83 ± 2,51	8,87 ± 3,13	8,87 ± 3,13	4,42 ± 1,42	4,42 ± 1,42	4,13 ± 0,52	4,13 ± 0,52
4	19,60 ± 6,20	6,06 ± 3,21	12,14 ± 1,26	6,06 ± 0,52	17,26 ± 0,99	8,43 ± 2,55	18,09 ± 0,45	9,22 ± 2,38	12,84 ± 2,26	8,42 ± 2,73	6,97 ± 0,25	2,84 ± 0,33
6	23,11 ± 6,04	3,51 ± 0,35	15,06 ± 1,00	2,92 ± 1,14	19,36 ± 1,05	2,10 ± 0,23	20,68 ± 5,03	2,59 ± 0,57	16,63 ± 4,05	3,79 ± 0,38	7,95 ± 0,17	0,98 ± 0,08
8	28,47 ± 3,96	5,36 ± 2,24	19,93 ± 2,89	4,87 ± 1,92	20,74 ± 1,40	1,38 ± 0,48	23,78 ± 3,19	3,10 ± 0,24	19,53 ± 4,80	2,90 ± 0,75	8,82 ± 0,02	0,87 ± 0,04
12	29,77 ± 3,50	1,30 ± 0,64	21,81 ± 3,32	1,88 ± 0,66	21,36 ± 1,52	0,62 ± 1,20	25,74 ± 2,98	1,96 ± 0,98	21,76 ± 4,04	2,23 ± 0,76	9,04 ± 0,10	0,22 ± 0,04
24	30,99 ± 4,33	1,22 ± 0,88	23,02 ± 3,93	1,21 ± 0,60	22,09 ± 1,60	0,73 ± 0,08	26,48 ± 3,45	0,74 ± 0,48	22,68 ± 4,27	0,92 ± 0,22	9,23 ± 0,07	0,19 ± 0,03
36	31,43 ± 4,45	0,44 ± 0,14	23,64 ± 4,15	0,62 ± 0,41	22,41 ± 7,23	0,32 ± 1,15	27,03 ± 3,07	0,55 ± 0,11	23,43 ± 3,93	0,75 ± 0,35	9,34 ± 0,08	0,11 ± 0,02
48	31,67 ± 4,43	0,24 ± 0,05	23,95 ± 4,16	0,31 ± 0,14	24,20 ± 6,92	0,18 ± 0,05	27,42 ± 3,05	0,39 ± 0,08	23,95 ± 3,94	0,52 ± 0,12	9,41 ± 0,10	0,07 ± 0,01
72	32,08 ± 4,49	0,41 ± 0,10	24,45 ± 4,26	0,50 ± 0,31	27,71 ± 6,1	3,51 ± 0,89	27,81 ± 3,00	0,39 ± 0,09	24,36 ± 3,94	0,41 ± 0,06	9,46 ± 0,11	0,05 ± 0,01

Tabela 14. Ilość wydalonego paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

Czas [h]	APAP 500 mg/kg m.c.		APAP 500 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c.		APAP 500 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 500 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]		APAP 500 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 500 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]	
	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)	Wydalona ilość leku	(U _∞ -U _t)
2	2,52 ± 1,08	2,52 ± 1,08	1,99 ± 0,18	1,99 ± 0,18	0,84 ± 0,14	0,84 ± 0,14	0,89 ± 0,28	0,89 ± 0,28	1,64 ± 0,55	1,64 ± 0,55	2,75 ± 0,21	2,75 ± 0,21
4	5,40 ± 2,33	2,88 ± 1,49	2,67 ± 0,64	0,68 ± 0,27	3,98 ± 0,45	3,14 ± 0,57	4,03 ± 1,08	3,14 ± 1,08	3,92 ± 0,16	2,28 ± 0,65	3,84 ± 0,02	1,09 ± 0,24
6	7,85 ± 1,74	2,45 ± 0,77	4,64 ± 1,38	1,97 ± 0,39	6,50 ± 0,66	2,52 ± 0,48	6,51 ± 1,08	2,48 ± 0,01	6,69 ± 0,64	2,77 ± 0,30	5,18 ± 0,32	1,34 ± 0,30
8	9,78 ± 3,73	1,93 ± 0,96	7,97 ± 1,97	3,33 ± 0,67	7,53 ± 0,94	1,03 ± 0,06	8,35 ± 1,60	1,84 ± 0,18	8,36 ± 0,76	1,67 ± 0,12	6,43 ± 0,84	1,26 ± 0,52
12	13,18 ± 4,65	3,40 ± 0,06	12,10 ± 0,85	4,13 ± 1,13	7,97 ± 0,93	0,44 ± 0,06	10,82 ± 0,47	2,47 ± 0,14	11,78 ± 1,53	3,42 ± 0,29	6,58 ± 0,81	0,15 ± 0,09
24	13,89 ± 4,62	0,71 ± 0,05	13,70 ± 0,48	1,60 ± 0,53	8,45 ± 0,95	0,48 ± 0,01	11,56 ± 0,59	0,74 ± 0,02	12,77 ± 2,22	0,99 ± 0,09	6,65 ± 0,91	0,07 ± 0,02
36	14,05 ± 4,54	0,16 ± 0,06	13,96 ± 0,43	0,26 ± 0,08	8,58 ± 0,64	0,13 ± 0,01	11,76 ± 0,73	0,20 ± 0,01	12,89 ± 2,28	0,12 ± 0,01	6,70 ± 0,98	0,05 ± 0,01
48	14,14 ± 4,56	0,09 ± 0,01	14,03 ± 0,41	0,07 ± 0,01	8,67 ± 2,68	0,09 ± 0,01	11,82 ± 0,74	0,06 ± 0,01	12,96 ± 0,23	0,07 ± 0,01	6,73 ± 1,01	0,03 ± 0,01
72	14,15 ± 4,52	0,01 ± 0,01	14,35 ± 0,30	0,32 ± 0,01	8,72 ± 2,67	0,05 ± 0,02	11,90 ± 0,73	0,08 ± 0,01	13,09 ± 2,39	0,13 ± 0,02	6,74 ± 1,03	0,01 ± 0,01

Tabela 15. Ilość wydalonego glukuronidu paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

Czas [h]	APAP 500 mg/kg m.c.		APAP 500 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c.		APAP 500 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 500 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]		APAP 500 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [0 h]		APAP 500 mg/kg m.c. TRI 250 mg/kg m.c. NAC 150 mg/kg m.c. [2 h]	
	Wydalona ilość metabolitu	($U_{\infty}-U_t$)	Wydalona ilość metabolitu	($U_{\infty}-U_t$)	Wydalona ilość metabolitu	($U_{\infty}-U_T$)	Wydalona ilość metabolitu	($U_{\infty}-U_t$)	Wydalona ilość metabolitu	($U_{\infty}-U_t$)	Wydalona ilość metabolitu	($U_{\infty}-U_t$)
2	8,26 ± 1,35	8,26 ± 1,35	6,53 ± 0,41	6,53 ± 0,41	3,83 ± 0,95	3,83 ± 0,95	6,12 ± 0,83	6,12 ± 0,83	7,66 ± 0,66	7,66 ± 0,66	8,59 ± 1,24	8,59 ± 1,24
4	19,75 ± 6,34	11,49 ± 2,87	10,71 ± 0,27	4,18 ± 0,23	16,67 ± 1,76	12,84 ± 3,69	20,03 ± 2,13	13,91 ± 2,13	18,03 ± 4,36	10,37 ± 2,61	13,20 ± 2,23	4,61 ± 0,99
6	28,45 ± 5,68	8,70 ± 1,45	20,97 ± 2,87	10,26 ± 2,29	26,38 ± 3,66	9,71 ± 1,19	31,12 ± 2,24	11,08 ± 2,94	28,46 ± 3,45	10,43 ± 1,44	20,79 ± 3,37	7,59 ± 1,14
8	40,5 ± 13,8	12,09 ± 1,55	41,25 ± 2,09	20,28 ± 3,83	29,83 ± 4,56	3,45 ± 0,27	40,74 ± 0,46	9,63 ± 1,78	35,87 ± 3,38	7,41 ± 0,07	28,48 ± 3,68	7,70 ± 0,31
12	60,86 ± 17,5	20,32 ± 4,78	66,64 ± 9,97	25,39 ± 4,90	32,50 ± 0,49	2,67 ± 0,51	58,32 ± 6,6	17,63 ± 6,93	55,12 ± 11,81	19,25 ± 4,45	29,59 ± 3,75	1,11 ± 0,19
24	66,85 ± 19,8	5,99 ± 0,76	82,55 ± 11,00	15,91 ± 1,43	32,89 ± 4,22	0,39 ± 0,01	65,25 ± 8,8	6,88 ± 1,37	63,74 ± 14,43	8,62 ± 2,53	29,82 ± 3,84	0,23 ± 0,08
36	68,75 ± 13,3	1,90 ± 0,05	84,81 ± 10,08	2,26 ± 0,81	34,16 ± 4,75	1,27 ± 0,04	67,02 ± 15,2	1,77 ± 0,32	64,96 ± 18,31	1,22 ± 0,09	29,96 ± 3,89	0,14 ± 0,02
48	69,26 ± 10,4	0,51 ± 0,05	85,54 ± 10,05	0,73 ± 0,04	34,79 ± 5,07	0,63 ± 0,01	67,53 ± 18,2	0,51 ± 0,02	65,47 ± 19,65	0,51 ± 0,08	30,03 ± 3,94	0,07 ± 0,01
72	69,37 ± 19,8	0,11 ± 0,03	86,31 ± 10,04	0,77 ± 0,09	35,21 ± 5,31	0,42 ± 0,06	68,02 ± 18,5	0,50 ± 0,09	65,85 ± 15,92	0,38 ± 0,06	30,05 ± 3,96	0,02 ± 0,01

Tabela 16. Stałe szybkości eliminacji z moczem i czas półtrwania wolnego paracetamolu po podaniu pojedynczym APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. i/lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.), ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	DAWKĄ APAP (mg/kg m.c.)	Stała szybkości eliminacji k	Czas półtrwania t _{0,5} [h]
APAP	250	0,1212 ± 0,0414	5,7201 ± 1,9530
	500	0,1535 ± 0,0145	4,5164 ± 0,4258
APAP + TRI	250	0,1137 ± 0,0385	6,0940 ± 2,0606
	500	0,0918 * ± 0,0177	7,5544 ± 1,4609
APAP + NAC [0h]	250	0,1202 ± 0,0414	5,7648 ± 2,4661
	500	0,1205 *• ± 0,0002	5,7523 ± 1,1751
APAP + NAC [2h]	250	0,1234 ± 0,0450	5,6171 ± 2,0505
	500	0,1182 *• ± 0,0205	5,8664 ± 1,0189
APAP + TRI + NAC [0h]	250	0,1113 ± 0,0343	6,2266 ± 1,9229
	500	0,1141 *• ± 0,0002	6,0747 ± 1,1587
APAP + TRI + NAC [2h]	250	0,1127 ± 0,0356	6,1502 ± 1,9415
	500	0,1583 *•▲ ± 0,0422	4,3785 ± 1,1675

* różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP

• różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i TRI

♣ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC

▲ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC [2h]

Tabela 17. Stałe szybkości eliminacji z moczem i czas półtrwania glukuronidu paracetamolu po podaniu pojedynczym APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. i/lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.), ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	DAWKĄ APAP (mg/kg m.c.)	Stała szybkości eliminacji k	Czas półtrwania t _{0,5} [h]
APAP	250	0,1107 ± 0,0317	6,2593 ± 1,7899
	500	0,1335 ± 0,0487	5,1924 ± 0,3454
APAP + TRI	250	0,0982 * ± 0,0246	7,0593 ± 1,7697
	500	0,1061 * ± 0,0125	6,5336 ± 0,7690
APAP + NAC [0h]	250	0,1090 • ± 0,0382	6,3601 ± 2,2276
	500	0,1031 * ± 0,0157	6,7241 ± 1,0250
APAP + NAC [2h]	250	0,1050 • ± 0,0296	6,6037 ± 1,8597
	500	0,1099 * ± 0,0133	6,3081 ± 0,7657
APAP + TRI + NAC [0h]	250	0,0964 * ± 0,0225	7,1889 ± 1,6768
	500	0,1166 ± 0,0001	5,9461 ± 0,6378
APAP + TRI + NAC [2h]	250	0,1174 • ± 0,0311	4,0438 ± 0,9266
	500	0,1714 *, •, ♣, ▲ ± 0,0393	5,9060 ± 1,5626

* różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP

• różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i TRI

♣ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC

▲ różnica istotna na poziomie $\alpha=0,05$ w porównaniu do grupy otrzymującej APAP i NAC [2h]

Tabela 18. Procentowa ilość wydalonego wolnego paracetamolu i glukuronidu w moczu po podaniu pojedynczym APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. i/lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.), ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	DAWKA APAP (mg/kg m.c.)	Procent wydalonego wolnego paracetamolu do podanej dawki [%]	Procent wydalonego glukuronidu do podanej dawki [%]
APAP	250	7,57	18,32
	500	9,83	20,85
APAP + TRI	250	8,21	14,49
	500	9,27	25,50
APAP + NAC	250	6,68	15,48
	500	6,06	10,58
APAP + NAC (2h)	250	7,75	15,54
	500	7,65	18,61
APAP + TRI + NAC	250	7,83	13,61
	500	9,09	19,80
APAP + TRI + NAC (2h)	250	3,23	6,54
	500	4,25	7,58

Tabela 19. Aktywność AIAT po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	35,0 26-45	39,0 31-47	35,5 27-43	34,5 32-48	30,5 27-36	34,5 27-45	40,0 31-47	39,0 28-47
APAP 250 mg/kg m.c.	32,5 30-40	37,0 24-50	41,5 29-44	31,5 23-47	29,5 21-37	26,5 23-50	28,0 21-47	32,0 30-49
APAP + TRI	36,0 29-49	34,5 26-50	27,5 24-35	31,5 23-47	31,5 27-52	35,5 30-49	33,5 24-42	31,5 23-47
APAP + NAC (0h)	58,5*♣ 53-64	66,0*♣ 56-75	64,0*♣ 57-75	62,0*♣ 56-67	62,0*♣ 55-63	73,0*♣ 68-81	41,0 24-47	34,5 21-49
APAP + NAC (2h)				56,5* 41-61	68,0*♣ 58-76	59,5*♣ 55-65	49,5* 47-53	39,5 28-52
APAP + TRI + NAC (0h)	67,5*♣ 60-75	63,0*♣ 59-72	64,5*♣ 51-79	63,0*♣ 52-75	78,0*♣ 64-89	62,0*♣ 59-76	35,5 23-47	36,0 23-48
APAP + TRI + NAC (2h)				56,5*♣ 50-68	69,5*♣ 59-74	60,5*♣ 51-68	45,5 32-51	34,5 28-43

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 20. Aktywność AIAT po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	35,0 26-45	39,0 31-47	35,5 27-43	34,5 32-48	30,5 27-36	34,5 27-45	40,0 31-47	39,0 28-47
APAP 500 mg/kg m.c.	32,5 25-40	35,0 30-43	28,0 20-37	32,0 24-47	27,5 23-48	30,0 28-41	28,0 22-42	30,5 24-44
APAP + TRI	50,5*♣ 48-59	49,0*♣ 44-59	60,5*♣ 52-76	68,0*♣ 52-83	73,0*♣ 64-83	58,0*♣ 53-62	45,0 25-48	39,5 25-43
APAP + NAC (0h)	64,0*♣ 52-67	71,0*♣ 57-74	76,0*♣ 66-82	60,5*♣ 56-68	64,5*♣ 58-71	51,5*♣ 45-55	41,0 33-47	43,5 26-50
APAP + NAC (2h)				69,0*♣ 64-75	59,0*♣ 53-67	53,0*♣ 51-68	40,0 32-50	40,0 27-49
APAP + TRI + NAC (0h)	57,5*♣ 54-67	69,5*♣ 68-83	70,0*♣ 65-84	62,5*♣ 58-70	66,5*♣ 56-69	69,0*♣ 59-77	42,0 25-50	36,5 32-49
APAP + TRI + NAC (2h)				58,0* 45-65	71,0*♣ 60-78	74,5*♣ 69-79	46,5 30-53	32,5 20-50

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 21. Aktywność AspAT po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	AMINOTRANSFERAZA ASPARAGINIANOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	110,5 92-121	103,5 88-128	93,5 65-108	95,5 68-104	83,5 63-104	83,0 67-105	91,5 71-121	101,5 62-116
APAP 250 mg/kg m.c.	83,5 64-105	90,0 78-108	94,0 66-127	88,5 66-128	79,0 63-116	102,5 72-117	102,0 67-113	98,5 67-103
APAP + TRI	99,5 72-107	103,5 91-112	119,0 101-121	106,0 95-121	160,5*♣ 148-180	141,5* 116-149	76,5 71-98	83,0 63-98
APAP + NAC (0h)	98,5 86-111	136,5*♣ 128-152	151,5*♣ 142-169	142,0*♣ 132-154	158,5*♣ 128-195	108,0 97-121	99,5 76-117	102,5 80-118
APAP + NAC (2h)				142,5*♣ 132,-153	146,5*♣ 140-163	159,0*♣ 143-170	100,5 71-129	106,0 73-118
APAP + TRI + NAC (0h)	114,0 97-126	144,0*♣ 131-165	148,5*♣ 143-160	139,5*♣ 131-150	161,0*♣ 141-172	148,5*♣ 133-158	101,0 68-118	86,5 65-100
APAP + TRI + NAC (2h)				146,5*♣ 139-160	162,0*♣ 152-175	142,5*♣ 130-150	94,0 70-109	103,5 71-120

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 22. Aktywność AspAT po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	AMINOTRANSFERAZA ASPARAGINIANOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	110,5 92-121	103,5 88-128	93,5 65-108	95,5 68-104	83,5 63-104	83,0 67-105	91,5 71-121	101,5 62-116
APAP 500 mg/kg m.c.	85,5 68-105	93,5 71-128	100,0 71-118	99,0 67-116	141,5* 131-162	161,5* 148-208	141,5* 131-150	93,5 71-104
APAP + TRI	111,0 89-120	115,0* 105-132	120,5* 108-130	134,0*♣ 125-153	208,0*♣ 200-224	181,5* 161-195	97,5* 71-103	100,5 80-106
APAP + NAC (0h)	103,0 81-117	185,5*♣ 170-210	198,5*♣ 183-208	199,0*♣ 180-216	205,5*♣ 194-223	190,5* 180-202	90,5* 76-111	87,5 73-113
APAP + NAC (2h)				202,5*♣ 184-218	200,5*♣ 187-222	187,0* 172-200	99,5* 68-119	101,5 88-113
APAP + TRI + NAC (0h)	100,5 78-120	183,0*♣ 160-196	216,5*♣ 199-235	239,0*♣ 200-265	204,0*♣ 190-231	193,5* 167-204	101,0* 75-120	90,5 71-100
APAP + TRI + NAC (2h)				229,0*♣ 213-241	218,5*♣ 200-235	187,0* 180-200	99,5* 68-119	101,5 88-113

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 23. Aktywność LDH po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	DEHYDROGENAZA MLECZANOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	685,0 588-720	710,5 600-732	689,5 624-742	703,0 600-731	704,5 624-722	708,0 647-742	710,0 674-729	701,5 600-706
APAP 250 mg/kg m.c.	686,5 648-745	671,0 608-706	786,0 709-835	804,0* 788-867	1048,5* 914-1141	910,0* 839-966	569,5* 526-625	593,5 549-669
APAP + TRI	702,0 605-749	643,0 570-749	643,0 611-754	873,0* 796-902	937,5* 827-982	658,5♣ 643-700	610,5 576-655	670,5 599-718
APAP + NAC (0h)	1424,5*♣ 1158-1519	2092,0*♣ 1789-2192	1483,0*♣ 1444-1692	1086,5*♣ 918-1218	854,0* 756-996	788,0 630-873	669,0 600-742	652,5 486-758
APAP + NAC (2h)				1293,0*♣ 1200-1453	976,0* 906-1169	863,5* 787-947	670,5 563-815	659,0 470-700
APAP + TRI + NAC (0h)	1011,5*♣ 962-1077	1485,5*♣ 1421-1743	1298,5*♣ 1128-1613	1478,0*♣ 1250-1683	1332,5* 1106-1458	846,0* 740-976	645,0 571-743	654,0 543-710
APAP + TRI + NAC (2h)				1075,0*♣ 935-1115	1021,0* 920-1211	795,5 700-944	587,5 535-763	667,0 462-781

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 24. Aktywność LDH po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	DEHYDROGENAZA MLECZANOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	685,0 588-720	710,5 600-732	689,5 624-742	703,0 600-731	704,5 624-722	708,0 647-742	710,0 674-729	701,5 600-706
APAP 500 mg/kg m.c.	697,0 601-725	700,5 610-741	797,5 706-881	918,0* 822-1053	1392,0* 1302-1473	1004,0* 902-1081	502,0 442-569	623,0 599-706
APAP + TRI	722,0 684-735	757,5 728-801	797,0* 744-850	909,0* 885-1077	1158,0*♣ 1100-1279	959,0* 931-1009	606,5 557-643	613,0 526-665
APAP + NAC (0h)	560,0 507-734	659,5 553-789	1033,0*♣ 917-1288	1727,0*♣ 1547-1991	1727,0*♣ 1323-2017	841,5* 754-913	790,0*♣ 712-975	737,0 654-819
APAP + NAC (2h)				2616,5*♣ 2019-2792	2478,5*♣ 2247-2747	841,0 686-965	781,5*♣ 614-896	675,5 528-768
APAP + TRI + NAC (0h)	667,0 563-705	807,0* 714-1025	823,5* 728-1100	1409,0*♣ 1277-1540	1829,0*♣ 1717-2109	855,0* 763-1015	659,5 500-729	549,0 469-635
APAP + TRI + NAC (2h)				962,0* 877-1148	1517,5* 1348-1809	664,5*♣ 567-717	655,0 519-682	619,0 528-719

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 25. Aktywność SDH po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	DEHYDROGENAZA SORBITOLOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	7,28 5,38-8,30	7,80 7,07-8,71	6,81 5,41-8,02	7,45 5,83-8,24	7,27 5,32-8,25	7,66 6,28-8,14	6,75 6,28-7,66	6,83 5,82-8,00
APAP 500 mg/kg m.c.	7,41 6,40-7,72	7,91 6,00-8,81	7,52 6,20-8,46	9,35* 8,00-10,38	10,15* 9,45-10,33	11,05* 10,63-12,05	7,20 6,12-9,69	7,51 6,25-8,01
APAP + TRI	6,85 6,40-8,86	7,08 5,70-7,68	6,39 5,40-7,25	10,23* 9,43-10,84	10,33* 9,02-10,99	6,28♣ 5,70-8,77	7,30 5,74-7,54	7,41 7,03-8,22
APAP + NAC (0h)	6,57 5,99-7,93	6,94 6,19-8,20	7,01 5,70-7,58	7,70 7,35-8,47	7,30♣ 6,15-8,00	7,18♣ 6,57-8,41	6,36 5,41-6,96	7,05 6,57-7,93
APAP + NAC (2h)				6,38♣ 5,40-7,35	6,92♣ 5,98-8,12	6,43♣ 5,46-8,00	6,76 5,74-7,96	7,86 6,57-8,28
APAP + TRI + NAC (0h)	7,63 5,99-8,01	7,88 6,55-8,64	8,37 6,44-8,66	8,02 6,70-8,20	7,21♣ 5,60-8,70	7,58♣ 6,83-8,22	6,34 5,56-7,83	7,57 6,68-7,86
APAP + TRI + NAC (2h)				7,23 6,67-7,95	7,70♣ 5,40-8,01	7,25♣ 6,50-7,83	7,04 6,46-8,02	6,14 5,48-7,96

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 26. Aktywność ICD po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6)

GRUPA	DEHYDROGENAZA IZOCYTRYNIANOWA [U/DM ³]							
	CZAS (h)							
	0,5	1,0	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	3,38 2,66-4,20	2,87 2,37-4,20	3,65 2,80-4,40	3,66 3,43-4,26	3,40 2,53-3,84	2,88 2,37-3,44	3,34 2,40-3,84	2,98 2,15-3,44
APAP 500 mg/kg m.c.	3,00 2,18-3,92	3,47 2,89-3,92	3,37 2,11-3,85	4,09 3,37-4,29	5,92* 4,59-6,36	5,43* 4,83-5,92	5,00* 4,70-6,63	2,53 2,37-3,41
APAP + TRI	2,98 2,22-3,74	3,70 2,25-3,90	3,46 3,03-4,21	4,17 3,15-4,98	5,01* 4,38-5,84	5,60* 5,00-6,04	4,76* 4,37-5,37	2,75 2,37-3,60
APAP + NAC (0h)	3,30 2,86-3,45	5,25* [♣] 4,80-5,66	5,46* [♣] 5,00-6,60	5,76* [♣] 5,53-6,89	5,82* 5,33-6,40	2,94 [♣] 2,40-3,27	3,05 [♣] 2,00-3,82	2,89 2,60-3,45
APAP + NAC (2h)				5,23* 4,22-5,84	7,16* 5,62-8,84	4,30 3,00-5,02	2,95 [♣] 2,62-3,73	2,76 2,20-3,21
APAP + TRI + NAC (0h)	3,22 2,81-3,64	5,50* [♣] 4,89-6,00	5,43* [♣] 5,00-6,64	5,48* [♣] 4,89-5,90	5,84* 5,00-6,35	3,42 [♣] 2,61-3,78	2,54 [♣] 2,07-3,20	2,85 2,65-3,69
APAP + TRI + NAC (2h)				4,58* 4,22-5,68	5,75* 5,00-6,68	2,78 [♣] 2,00-3,2	3,09 [♣] 2,7-4,00	3,17 2,00-3,93

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 27. Stężenie cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	CYTOCHROM P-450 [NMOL/MG BIAŁKA]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,8076±0,0244					
APAP 250 mg/kg m.c.	0,7138±0,0442	0,8557±0,2261	0,6994±0,0443	0,7088±0,0745	0,8022±0,0783	0,9074±0,0630
APAP + TRI	0,8100±0,0689	0,7067±0,0553	0,7067±0,0747	0,6668±0,1361	0,8444±0,1097	0,9014±0,0703
APAP + NAC (0h)	0,7883±0,0281	0,8413±0,0718	0,8768±0,0913	0,8682±0,0815	0,7688±0,1154	0,8270±0,1213
APAP + NAC (2h)		0,8284±0,0817	0,8342±0,1080	0,8956±0,1125	0,8457±0,0981	0,9218±0,0710
APAP + TRI + NAC (0h)	0,8154±0,0456	0,8295±0,0404	0,8606±0,0587	1,0119±0,0460	0,7739±0,1172	0,9150±0,0104
APAP + TRI + NAC (2h)		0,8809±0,0362	0,9445±0,0242	0,8400±0,0370	0,8947±0,0284	0,8521±0,0039

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 28. Stężenie cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	CYTOCHROM P-450 [NMOL/MG BIAŁKA]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,8076±0,0244					
APAP 500 mg/kg m.c.	0,6647±0,0113	1,0680±0,0842*	1,6713±0,1309*	1,8951±0,1796*	1,0887±0,0347*	0,9025±0,0315
APAP + TRI	0,6649±0,0263	0,6249±0,0551♣	0,9861±0,0773♣	1,0913±0,0336*♣	0,7202±0,0294♣	0,6993±0,0783
APAP + NAC (0h)	0,9202±0,0783♣	0,8000±0,0470♣	0,9979±0,0638♣	0,8159±0,0653♣	0,4125±0,0553*♣	0,4756±0,0205*♣
APAP + NAC (2h)		0,9211±0,0417	1,1708±0,1095*♣	0,9836±0,0798♣	0,8357±0,0981	0,9118±0,0710
APAP + TRI + NAC (0h)	0,9908±0,0262♣	0,9826±0,0441	0,9178±0,1237♣	1,2118±0,1105*♣	0,9474±0,0317	0,8255±0,0336
APAP + TRI + NAC (2h)		0,9275±0,0456	1,0642±0,0709*♣	1,0638±0,1170*♣	0,9136±0,0336	0,8126±0,0458

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 29. Stężenie cytochromu b₅ w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	CYTOCHROM B ₅ [NMOL/MG BIAŁKA]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,7453±0,0286					
APAP 250 mg/kg m.c.	0,6656±0,0728	0,5736±0,0983*	0,5610±0,0400*	0,4874±0,0484*	0,4292±0,0670*	0,7566±0,0752
APAP + TRI	0,7132±0,0333	0,7174±0,0313♣	0,6780±0,0805	0,5868±0,0592*	0,5899±0,1034	0,6044±0,0715
APAP + NAC (0h)	0,7462±0,0683	0,7955±0,0531♣	0,7142±0,1192	0,5711±0,1735	0,5977±0,1231	0,6357±0,0604
APAP + NAC (2h)		0,6536±0,0931	0,6326±0,1359	0,6693±0,1252	0,6512±0,2042	0,6570±0,1941
APAP + TRI + NAC (0h)	0,7690±0,0678	0,6922±0,0650	0,5912±0,1223	0,7833±0,1026♣	0,4519±0,0386*	0,5919±0,1057
APAP + TRI + NAC (2h)		0,6064±0,0285	0,5207±0,0777*	0,5672±0,0567*	0,4680±0,0375*	0,4815±0,0421*♣

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 30. Stężenie cytochromu b₅ w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	CYTOCHROM B ₅ [NMOL/MG BIAŁKA]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,7453±0,0286					
APAP 500 mg/kg m.c.	0,6245±0,0504*	0,6367±0,0346*	0,6476±0,0270*	0,5006±0,0463*	0,5010±0,0274*	0,7185±0,1004
APAP + TRI	0,6891±0,1348	0,7447±0,0413♣	0,6172±0,0325*	0,4838±0,0125*	0,3970±0,0251*♣	0,5436±0,0765*
APAP + NAC (0h)	0,7462±0,0683	0,7955±0,0531*	0,7142±0,1192	0,5711±0,1735	0,5977±0,1231	0,6357±0,0605
APAP + NAC (2h)		0,6536±0,0931	0,6326±0,1359	0,6693±0,1252	0,6512±0,2042	0,6570±0,1941
APAP + TRI + NAC (0h)	0,8731±0,0253*	0,8689±0,0500*	0,7875±0,0707*	0,7379±0,0425*	0,8789±0,1024*	0,7807±0,0704
APAP + TRI + NAC (2h)		0,8370±0,0441*	0,8377±0,0678*	0,7092±0,0302*	0,6910±0,0978*	0,7107±0,0934

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 31. Aktywność reduktazy NADPH-cytochrom P-450 po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	REDUKTAZA NADPH-CYTOCHROM P-450 [$\mu\text{MOL}/\text{MIN.}/\text{MG}$]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,1039±0,0054					
APAP 250 mg/kg m.c.	0,1116±0,0139	0,1238±0,0153*	0,1247±0,0234*	0,1445±0,0450	0,1207±0,0124	0,1145±0,0071
APAP + TRI	0,0986±0,0109	0,1208±0,0136	0,1215±0,0107	0,1042±0,0152	0,1112±0,0082	0,1302±0,0103*
APAP + NAC (0h)	0,0970±0,0059	0,0978±0,0138♣	0,0867±0,0055*♣	0,0833±0,0177	0,0932±0,0063	0,1010±0,0097
APAP + NAC (2h)		0,0908±0,0110♣	0,0865±0,0092*♣	0,0860±0,0140	0,1026±0,0114	0,1108±0,0029
APAP + TRI + NAC (0h)	0,1011±0,0045	0,1199±0,0127	0,1251±0,0121	0,1056±0,0077	0,0944±0,0081	0,1103±0,0073
APAP + TRI + NAC (2h)		0,1061±0,0127	0,1314±0,0063*	0,1158±0,0056	0,0866±0,0077*♣	0,0952±0,0065

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 32. Aktywność reduktazy NADPH-cytochrom P-450 po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	REDUKTAZA NADPH-CYTOCHROM P-450 [$\mu\text{MOL}/\text{MIN.}/\text{MG}$]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,1039 \pm 0,0054					
APAP 500 mg/kg m.c.	0,1222 \pm 0,0133	0,1017 \pm 0,0143	0,1385 \pm 0,0033	0,1216 \pm 0,0120	0,1128 \pm 0,0200	0,1011 \pm 0,0102
APAP + TRI	0,1192 \pm 0,0076	0,1249 \pm 0,0043	0,1097 \pm 0,0096	0,1117 \pm 0,0043	0,1364 \pm 0,0061	0,1128 \pm 0,0123
APAP + NAC (0h)	0,1192 \pm 0,0091	0,1166 \pm 0,0088	0,1062 \pm 0,0097	0,0889 \pm 0,0090	0,0896 \pm 0,0049	0,0846 \pm 0,0035
APAP + NAC (2h)		0,1227 \pm 0,0082	0,1072 \pm 0,0042	0,1002 \pm 0,0084	0,0939 \pm 0,0099	0,1045 \pm 0,0049
APAP + TRI + NAC (0h)	0,1160 \pm 0,0041	0,1232 \pm 0,0100	0,1205 \pm 0,0064	0,1154 \pm 0,0077	0,1175 \pm 0,0092	0,1028 \pm 0,0069
APAP + TRI + NAC (2h)		0,1021 \pm 0,0082	0,0961 \pm 0,0093	0,1012 \pm 0,0120	0,1038 \pm 0,0089	0,0945 \pm 0,0073

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 33. Aktywność reduktazy NADH-cytochrom b₅ po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	REDUKTAZA NADH-CYTOCHROM B ₅ [μMOL/MIN./MG]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,8405±0,0182					
APAP 250 mg/kg m.c.	0,8033±0,0524	0,6881±0,0878*	0,5918±0,0346*	0,6624±0,0908*	0,6393±0,1094*	0,9852±0,1302
APAP + TRI	0,8041±0,0143	0,8327±0,0359	0,6315±0,0210*	0,7439±0,0558	0,6301±0,0615*	0,7499±0,0266
APAP + NAC (0h)	0,7688±0,0682	0,7086±0,0348	0,7069±0,1308	0,7162±0,1128	0,6779±0,0943*	0,7148±0,0460
APAP + NAC (2h)		0,7180±0,0520	0,6341±0,0865*	0,7133±0,1106	0,7394±0,0674	0,7840±0,0569
APAP + TRI + NAC (0h)	0,8236±0,0145	0,9115±0,0093♣	0,7302±0,0566♣	0,6288±0,0437*	0,5110±0,0250*	0,5009±0,0728*♣
APAP + TRI + NAC (2h)		0,8030±0,0254	0,7212±0,0227♣	0,6728±0,0482	0,6235±0,0230*	0,5145±0,0424*♣

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 34. Aktywność reduktazy NADH-cytochrom b₅ po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	REDUKTAZA NADH-CYTOCHROM B ₅ [μMOL/MIN./MG]					
	CZAS (H)					
	1,5	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	0,8405±0,0182					
APAP 500 mg/kg m.c.	0,8109±0,0563	0,8747±0,0332	0,6651±0,0566*	0,5896±0,0141*	0,6696±0,0334*	0,8001±0,0732
APAP + TRI	0,8599±0,0379	0,8885±0,0201	0,5540±0,0488*♣	0,4589±0,0111*♣	0,3750±0,0328*♣	0,4499±0,0109*♣
APAP + NAC (0h)	0,9112±0,0535*	0,8543±0,0395	0,8020±0,0629*	0,8485±0,0581*	0,8128±0,0235*	0,9410±0,0666*
APAP + NAC (2h)		0,9875±0,0417*♣	0,8747±0,0330*	0,8326±0,0720*	0,8634±0,0218*	0,8800±0,0743
APAP + TRI + NAC (0h)	0,9395±0,0395*♣	0,9212±0,0650*	0,8996±0,0355*	0,8789±0,0394*	0,8037±0,0334*	0,8401±0,0368
APAP + TRI + NAC (2h)		0,8053±0,0547	0,8942±0,0985*	0,8734±0,0520*	0,8841±0,0947*	0,9703±0,0123

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 35. Izoformy cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (n=6).

GRUPA	IZOFORMY CYTOCHROMU P-450 [% KONTROLI]														
	CZAS (h)														
	4,0			12,0			24,0			48,0			120,0		
	2E1	2B1/2	1A2	2E1	2B1/2	1A2	2E1	2B1/2	1A2	2E1	2B1/2	1A2	2E1	2B1/2	1A2
Kontrola	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
APAP 250 mg/kg m.c.	167*	144*	88	142*	98	77	242*	172*	65*	133*	163*	88	124	126	90
APAP 250 + TRI	164*	137*	93	136*	167*♣	77	171*♣	241*♣	107♣	172*	253*♣	110	134*	145*	106
APAP 250 + NAC (0h)	119♣	182*♣	98	175*	174*♣	85	156*♣	247*♣	92	225*♣	276*♣	103	113	105	93
APAP 250 + NAC (2h)	116♣	122	89	144*	173*♣	66*	167*♣	145*	94	187*♣	164*	100	180*♣	81	77
APAP 250 + TRI + NAC (0h)	119♣	173*	119	135*	129*♣	84	193*♣	196*	98	158*	124*	112	166*♣	185*♣	84
APAP 250 + TRI + NAC (2h)	142*	169*	172*♣	102	188*♣	101	169*♣	258*♣	52*	202*♣	139*	83	180*♣	135*	63*

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 36. Izoformy cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.) pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.); (n = 6)

GRUPA	IZOFORMY CYTOCHROMU P-450 [%]								
	CZAS (H)								
	2,0			24,0			48,0		
	2E1	2B1/2	1A2	2E1	2B1/2	1A2	2E1	2B1/2	1A2
Kontrola	100	100	100	100	100	100	100	100	100
APAP 500 mg/kg m.c.	97	219*	100	98	233*	86	95	237*	70
APAP 500 + TRI	102	238*	93	105	184*♣	100	100	133*♣	44*♣

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (500 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Część próbek (grupy APAP500+NAC(0), APAP500+NAC(2), APAP500+TRI+NAC(0) I APAP500+TRI+NAC(2) uległa zniszczeniu wskutek awarii zamrażarki. Powtórzenie doświadczenia nie było możliwe ze względów technicznych, finansowych oraz braku zezwolenia komisji etycznej.

Tabela 37. Stężenie glutationu po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	GLUTATION [MG/G TKANKI]				
	CZAS (H)				
	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	1,218±0,119				
APAP 250 mg/kg m.c.	0,975±0,078*	0,650±0,052*	1,365±0,130	1,430±0,078*	1,105±0,091
APAP 250 + TRI	0,956±0,052	0,974±0,096♣	0,937±0,057♣	0,950±0,075♣	1,268±0,058
APAP 250 + NAC (0h)	0,896±0,081*	1,117±0,119♣	1,169±0,165	1,202±0,072♣	1,163±0,146
APAP 250 + NAC (2h)	1,026±0,180	1,163±0,131♣	1,144±0,186	1,393±0,019	1,543±0,235
APAP 250 + TRI + NAC (0h)	1,058±0,069	1,113±0,081♣	1,152±0,108	0,830±0,024♣	1,087±0,079
APAP 250 + TRI + NAC (2h)	0,943±0,046*	0,958±0,042*♣	0,831±0,041*♣	0,817±0,046*♣	0,958±0,025♣

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

Tabela 38. Stężenie glutationu po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm SD$, n=6).

GRUPA	GLUTATION [MG/G TKANKI]				
	CZAS (H)				
	4,0	12,0	24,0	48,0	120,0
Kontrola	1,088±0,119				
APAP 500 mg/kg m.c.	0,661±0,046*	0,834±0,038*	1,128±0,057	1,232±0,037*	1,011±0,056*
APAP 500 + TRI	0,884±0,078*	0,663±0,052*♣	0,520±0,104*♣	0,547±0,234*♣	1,378±0,143*
APAP 500 + NAC (0h)	0,835±0,036*♣	0,738±0,031*♣	0,809±0,025*♣	0,913±0,056*	0,822±0,023*♣
APAP 500 + NAC (2h)	1,116±0,100*	1,157±0,126*	1,107±0,083	1,021±0,117*	1,265±0,086*
APAP 500 + TRI + NAC (0h)	0,831±0,031*♣	0,734±0,030*♣	0,709±0,034*♣	0,827±0,031*♣	0,868±0,035*♣
APAP 500 + TRI + NAC (2h)	0,723±0,021*	0,745±0,067*	0,594±0,071*♣	0,669±0,081*♣	0,938±0,044*

* różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej na poziomie $\alpha = 0,05$

♣ różnica statystycznie istotna w porównaniu do grupy otrzymującej APAP (250 mg/kg m.c.) na poziomie $\alpha = 0,05$

6. Omówienie wyników i dyskusja.

Przeprowadzono badania wpływu trichloroetyleny oraz N-acetylocysteiny (NAC) na farmakokinetykę paracetamolu oraz funkcje wątroby a także układ wątrobowych enzymów mikrosomalnych biorących udział w biotransformacji tego leku u szczurów. Zwierzętom podawano jednorazowo sondą dożołądkowo paracetamol (APAP) w dawkach 250 lub 500 mg/kg m.c., trichloroetylen (TRI) w dawce 250 mg/kg m.c. i N-acetylocysteinę (NAC) w dawce 150 mg/kg m.c. według schematu przedstawionego w rozdziale 4.1.2. Paracetamol podawano pojedynczo lub jednocześnie z trichloroetylenem, natomiast N-acetylocysteinę równocześnie (0h) lub po dwóch godzinach od podania (2h) pozostałych ksenobiotyków (APAP i/lub TRI). W badaniach wykorzystano materiał biologiczny (krew, mocz, wątroba) pobierany w określonym czasie od podania ksenobiotyków.

6.1. Farmakokinetyka paracetamolu w surowicy

Do badań farmakokinetycznych pobierano krew z serca po upływie 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 90 minut oraz 4, 12, 24, 48 i 120 godzin od podania ksenobiotyków. W surowicy oznaczano stężenie APAP metodą TDx.

Na podstawie oznaczonych stężeń paracetamolu w surowicy wyznaczono następujące parametry farmakokinetyczne: biologiczny okres półtrwania $t_{0,5}$, stężenie maksymalne C_{max} i czas t_{max} , po którym jest ono osiągane, pole powierzchni pod krzywą zmian stężeń AUC, klirens Cl, objętość dystrybucji w kompartmentcie centralnym V_c , w stanie stacjonarnym V_{ss} i w fazie eliminacji $V_{d\ area}$. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 8 i 9 oraz na rycinach 10-13.

6.1.1. **Biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5}$)**

Biologiczny okres półtrwania paracetamolu w dużym stopniu zależy od podanej dawki leku. U szczurów, którym podano APAP w dawce 250 mg/kg m.c. $t_{0,5}$ wynosił 3,696 h, natomiast dla dawki 500 mg/kg m.c. uległ wydłużeniu do 4,858 h.

Odmienne, po łącznym podaniu paracetamolu (w obu dawkach) i trichloroetyleny stwierdzono znaczne skrócenie $t_{0,5}$ w porównaniu do grupy otrzymującej sam lek. Dla dawki APAP 250 mg/kg m.c. $t_{0,5}$ wyniósł 2,113 h, a dla dawki 500 mg/kg m.c. wyniósł 3,909 h.

Równoczesne podanie APAP w dawce 250 lub 500 mg/kg m.c. oraz NAC spowodowało wydłużenie $t_{0,5}$, odpowiednio do 4,248 i 6,658 h. Po podaniu NAC po 2 h od intoksykacji stwierdzono nieznaczne wydłużenie $t_{0,5}$ jedynie po podaniu leku w wyższej dawce ($t_{0,5} = 5,292h$) w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP ($t_{0,5} = 4,86h$).

Po łącznym podaniu APAP, TRI i NAC, niezależnie od zastosowanej dawki leku, nie stwierdzono istotnych zmian w wartościach jego biologicznego okresu półtrwania.

6.1.2. Stężenie maksymalne (C_{max}) i czas jego osiągnięcia (t_{max})

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że czas po którym osiągane jest maksymalne stężenie APAP w surowicy koreluje ze wzrostem dawki leku. U szczurów otrzymujących lek w dawce 250 mg/kg m.c. stężenie maksymalne ($109,667 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) było osiągane w czasie równym 0,282 h. Natomiast w grupie zwierząt, którym podano 500 mg/kg m.c. maksymalne stężenie leku ($255,167 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) było osiągane szybciej, gdyż już po 0,158 h.

Trichloroetylen wydłużał t_{max} paracetamolu i obniżał C_{max} . Obserwowane zmiany były silniej wyrażone u zwierząt otrzymujących APAP w dawce 250 mg/kg m.c. – t_{max} 0,740 h (około 2,5 razy dłuższy); C_{max} $45,201 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (ok. 2 razy). Podobny charakter zmian stwierdzono po podaniu wyższej dawki leku, niemniej wpływ TRI był znacznie mniejszy (C_{max} – $192,833 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, t_{max} – 0,194 h).

Stwierdzono, że NAC, zależnie od czasu podania, odmiennie wpływała na obydwa parametry. Podanie jednoczesne z APAP, powodowało obniżenie C_{max} o ok. 30% (z 110 do $77 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) dla dawki 250 mg/kg m.c. i o ok. 48% (z 255 do $133 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) dla dawki 500 mg/kg m.c. oraz wydłużenie t_{max} , odpowiednio do 0,419 h oraz 0,383 h. Odmiennie, po podaniu NAC po 2 h, niezależnie od dawki APAP, zarówno stężenie maksymalne jak i czas, po którym było osiągane były podobne jak po podaniu samego leku.

Łączne podanie TRI i NAC obniżało maksymalne stężenia osiągane przez APAP, odpowiednio o około 31% dla dawki 250 mg/kg m.c. i o około 55% dla dawki 500 mg/kg m.c. Jedynie po równoczesnym podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. oraz TRI i NAC, stwierdzono ok. 2-krotne skrócenie czasu wystąpienia maksymalnego stężenia. Odmiennie, po podaniu APAP (500), TRI i NAC stwierdzono wydłużenie t_{max} o 34% w porównaniu do analogicznej grupy otrzymującej wyłącznie sam lek. Podanie NAC po 2 h od podania APAP i TRI spowodowało dwukrotne wydłużenie t_{max} i obniżenie C_{max} dla obu dawek paracetamolu.

6.1.3. Pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia (AUC)

Wartość pola powierzchni pod krzywą (AUC) zależy od przebiegu krzywej zależności $\ln C=f(t)$ i jest miarą dostępności biologicznej leku. Na wielkość tego parametru mają wpływ zarówno procesy absorpcji jak i eliminacji leku. U szczurów otrzymujących APAP w dawkach 250 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c. wartość AUC wyniosła odpowiednio 269,0 i $1023,9 \mu\text{g}/\text{cm}^3 \text{ h}$.

Po podaniu APAP łącznie z TRI wartość AUC leku ulegała zmniejszeniu o około 20% dla dawki 250 mg/kg m.c. i o około 30% dla dawki 500 mg/kg m.c.

Jednoczesne podanie NAC z paracetamolem obniżyło o około 10% wartość AUC leku podanego w dawce 250 mg/kg m.c. i aż o 50% w dawce 500 mg/kg m.c. Po podaniu NAC po 2 h, niezależnie od dawki APAP, nie stwierdzono istotnych zmian w wartości AUC leku.

Podanie łączne APAP z TRI i NAC (jednocześnie lub po 2 h) spowodowało istotne obniżenie dostępności biologicznej leku w obu dawkach. Wartość AUC APAP w dawce 250 mg/kg m.c. była zmniejszona o ok. 20% i 27%, odpowiednio po podaniu NAC w czasie 0 i po 2 h; natomiast wartość AUC APAP w dawce 500 mg/kg m.c. była mniejsza odpowiednio o 70% i 40%.

6.1.4. Objętość dystrybucji w kompartmentie centralnym (V_c)

Objętość dystrybucji w kompartmentie centralnym u szczurów otrzymujących APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. wynosiła odpowiednio 1,508 i 1,148 dm³. U szczura o masie 300 g objętość krwi krążącej wynosi około 20 cm³ (50-70 cm³/kg m.c.). Uzyskane wartości V_c dla leku wielokrotnie przewyższają objętość kompartmentu centralnego, co świadczy o przenikaniu ksenobiotyku do wszystkich płynów ustrojowych.

Podanie TRI spowodowało wzrost V_c leku o około 30% u zwierząt otrzymujących APAP w obu badanych dawkach, co może świadczyć o kumulacji ksenobiotyków w tkankach i ich łączeniu się ze strukturami wewnątrzkomórkowymi (kompartament głęboki: tkanka tłuszczowa, kości).

Podobnie równoczesne podanie APAP (250 i 500 mg/kg m.c.) i NAC zwiększyło objętość dystrybucji w kompartmentie centralnym, odpowiednio o 56% i 100%. U zwierząt otrzymujących lek w dawkach 250 mg/kg m.c., którym podano NAC po 2 h, stwierdzono zmniejszenie objętości dystrybucji o ok. 17%.

Również łączne podanie TRI i NAC (0 h) istotnie wpłynęło na wzrost V_c APAP (o ok. 35% dla dawki 250 mg/kg m.c. i 180% dla dawki 500 mg/kg m.c.). Natomiast po podaniu NAC 2h po APAP i TRI stwierdzono wzrost wartości V_c o około 160% jedynie w grupie zwierząt otrzymujących lek w dawce 250 mg/kg m.c.

We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach podanie APAP łącznie z trichloroetylenem i/lub NAC spowodowało wzrost objętości dystrybucji leku, co może świadczyć o przenikaniu ksenobiotyku do płynów ustrojowych oraz jego kumulacji w tkankach i kompartmentie głębokim.

6.1.5. Objętość dystrybucji w fazie stacjonarnej (V_{ss})

Wartość ta opisuje objętość dystrybucji po ustaleniu się stanu równowagi pomiędzy dystrybucją leku w kompartmentie centralnym i peryferyjnym.

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy dawką leku a objętością dystrybucji osiąganą w stanie stacjonarnym.

Dla obu dawek, we wszystkich badanych grupach, nastąpił wzrost V_{ss} , przy czym największe zmiany stwierdzono po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. łącznie z NAC i TRI (wzrost ok. 2-krotny), oraz dla dawki APAP 500 mg/kg m.c., po jednoczesnym podaniu z NAC oraz łącznie z NAC i TRI (wzrost o 50 i 100%).

6.1.6. Objętość dystrybucji w fazie eliminacji ($V_{d\text{ area}}$)

Wartość ta określa objętość dystrybucji dla układu, w którym istnieje tylko faza eliminacji β . U zwierząt otrzymujących pojedynczo paracetamol w dawkach 250 i 500 mg/kg m.c. $V_{d\text{ area}}$ wyniosła odpowiednio 3,164 i 2,396 dm³.

TRI zwiększała $V_{d\text{ area}}$ jedynie po podaniu łącznym z paracetamolem w dawce 500 mg/kg m.c.

Objętość $V_{d\text{ area}}$ APAP, podanego równocześnie z NAC uległa zwiększeniu o 30% i 150% odpowiednio dla dawki 250 i 500 mg/kg m.c. Podanie odtrutki po 2 h od intoksykacji APAP z TRI nieznacznie zwiększyło $V_{d\text{ area}}$ (o 16%) tylko w przypadku dawki 500 mg/kg m.c.

Łączne podanie TRI i NAC (0 h) wywołało znaczne podwyższenie $V_{d\text{ area}}$ APAP (o ok. 20% dla dawki 250 mg/kg m.c. i o ok. 210% dla dawki 500 mg/kg m.c.). Wzrost wartości $V_{d\text{ area}}$ stwierdzono również w grupach zwierząt, którym podano NAC po 2 h od intoksykacji APAP łącznie z TRI, odpowiednio o 32 i 63% dla dawek 250 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c.

6.1.7. Klirens (Cl)

Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy podaną dawką APAP a wyznaczoną wartością klirensu. U zwierząt otrzymujących APAP w dawce 250 mg/kg m.c. obliczona wartość klirensu wyniosła 0,591 dm³/h, a dla dawki 500 mg/kg m.c. - 0,342 dm³/h. Uzyskane wyniki korelują z wydłużeniem czasu biologicznego półtrwania.

Podobną zależność zaobserwowano u zwierząt doświadczalnych otrzymujących paracetamol w dawce 250 mg/kg m.c. lub 500 mg/kg m.c. łącznie z trichloroetylenem, u których wzrost wartości klirensu o ok. 40% spowodował skrócenie czasu półtrwania $t_{0,5}$.

Jednoczesne podanie APAP w dawce 250 mg/kg m.c. z NAC spowodowało zmniejszenie wartości klirensu o ok. 62%. Odmiennie, u zwierząt otrzymujących wyższą dawkę APAP w skojarzeniu z NAC, wartość tego parametru uległa zwiększeniu do 0,628 dm³/h, tj. o ok. 50%. Nie stwierdzono wpływu NAC (2 h) na wartość klirensu APAP.

Wzrost klirensu leku stwierdzono również u wszystkich zwierząt otrzymujących łącznie trzy ksenobiotyki, odpowiednio o ok. 38 i 26% dla dawek 250 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c. Podanie

NAC po 2 h spowodowało wzrost klirensu o około 222% i 58% (250 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c.).

Analizując parametry farmakokinetyczne wyznaczone w badaniach własnych na podstawie pomiaru stężeń paracetamolu w surowicy wykazano istotny wpływ trichloroetyleny na biodostępność paracetamolu. TRI obniżał AUC paracetamolu oraz osiągnięte stężenie maksymalne, wydłużając czas, po którym jest ono osiągnięte. Istotny wpływ trichloroetyleny na te parametry może w konsekwencji ograniczać skuteczność terapeutyczną leku.

Podobnie, N-acetylocysteina podana łącznie z APAP zmniejsza biodostępność leku, osiągnięte stężenie maksymalne w surowicy i wydłuża czas jego osiągnięcia t_{max} , co potwierdza skuteczność działania NAC w zatruciu APAP. Wpływ NAC podanej po 2 h od przyjęcia APAP był słabiej zaznaczony.

Łączne podanie TRI i NAC obniżyło biodostępność i stężenie maksymalne APAP, a ponadto zwiększyło klirens leku. Stwierdzone zmiany były bardziej nasilone niż po łącznym podaniu APAP z TRI lub APAP z NAC. Ponadto wykazano większą skuteczność NAC w zatruciu skojarzonym APAP i TRI, gdzie jej działanie ograniczające biodostępność paracetamolu było większe niż po podaniu z samym lekiem.

Uzyskane wyniki badań własnych potwierdziły założoną hipotezę, że pomiędzy ocenianymi ksenobiotykami, zachodzą interakcje kinetyczne, które odpowiedzialne są za zmiany parametrów farmakokinetycznych paracetamolu.

Stężenie maksymalne leku oraz czas jego wystąpienia są uzależnione od szybkości i ilości wchłoniętej substancji. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Gawrońską-Szklarz u pacjentów leżących zahamowanie opróżniania żołądka a tym samym spowolnienie procesu absorpcji spowodowało około 36% obniżenie wartości C_{max} w porównaniu do grupy pacjentów chodzących (Gawrońska-Szklarz i wsp., 2008).

Czas osiągnięcia maksymalnego stężenia, w przypadku podania *per os*, zależy od postaci wprowadzanego leku. Podanie równoważnych dawek paracetamolu (1g) w postaci syropu lub tabletek powodowało istotne skrócenie czasu t_{max} (1,04 h – tabletki, 0,56 h- syrop). Czas ten ulegał dalszemu skróceniu po zastosowaniu w doświadczeniu leku w postaci tabletek musujących i wynosił około 0,5 h (Bogdanik, 1998).

$T_{0,5}$ zależy od wielkości podanej dawki i wydłuża się wraz z jej wzrostem, co może świadczyć o zahamowaniu procesów eliminacji ksenobiotyku z ustroju. Otrzymane wyniki świadczą, że TRI przyspieszył proces eliminacji APAP. Mechanizm takiego działania TRI może być związany z indukcją enzymów sprzęgających lub z przyspieszeniem biotransformacji APAP. Istotny wpływ na wartość Cl_s ma pozycja ciała. U osób leżących wzrasta przepływ krwi przez nerki oraz wątrobę, co istotnie wpływa na klirens leku. Gawrońska-Szklarz wykazała około 40%

wzrost klirensu paracetamolu u pacjentów leżących w porównaniu do osób chodzących (Gawrońska-Szklarz, 2008).

Czynnikiem istotnie wpływającym na biotransformację ksenobiotyków są również płeć i wiek. Wykazano istotny wpływ hormonów płciowych na aktywność enzymów mikrosomalnych wątroby odpowiedzialnych za biotransformację związków chemicznych pochodzenia egzogenne (Issa i wsp., 2007). Paracetamol jest eliminowany z ustroju w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym lub siarkowym. Wpływ hormonów płciowych na eliminację APAP oceniano w badaniach przeprowadzonych u samic królików, którym usunięto obustronnie jajniki. Zwierzętom podawano per os jednorazowo paracetamol w dawce 50 mg/kg m.c. przed zabiegiem oraz po jednym i dwóch miesiącach od usunięcia jajników. Przeprowadzone obliczenia farmakokinetyczne wykazały wzrost klirensu leku o około 22 i 32%, odpowiednio po 1 i 2 miesiącach od owariektomii. Uzyskane wyniki wskazują na hamowanie przez estrogeny wątrobowego układu sprzężania z glukuronidami i siarczanami (Dai i wsp., 2006; Elfarrar i wsp., 1998). Wyniki te jednak nie zostały potwierdzone u kobiet, którym usunięto obustronnie jajniki, a przeprowadzona u tych kobiet krótkoterminowa kuracja hormonalna nie wpływała znacząco na parametry farmakokinetyczne paracetamolu (Izumi i wsp., 1996). Odmienne, badania przeprowadzone u kobiet w różnych fazach cyklu miesięcznego wykazały, że w fazie lutealnej, w porównaniu z fazą folikularną, uzyskiwane są znacznie wyższe wartości AUC oraz C_{max} (Kroger i wsp., 1996). Anderson wykazał, że objętość dystrybucji paracetamolu zmniejsza się wraz z wiekiem, co wiąże się z utratą wody w organizmie – u noworodków objętość ta jest o 174% większa niż u starszych dzieci. Podobnie wiek wpływa na klirens – po urodzeniu jest on o 62% większy niż u młodzieży i starszych ludzi (Anderson i wsp., 2000).

Lee przebadął wpływ alkaloidu rutakarpiny wyizolowanego z owoców *Evodia Rutaecarpia* – inhibitora COX-2, na farmakokinetykę paracetamolu u samców szczurów. Po podaniu APAP (25 mg/kg m.c. i.v.) łącznie z rutakarpiną (80 mg/kg m.c.), pole powierzchni pod krzywą (AUC) APAP w osoczu było istotnie mniejsze w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP, co może świadczyć o antagonistycznym działaniu obu związków (Lee i wsp., 2007).

W przeprowadzonych badaniach własnych również stwierdzono istotne zmniejszenie wartości AUC po podaniu APAP łącznie z TRI lub NAC a także TRI i NAC, co wskazuje na antagonistyczne działanie badanych ksenobiotyków.

6.2. Kinetyka wydalania paracetamolu i jego metabolitu z moczem

Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. globalna ilość wydalonego niezmienionego leku i glukuronidu wyniosła odpowiednio 7,6% i 42,3%. Najintensywniejsze wydalanie stwierdzono w moczu zebrany w ciągu pierwszych 2 godzin od intoksykacji. W grupie zwierząt, które otrzymały APAP łącznie z TRI stwierdzono wzrost wydalania niezmienionego leku o 8,3% oraz zmniejszenie wydalania glukuronidu o 19,1%. Odmiennie, po podaniu APAP łącznie z NAC wydalanie niezmienionego paracetamolu i jego metabolitu było zmniejszone, odpowiednio o 11,7% i 13,6%. Maksymalne stężenia leku i jego glukuronidu stwierdzono w pierwszym przedziale pomiarowym pomiędzy 0 do 2 h. Nie stwierdzono jednak, w porównaniu do grupy otrzymującej sam lek, istotnych zmian w wydalaniu globalnej ilości wolnego paracetamolu i jego glukuronidu - (6,7% i 35,6%). Podobną zależność odnotowano w grupie, której podano NAC po 2 godzinach. Po równoczesnym podaniu trzech ksenobiotyków stwierdzono wydłużenie czasu, w którym wydalane były maksymalne ilości wolnego paracetamolu i glukuronidu do 2-4 h od podania leku. W porównaniu do grupy zwierząt, które otrzymywały sam APAP, globalna ilość wydalanego niezmienionego leku nie ulegała istotnym zmianom (wzrost o 2,4%), natomiast stwierdzono istotny wzrost (o 24,1%) wydalania leku w postaci glukuronidu. Po podaniu APAP z TRI, a następnie po 2 h NAC, stwierdzono istotne ograniczenie wydalania niezmienionego paracetamolu i jego glukuronidu, które w porównaniu do grupy zwierząt otrzymującej sam APAP było obniżone, odpowiednio o ok. 80% dla leku i jego glukuronidu (tabela 18).

U szczurów otrzymujących APAP w dawce 500 mg/kg m.c. globalne ilości leku i glukuronidu wydalonego w ciągu 72 godz. stanowiły odpowiednio 9,8% i 48% podanej dawki. W postaci niezmienionej APAP był eliminowany w największych ilościach w ciągu pierwszych czterech godzin od podania, natomiast wydalanie glukuronidu utrzymywało się na podobnym poziomie do 12 godziny od zatrucia. Po tym okresie stwierdzono spowolnienie wydalania. Po podaniu APAP łącznie z TRI, nie stwierdzono, w porównaniu do grupy otrzymującej sam lek, istotnych różnic w wydalaniu paracetamolu w postaci niezmienionej. Natomiast wydalanie glukuronidu było zwiększone o ok. 22% i stanowiło 59% podanej dawki. Stwierdzono również wydłużenie czasu, w którym były wydalane największe ilości paracetamolu i glukuronidu - do 8-12 h. Podanie leku łącznie z NAC zmniejszyło wydalanie niezmienionego paracetamolu (6,1%) i glukuronidu (24,5%), odpowiednio 38,8% i 49,2% podanej dawki. Globalna ilość wydalonego leku i glukuronidu z moczem po podaniu APAP łącznie z TRI i NAC wyniosła odpowiednio 9,1% i 45,7% podanej dawki i była niższa niż w grupie zwierząt otrzymujących sam APAP, odpowiednio o 7,5% i 5,1%. Podobnie, jak w grupie otrzymującej APAP w dawce 250 mg/kg

m.c., również po podaniu APAP w dawce 500 mg/kg m.c. łącznie z TRI oraz NAC po 2 h stwierdzono znaczne zmniejszenie ilości wydalanego paracetamolu i jego glukuronidu. Globalna ilość wydalonego niezmiennego leku i jego glukuronidu wyniosła odpowiednio 4,25 i 17,51 % i była zmniejszona o 45,3 i 56,7% (tabela 18).

Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. nie stwierdzono istotnych różnic w stałej szybkości eliminacji wolnego paracetamolu. Natomiast dla glukuronidu różnice te były istotne statystycznie – wzrost wartości stałej szybkości eliminacji k (tabele 16 i 17).

Po podaniu APAP w dawce 500 mg/kg m.c. łącznie z TRI i/lub NAC stwierdzono różnice istotne statystycznie w wartościach stałej szybkości eliminacji wolnego paracetamolu i glukuronidu w porównaniu do grupy zwierząt, którym podawano sam APAP – wzrost dla grupy APAP-TRI (wolny paracetamol) i spadek dla pozostałych grup (tabele 16 i 17). Jedynie dla glukuronidu nie stwierdzono zmian w grupach poddanych działaniu wszystkich trzech ksenobiotyków.

Zwiększenie dawki APAP korelowało ze skróceniem okresu biologicznego półtrwania wolnego paracetamolu i glukuronidu, który wynosił odpowiednio: dla dawki: 250 mg/kg m.c. 5,7 h i 6,3 h; i dla 500 mg/kg m.c. 4,5 h i 5,2 h (tabele 16 i 17).

Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg łącznie z TRI stwierdzono istotne wydłużenie biologicznego okresu półtrwania wolnego leku z 5,7 h do 6,1 h i glukuronidu z 6,3 h do 7,1 h. Nie stwierdzono wpływu NAC oraz NAC łącznie z TRI na $t_{0,5}$ ocenianych związków.

Biologiczny okres półtrwania paracetamolu i glukuronidu po podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. oraz TRI, ulegał wydłużeniu z 4,5 h do 7,6 h i z 5,2 do 6,5 h. Analogicznie, jak w poprzedniej grupie (250 mg paracetamolu), nie stwierdzono wpływu NAC podanej po 2 h oraz NAC łącznie z TRI na $t_{0,5}$ ocenianych związków (tabele 16 i 17).

Glukuronid paracetamolu, w porównaniu z wydalaniem niezmiennego paracetamolu, niezależnie od podanej dawki leku, wydalany jest przez nerki w stężeniach 5.krotnie wyższych. Hidvegi przeprowadził badania na świnkach morskich w celu oznaczenia metabolitów paracetamolu w moczu. Po podaniu dawki 100 mg/kg m.c. wykazał dominujące stężenia glukuronidu (90%) oraz niskie stężenia siarczanu (7%) i niewielką ilość wolnego paracetamolu w dobowej zbiorce moczu. Nie wykrył natomiast połączeń z glutationem i cysteiną (Hidvegi i wsp., 1986). Ghanem wykazał, że kierunek eliminacji połączenia APAP z kwasem glukuronowym zależy od częstotliwości oraz wielkości przyjętej dawki APAP. Po podaniu nietoksycznej dawki APAP (0,2 g/kg m.c. i.p.) a następnie dawki toksycznej (1 g/kg m.c.) stwierdzili, że taka kolejność wprowadzenia leku do ustroju powoduje przesunięcie eliminacji glukuronidu z żółci do moczu z jednoczesnym zmniejszeniem jego stężenia w wątrobie i wzrostem w surowicy (Ghanem i wsp., 2009).

Siebers, badając biotransformację paracetamolu u ludzi wykazał, że siarczany stanowią 39% wydalonego z moczem leku, natomiast glukuronid - 28%, połączenia z cysteiną - 12%, merkapturany -12% i wolny paracetamol ok. 9% (Siegers i wsp., 1984). Forrest stwierdził, że z moczem wydalana się w postaci metabolitów oraz wolnego leku od 85 do 95 % przyjętej dawki (Forrest i wsp., 1993). Natomiast Critchley nie stwierdził różnicy w sprzęganiu z kwasem siarkowym u różnych ras i płci ludzi, natomiast różnice pojawiały się w sprzęganiu z kwasem glikuronowym, np: u Azjatów 54% w porównaniu do Afrykańczyków 58% (różnica istotna statystycznie) (Critchley i wsp., 1983). Mutlib przebadał wpływ różnych izoenzymów UDP-glukuronylotransferazy (UGT), m.in. UGT 2B15, UGT 1A1, UGT 1A6 i UGT 1A9 na kinetykę glukuronidyzacji i hepatotoksyczność paracetamolu. Wykazano różnice w aktywności tych izoenzymów w zależności od stężenia APAP. Przy niższych stężeniach kluczową rolę odgrywały UGT 1A9 i UGT 2B15, a przy wyższych stężeniach APAP dominującymi były izoenzymy 1A9 i 1A1. Wykazano też różnice w przebiegu kinetyki poszczególnych izoenzymów – UGT 1A1 przedstawiał kinetykę Hill'a, a UGT 1A9 kinetykę Michaelis-Menten. Potwierdzono także, że zahamowanie działania UGT, i w związku z tym glukuronidyzacji, prowadzi do zwiększenia toksyczności APAP (Mutlib i wsp., 2006; Hanczko i wsp., 2009).

W badaniach własnych równocześnie podawane ksenobiotyki - TRI i NAC, zależnie od podanej dawki APAP - zmieniały profil metaboliczny oraz biologiczny okres półtrwania leku w ustroju. Stwierdzony brak zmian po łącznym podaniu APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. z TRI i NAC, może sugerować działanie antagonistyczne odtrutki i rozpuszczalnika. Yim badał wpływ innego rozpuszczalnika organicznego – tetrachlorku węgla, na biotransformację i eliminację paracetamolu u samców myszy. Po 24 h od podania tetrachlorku węgla podawano paracetamol w dawce 350 mg/kg m.c. Tetrachlorek węgla zmniejszał w surowicy stężenie połączeń paracetamolu z cysteiną i kwasami merkapturowymi, natomiast zwiększał stężenia połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym. W moczu zbieranym przez 24 h stężenia połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym, były większe odpowiednio o 84% i 33% w odniesieniu do wartości kontrolnych, a połączenia z cysteiną i kwasami merkapturowymi stanowiły tylko 1/3 tych wartości. Wyniki te wskazują, że tetrachlorek węgla zmniejsza utlenianie paracetamolu w wątrobie (reakcje I – fazy), a zwiększa biotransformacje w kierunku powstawania połączeń z kwasem glukuronowym i siarkowym, czego wynikiem jest zwiększone wydalanie tych związków z moczem (reakcje II – fazy) (Yim i wsp., 2006).

6.3. Wyniki badań enzymatycznych

W praktyce klinicznej do oceny stanu funkcjonalnego wątroby stosuje się rutynowo szereg badań biochemicznych, w tym oznaczanie aktywności tzw. enzymów wskaźnikowych jak: aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza sorbitolowa i dehydrogenaza cytrynianowa. W badaniach własnych oznaczenia aktywności wyżej wymienionych enzymów wykonano w osoczu krwi pobranej od zwierząt po upływie 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 minut i 4, 12, 24, 48 oraz 120 godzin od podania ksenobiotyków. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 19-26.

6.3.1. Aminotransferaza alaninowa AIAT

Po podaniu paracetamolu w dawkach 250 mg/kg m.c. i 500 mg/kg m.c. nie stwierdzono zmian w aktywnościach AIAT w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobnie nie stwierdzono zmian w aktywnościach tej aminotransferazy u zwierząt otrzymujących APAP w dawce 250 mg/kg m.c. łącznie z TRI (tabele 21, 22).

We wszystkich pozostałych grupach doświadczalnych, poddanych łącznemu działaniu dwu lub trzech ksenobiotyków stwierdzono, utrzymujący się przez 24 godziny od narażenia, przejściowy 1,5-2 – krotny wzrost aktywności AIAT. Aktywności tej aminotransferazy po 48 h powracały do poziomów występujących w grupie kontrolnej.

Zwiększenie dawki paracetamolu do 500 mg/kg m.c. przy równoczesnym narażeniu na TRI spowodowało istotny przejściowy wzrost aktywności AIAT pomiędzy 30 minutą a 24 godziną doświadczenia, z maksimum w 12 godzinie od intoksykacji (73,0 U/dm³).

Aktywność AIAT również istotnie wzrastała po podaniu paracetamolu (w dawkach 250 i 500 mg/kg m.c.) łącznie z N-acetylocysteiną, niezależnie od czasu jej podania, tj. 0 i 2 godzinie. W ciągu pierwszych 24 godzin we wszystkich czterech grupach aktywność AIAT była od ok. 1,5 do 2 razy większa niż w grupie kontrolnej i narażonej na sam APAP. Najwyższą aktywność AIAT w grupie APAP 250 i NAC(0) stwierdzono po 24 godzinach (73,0 U/dm³), w grupie APAP 250 i NAC(2) oraz APAP 500 i NAC(0) po 12 godzinach (odpowiednio 68,0 i 64,5 U/dm³), a w grupie APAP 500 i NAC(2) po 4 godzinach (69,0 U/dm³).

W grupach zwierząt otrzymujących APAP (w dawkach 250 i 500 mg/kg m.c.) łącznie z TRI i NAC(0) oraz NAC (2) aktywności AIAT były podwyższone w ciągu pierwszych 24 godzin doświadczenia, podobnie jak w pozostałych grupach. W grupie zwierząt, którym podano niższą dawkę APAP równocześnie z TRI i NAC, najwyższą aktywność stwierdzono po 12 godzinach od intoksykacji, odpowiednio 78,0 U/dm³, natomiast w grupie, której podano NAC po 2h, aktywność AIAT była nieznacznie niższa (69,5 U/dm³), lecz nadal ok. 2-krotnie wyższa niż w

grupie kontrolnej. W analogicznych grupach, w których podawano APAP w dawce 500 mg/kg, aktywności AlAT były podwyższone w podobnym stopniu i w 24 godzinie dla NAC (0) oraz NAC (2h) wyniosły odpowiednio 69,0 U/dm³ oraz 74,5 U/dm³.

6.3.2. Aminotransferaza asparaginianowa AspAT

Paracetamol w dawce 250 mg/kg m.c. nie wpływał istotnie na aktywność AspAT. Aktywność tego enzymu, między 24 a 48 godziną od podania, była nieznacznie wyższa niż w grupie kontrolnej (tab. 23). Po podaniu APAP w wyższej dawce (500 mg/kg m.c.) stwierdzono natomiast istotny wzrost aktywności AspAT między 12 a 48 godziną od intoksykacji. Najwyższą aktywność 161,5 U/dm³ stwierdzono w 24 godzinie; aktywność tego enzymu po 48 h - do poziomów kontrolnych (tabela 24).

Istotny przejściowy wzrost aktywności AspAT stwierdzono również w grupie poddanej działaniu trichloroetyleny. Po łącznym narażeniu na APAP w dawce 250 mg/kg m.c. i TRI, aktywność AspAT była podwyższona o ok. 2-krotnie i 1,7-krotnie, odpowiednio po 12 i 24 godzinach do narażenia (160,5 U/dm³). Po podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. łącznie z TRI stwierdzono sukcesywny istotny wzrost aktywności AspAT od 1 do 24 godziny doświadczenia z maksimum aktywności w 12 godzinie (208,0 U/dm³) a następnie po 48 h jej powrót do wartości kontrolnych.

Aktywność aminotransferazy alaninowej również istotnie wzrastała, po łącznym podaniu leku w dawce 250 mg/kg m.c. z NAC oraz wszystkich trzech ocenianych ksenobiotyków. Wzrost aktywności od ok. 32% do ok. 100%, stwierdzony już w pierwszej godzinie od intoksykacji utrzymywał się do 24 godziny doświadczenia. Jedynie w grupie, której podano NAC (0) łącznie z APAP (250 mg/kg m.c.), zmiany utrzymywały się krócej tj. do 12 godziny. Zmiany w aktywności tego enzymu były bardziej nasilone po podaniu wyższej dawki paracetamolu (500 mg/kg m.c.) a oznaczone aktywności były o ok. 2 do 2,2 -krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Aktywność AspAT powracała do poziomów kontrolnych po 48 godzinach od intoksykacji.

Po podaniu APAP 250 łącznie z NAC, aktywność AspAT wzrastała od pierwszej godziny od podania osiągając najwyższą wartość po 12 godzinach (158,5 U/dm³). Podobnie wzrost aktywności tego enzymu stwierdzono po podaniu NAC po 2 godzinach od podania leku; aktywność AspAT była podwyższona do 24 godziny (159,0 U/dm³). Po zwiększeniu dawki APAP do 500 mg kg m.c. i podaniu NAC, łącznie lub po 2 godzinach, również stwierdzono istotny wzrost aktywności AspAT utrzymujący się do 24 godziny doświadczenia (maksimum w 12 godzinie wynoszące 205,5 U/dm³ w grupie z NAC podaną jednocześnie i w 4 godzinie, a 202,5 U/dm³ w grupie, gdzie NAC podano po 2 godzinach).

Podobnie, istotny wzrost aktywności AspAT stwierdzono u zwierząt, którym podano łącznie APAP z TRI i NAC. Aktywność AspAT wzrastała istotnie, niezależnie od dawki paracetamolu oraz czasu wprowadzenia NAC: jednak szybciej niż to stwierdzono po podaniu leku wyłącznie z TRI. We wszystkich czterech grupach podwyższona aktywność utrzymywała się do 24 godzin od intoksykacji, z maksimum w 12 godzinie dla dawki paracetamolu 250 mg/kg m.c. (161,0 U/dm³ w grupie NAC(0) i 162,0 U/dm³ w grupie NAC(2)) i w 4 godzinie dla dawki paracetamolu 500 mg/kg m.c., odpowiednio 239,0 i 229,0 U/dm³ dla grup NAC(0) i NAC(2) (tabele 23, 24).

6.3.3. Dehydrogenaza mleczanowa LDH

Paracetamol w dawkach 250 i 500 mg/kg m.c. powodował istotny, przejściowy wzrost aktywności LDH w surowicy pomiędzy 4 a 24 godziną, z maksimum w 12 godzinie (odpowiednio, 1048,5 i 1392,0 U/dm³) (tabele 25, 26).

Narażenie łączne na APAP (250 mg/kg m.c.) i TRI powodowało istotny wzrost aktywności tego enzymu od 12 godziny do 24 godziny (937,5 U/dm³ w 12 godzinie). Zmiany te były jednak mniejsze od stwierdzonych w grupie zwierząt, którym podano jedynie paracetamol. Po zwiększeniu dawki leku do 500 mg/kg m.c. zmiany w aktywności LDH pojawiały się wcześniej, tj. już w 4 godzinie i utrzymywały się do 24 godziny, podobnie jak w przypadku niższej dawki paracetamolu i były mniej nasilone niż po podaniu samego paracetamolu.

Aktywność LDH była najwyższa po podaniu APAP łącznie z NAC. Dla dawki paracetamolu 250 mg/kg m.c. wzrost aktywności tego enzymu stwierdzono po 30 minutach. Podwyższona aktywność utrzymywała się do 12 godziny, osiągając maksymalną wartość po 1 godzinie (2092,0 U/dm³). Podanie NAC po dwóch godzinach wpłynęło na wydłużenie tego okresu do 24 godzin (maksimum w 4 godzinie 1293,0 U/dm³). Wzrost aktywności miał charakter przejściowy i po 48 godzinie aktywność LDH była podobna jak w grupie kontrolnej (700,0 U/dm³). Po zwiększeniu dawki APAP do 500 mg/kg m.c. charakter zmian był zbliżony do grupy otrzymującej niższą dawkę leku (maksimum aktywności w 4 godzinie dla APAP + NAC (0 h) - 1727,0 U/dm³ oraz 2616,5 U/dm³ dla APAP + NAC (2 h).

Podobnie, jak w poprzednich grupach, stwierdzono przejściowy wzrost aktywności LDH u szczurów poddanych działaniu wszystkich trzech ksenobiotyków. Aktywność LDH była istotnie wyższa niż po podaniu samego leku, natomiast niższa w porównaniu z analogicznymi grupami otrzymującymi APAP w skojarzeniu z NAC.

W grupach zwierząt poddanych łącznemu działaniu trzech ksenobiotyków aktywność LDH istotnie wzrastała od pierwszych minut do 24 godziny od intoksykacji, uzyskując maksymalne wartości w 4 godzinie dla APAP 250 i 12 godzinie dla APAP 500 i była niższa u

zwierząt, którym NAC podano z dwugodzinnym opóźnieniem, wynosząc odpowiednio dla APAP 250, TRI oraz NAC (0 h) i NAC (2h) 1478,0 U/dm³ i 1075,0 U/dm³, a dla APAP 500 - 1829,0 U/dm³ i 1517,5 U/dm³.

6.3.4. Dehydrogenaza sorbitolowa SDH i dehydrogenaza izocytrynianowa ICD

Oznaczenia obu dehydrogenaz zostały wykonane tylko w grupach narażonych na najwyższą dawkę leku tj. 500 mg/kg m.c. (tabele 27 i 28). Jednorazowe podanie paracetamolu w dawce 500 mg/kg m.c. spowodowało wzrost aktywności SDH do 11 U/dm³ już w 4 godzinie od podania. Podwyższone aktywności o ok. 34 % utrzymywały się przez 24 godziny. Również aktywność ICD po podaniu APAP w tej dawce była podwyższona o ok. 58 %, a istotne zmiany w aktywności tej dehydrogenazy utrzymywały się od 12 do 48 godzin.

Podobnie, po podaniu APAP łącznie z TRI, stwierdzono wzrost aktywności SDH i ICD, odpowiednio o ok. 39%, między 4 a 12 godziną i o 47% między 12 a 48 godziną.

Po równoczesnym podaniu APAP i NAC nie stwierdzono zmian w aktywności SDH. Aktywność tego enzymu utrzymywała się na poziomie wartości kontrolnych i była niższa niż w grupie narażonej na sam APAP. Odmiennie, stwierdzono wzrost aktywności ICD pomiędzy 1 i 12 godziną od podania ksenobiotyków. Zmiany te były o ok. 63% wyższe w stosunku do grupy kontrolnej oraz o ok. 32% - w porównaniu do grupy otrzymującej sam APAP. Podanie NAC po 2 godzinach od podania APAP wywołało krótkotrwały wzrost aktywności ICD, o ok. 83% w porównaniu do grupy kontrolnej i o około 25% w porównaniu do grupy otrzymującej wyłącznie paracetamol, w przedziale czasowym 4 – 12 godzin. Czas podania N-acetylocysteiny istotnie wpłynął na aktywność ICD. U szczurów otrzymujących równocześnie APAP i NAC stwierdzono istotny wzrost aktywności ICD już w 1 godzinie od podania, niemniej niższy o 20% niż w grupie zwierząt, którym podano APAP i NAC po 2 godzinach.

W grupie szczurów otrzymującej łącznie APAP, TRI i NAC aktywność ICD w ciągu pierwszych 12 godzin była o około 64% wyższa niż w grupie kontrolnej i o około 32% niż w grupie zwierząt otrzymującej sam APAP. Nie stwierdzono istotnych zmian w aktywności SDH w porównaniu do grupy kontrolnej oraz do grupy otrzymującej sam APAP.

W grupie zwierząt, którym podano NAC po 2 godzinach, jedynie pomiędzy 4 a 12 godziną od intoksykacji stwierdzono, wzrost aktywności ICD o 46,3%, w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano zmian w aktywności tego enzymu w porównaniu do grupy szczurów, które otrzymały wyłącznie paracetamol.

AspAT jest zarówno enzymem cytozolowym, jak i mitochondrialnym. Hepatocyty zawierają dużą ilość tych organelli. Istotny wzrost aktywności AspAT może więc świadczyć o wybiórczym uszkodzeniu przez APAP blaszki wewnętrznej mitochondriów.

Znaczący wzrost aktywności aminotransferaz u szczurów po podaniu paracetamolu obserwowano w badaniach przeprowadzonych przez Gilani. U zwierząt otrzymujących lek jednorazowo w dawce 640 mg/kg m.c. *per os* stwierdzono 22-krotny wzrost aktywności AlAT oraz 14-krotny AspAT (Gilani i wsp., 1998). Knight oceniał skuteczność podawania witaminy E jako czynnika hepatoprotekcyjnego u myszy po przedawkowaniu paracetamolu. Po podaniu APAP w dawce 300 mg/kg m.c. obserwował 2-krotny wzrost aktywności AlAT w 6 godzinie doświadczenia (Knight i wsp., 2003). W badaniach własnych aktywność tych enzymów również 2-krotnie przewyższała wartości kontrolne, przy zastosowaniu podobnych dawek paracetamolu. Natomiast Watkins, w badaniach klinicznych, prowadzonych na zdrowych ochotnikach, którym podawano codziennie przez okres 14 dni po 4 g APAP w dawkach podzielonych, stwierdził o ok. 3-krotny wzrost aktywności AlAT w porównaniu do grupy kontrolnej (Watkins i wsp., 2006). Odmienne, Temple, który podawał zdrowym ochotnikom APAP w dawce 4 g oraz wyższych tj. 6 lub 8 g przez 3 dni, nie stwierdził istotnych zmian w aktywności AlAT i AspAT (Temple i wsp., 2007). Prawdopodobnie brak zmian w aktywnościach obu dehydrogenaz był spowodowany zbyt krótkim okresem narażenia, niewystarczającym do wyczerpania się rezerw endogennego glutationu i ujawnienia się hepatotoksycznego wpływu powstającej podczas biotransformacji NAPQI, co potwierdzają badania Jamesa, który wykazał, że stężenie NAPQI oznaczone w surowicy metodą HPLC koreluje ze wzrostem aktywności aminotransferaz i maleje po zastosowaniu N-acetylocysteiny (James i wsp., 2009).

LDH jest enzymem cytozolowym, występującym w dużych ilościach w komórkach wątroby. Zwiększenie aktywności tego enzymu w surowicy może świadczyć o uszkodzeniu błony komórkowej hepatocytów, zarówno po pojedynczym podaniu APAP lub TRI jak i łącznym podaniu obu ksenobiotyków.

W badaniach *in vitro* na izolowanych mysich hepatocytach wykazano toksyczne działanie APAP, zależne od czasu i stężenia. Inkubacja komórek w medium zawierającym od 0,005mM do 5mM APAP powodowała ubytek tego enzymu z hepatocytów na skutek ich uszkodzenia. Pierwsze zmiany aktywności enzymu obserwowano już po 2 godz. od dodania leku do medium. Najsilniejszy 80% spadek aktywności LDH w hepatocytach obserwowano po 5 godzinnej inkubacji z lekiem w stężeniu 5mM (Back i Orme, 1990).

Pomimo, że dehydrogenaza izocytrynianowa i dehydrogenaza sorbitolowa uważane są za specyficzne wskaźniki uszkodzenia błony hepatocytów, uzyskane wyniki są trudne do jednoznacznej interpretacji. Podwyższone aktywności ICD wskazują nie tylko na uszkodzenie

błony komórkowej, ale także mitochondriów. Krótki okres trwania zmian w aktywnościach enzymu może wynikać z krótkiego jego okresu półtrwania, a więc szybkiej eliminacji z krwi. Podobnie, jak w przypadku ICD, krótki czas półtrwania SDH w surowicy powodował szybkie jego zanikanie i powrót do wartości kontrolnych. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest informacji na temat zmian aktywności tych enzymów wskutek polekowego uszkodzenia wątroby, bądź też w wyniku narażenia na rozpuszczalniki organiczne.

Obserwowane zmiany w aktywnościach enzymów po podaniu paracetamolu w dawce toksycznej, jak również po narażeniu łącznym z trichloroetylenem potwierdzają możliwość uszkodzenia hepatocytów. Zastosowanie N-acetylocysteiny w różnym czasie pozwoliło na stwierdzenie zależności między czasem jej podania a wystąpieniem istotnych zmian w aktywności oznaczanych enzymów. Należy podkreślić, że im późniejszy jest czas podania NAC, tym większa jest możliwość uszkodzenia wątroby, co zgadza się z doniesieniami literaturowymi (Dollery i wsp., 1999; Izumi i wsp., 1996).

6.4. Wyniki oznaczeń układu monoooksygenaz zależnych od cytochromu P-450

Szczury zabijano zawsze o tej samej porze dnia (między godziną 8.30 a 9.30), aby uniknąć wahań dobowych w aktywności układu monoooksygenaz zależnych od cytochromu P450. Wątrobową frakcję mikrosomalną izolowano met. Dallnera. Uzyskane czyste frakcje mikrosomalne, po odpowiednim przygotowaniu (rozdz. 4.4.1.2), zamrażano w temperaturze -20°C do czasu oznaczenia. Przed oznaczeniem po delikatnym rozmrożeniu próbek, wykonywano oznaczenia biochemiczne. W badaniach własnych oznaczenia aktywności układu monoooksygenaz wykonano po upływie 1.5, 4, 12, 24, 48 i 120 godzin od podania ksenobiotyków. Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 27-34.

6.4.1. Cytochrom P-450

Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. nie stwierdzono istotnego wpływu leku na poziom cytochromu P-450, niemniej od 48 godziny zanotowano wzrost powyżej wartości kontrolnych. Nie stwierdzono również wpływu TRI i NAC na zawartość tego cytochromu (tabela 27).

Podanie leku w dawce 500 mg/kg m.c. spowodowało indukcję cytochromu P-450 pomiędzy 4 a 48 godziną doświadczenia, z maksimum w 24 godzinie (235% wartości kontrolnej). Indukcję cyt.P-450 stwierdzono również w grupie zwierząt poddanej łącznemu działaniu APAP, TRI i NAC (2h) (132% wartości kontrolnej) (tabela 28, rycina 23). Oznaczanie poziomu P-450, którego dalszy metabolizm prowadzi do dysfunkcji mitochondriów i apoptozy

ma znaczenie w badaniach klinicznych. Tarantino stwierdził, że można określić współczynnik ryzyka na indukowane lekiem uszkodzenie wątroby, uwzględniając takie czynniki jak: choroby wątroby, wiek i genetyczny polimorfizm cyt. 450 (Tarantino i wsp., 2009). Podatność pacjentów można przewidzieć jeszcze przed podaniem leku, badając fenotyp i genotyp oraz oceniając stan zdrowia pacjenta. Czynniki ryzyka choroby wątroby u dzieci po ostrym zatruciu APAP, były badane w pracy (Mahadevan i wsp., 2006).

6.4.2. Reduktaza NADPH – cyt. P 450

Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. stwierdzono istotny wzrost aktywności reduktazy NADPH-cyt.P450, między 4 a 24 godziną eksperymentu, z maksimum w 12 godzinie, w której aktywność osiągnęła 139 % wartości kontrolnej. Równoczesne podanie APAP i TRI oraz APAP, TRI i NAC (0 h) nie wpłynęło na zmiany aktywności reduktazy NADPH-cyt.P450. Natomiast w grupie otrzymującej APAP i NAC po 2 godzinach od podania leku obserwowano w 12 godzinie hamowanie aktywności reduktazy NADPH-cyt.P450 do 83% wartości kontrolnej. Podanie NAC 2 godziny od intoksykacji APAP łącznie z TRI, spowodowało wzrost aktywności NADPH-cyt.P450 w 12 godzinie do 126 % wartości kontrolnej, a następnie od 24 godziny jej spadek. W 48 godzinie aktywność tej reduktazy wynosiła 83 % wartości kontrolnej (tabela 31).

Nie stwierdzono istotnego wpływu badanych ksenobiotyków na aktywność reduktazy NADPH-cyt.P450 po pojedynczym lub łącznym podaniu APAP w dawce 500 mg/kg m.c., przy czym aktywność tej reduktazy w przebiegu całego eksperymentu była wyższa niż wartość kontrolna (tabela 32).

6.4.3. Cytochrom b₅

Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg m.c. stwierdzono istotne obniżenie poziomu cytochromu b₅ między 4 a 48 godziną eksperymentu, aż do 58 % wartości kontrolnej w 48 godzinie. Po włączeniu do układu TRI również stwierdzono obniżenie poziomu cytochromu b₅, który osiągał 79 % w 48 godzinie eksperymentu. Po podaniu APAP z NAC (łącznie i po dwóch godzinach) obserwowany poziom cytochromu b₅ był zbliżony do wartości grupy kontrolnej. Jednoczesne narażenie na wszystkie trzy ksenobiotyki wpłynęło na obniżenie poziomu cytochromu b₅ dopiero od 48 godziny doświadczenia (61 % wartości kontrolnej). Odmienne, po podaniu NAC po 2 h od narażenia łącznego na APAP z TRI poziom cytochromu b₅ był obniżony już w pierwszych godzinach doświadczenia i osiągał 63 % wartości kontrolnej w 48 godzinie.

Po podaniu APAP w dawce 500 mg/kg m.c. stwierdzono obniżenie poziomu cytochromu b₅ poniżej wartości kontrolnych w całym przedziale trwania doświadczenia z minimum między 24 a 48 godziną (67%). Podanie łączne APAP z TRI również wpłynęło negatywnie na poziom

cytochromu b₅ z minimum przypadającym, podobnie jak w poprzedniej grupie, między 24 a 48 h (53 % wartości kontrolnej). Łączne podanie APAP i NAC, a także APAP, TRI i NAC (w obu przedziałach czasowych) nie miało żadnego wpływu na poziom cytochromu b₅ (tabela 29,30).

6.4.4. Reduktaza NADH – cyt. b₅

Podanie APAP w dawce 250 mg/kg m.c. spowodowało spadek aktywności reduktazy NADH-cyt b₅ już od 4 godziny doświadczenia, aż do 70 % wartości kontrolnej w 12 godzinie obserwacji. Dopiero od 48 godziny aktywność tej reduktazy ulegała lekkiej stymulacji. Jeżeli zwierzęta narażono łącznie na APAP i TRI, to stwierdzono znacznie mniejsze obniżenie aktywności reduktazy NADH-cyt b₅ niż po podaniu samego leku (75% w 48 godzinie). Równoczesne podanie APAP i NAC obniżyło aktywność reduktazy NADH-cyt b₅ jedynie w 48 godzinie doświadczenia (81% wartości kontrolnej). Podanie NAC po 2 godzinach od podania leku skróciła do 12 godziny czas, w którym aktywność reduktazy NADH-cyt b₅ obniżyła się istotnie poniżej wartości kontrolnej (75 %). Równoczesne podanie wszystkich trzech ksenobiotyków miało najbardziej negatywny wpływ na aktywność reduktazy NADH-cyt b₅ we wszystkich przebadanych grupach. Po jednoczesnym podaniu APAP, TRI i NAC, aktywność reduktazy NADH-cyt.b₅ była obniżona między 24 a 120 godziną eksperymentu (60 % wartości kontrolnej). Podanie NAC po 2 godzinach nie wpłynęło znacząco na aktywność reduktazy NADH-cyt b₅ w porównaniu do poprzedniej grupy (61 %) (tabela 33).

Po podaniu APAP w dawce 500 mg/kg, aktywność reduktazy NADH-cyt b₅ była istotnie obniżona między 12 a 48 godziną doświadczenia (70 % wartości kontrolnej). Największy spadek aktywności reduktazy NADH-cyt b₅ stwierdzono jednak po podaniu łącznym APAP z TRI między 12 a 120 godziną z minimum w 48 godzinie (45%). W grupach otrzymujących APAP łącznie z NAC razem i po 2 godzinach od intoksykacji obserwowano w pierwszych godzinach doświadczenia istotny wzrost aktywności reduktazy NADH-cyt b₅ – 108 % wartości kontrolnej dla grupy APAP+NAC(0) i 117 % dla grupy APAP+NAC(2). W ostatnich dwóch grupach, otrzymujących łącznie wszystkie trzy ksenobiotyki, jedynie przy jednoczesnym ich podaniu stwierdzono wzrost aktywności reduktazy NADH-cyt b₅ w pierwszych 4 godzinach doświadczenia (112% wartości kontrolnej). Opóźnione podanie NAC nie wpływało na aktywność reduktazy NADH-cyt b₅ (tabela 34).

6.5 Wyniki oznaczania izoenzymów cytochromu P-450

Wyniki wybranych izoform cyt.P450, zaangażowanych w przemiany paracetamolu i trichloroetyleny przedstawiono w tabelach 35 i 36.

APAP w dawce 250 mg/kg m.c. stymulująco wpływał na poziom cytochromu CYP 2E1. Od około 167 % wartości grupy kontrolnej uzyskanej w 4 godzinie od zakończenia eksperymentu, jego poziom wzrastał osiągając maksimum po upływie 1 doby (242 %). Po pięciu dniach obserwacji poziom tego cytochromu był nadal wyższy niż w grupie kontrolnej. Podobny charakter zmian obserwowano w przypadku izoformy CYP 2B1/2, jednak stymulacja tego białka była słabsza (maksimum po 1 dniu – 172 % wartości kontrolnej). Natomiast obniżeniu ulegała izoforma CYP 1A2. W całym okresie badań poziom tej izoformy był niższy niż w grupie kontrolnej. Szczególnie silny spadek ujawniono w 24 godzinie obserwacji (65 %).

Łączne podanie APAP i TRI nieco słabiej stymulowało CYP 2E1, w porównaniu do podania samego leku. Podwyższony już po 4 godzinach poziom do 164 % wartości kontrolnych ulegał nieznacznemu podwyższeniu osiągając między 24 a 48 godziną (maksimum 172%). Po 120 godzinach poziom tej izoformy nadal przewyższał wartości kontrolnej (134%). Isoforma CYP 2B1/2 tuż po zakończeniu eksperymentu przekraczała poziom kontrolny (137%), a następnie wraz z upływem czasu jaki minął od intoksykacji ulegała szybkiemu wzrostowi osiągając po 48 godzinach 253 % wartości kontrolnej. Po pięciu dniach jej poziom obniżył się do 145 %. Nie stwierdzono istotnego wpływu APAP i TRI na poziom CYP 1A2 a oznaczone poziomy oscylowały w przedziale wartości kontrolnych.

Podanie łączne APAP i NAC silnie stymulowało CYP 2E1, którego podwyższony poziom utrzymywał się przez 48 godzin (maksimum 225 % w 48 godzinie), a następnie ulegał obniżeniu by w 5 dniu od intoksykacji powrócić do wartości kontrolnych zakończenia eksperymentu. Jeszcze efektywniej była stymulowana izoforma CYP 2B1/2 (276 % w 48 godzinie). Poziom tej izoformy, podobnie jak CYP 2E1, po pięciu powracał do poziomu kontrolnego. Nie stwierdzono istotnego wpływu APAP i NAC na CYP 1A2 w całym zakresie obserwacji. NAC podana dwie godziny później niż APAP, również prowadziła do stymulacji poziomów CYP 2E1 i CYP2B1/2, jednak efekt ten był znacznie słabszy niż to obserwowano w grupie otrzymującej oba ksenobiotyki równocześnie. Maksymalne poziomy obu izoform stwierdzono po 48 godzinach od intoksykacji i wynosiły one, odpowiednio 187 % i 164 %. Przez cały okres od intoksykacji, poziomy izoformy CYP 1A2 były obniżone, niemniej różnice statystycznie znamienne stwierdzono jedynie w 12 godzinie (66 % wartości kontrolnej).

Równoczesne narażenie na trzy ksenobiotyki indukowało CYP 2E1 oraz 2B1/2, nie wpływając istotnie na poziom izoformy 1A2. Wpływ tych ksenobiotyków na badane izoformy

był znacząco mniejszy od stwierdzanego po 12 godzinach w grupach poddanych działaniu dwóch z ocenianych związków (APAP +TRI lub APAP+NAC). Poziom izoformy CYP 2E1 wzrastał od 119 %, po 4 godz., do 193 % po upływie 24 godzin. Po tym czasie zauważono delikatną tendencję do spadku stężenia tej izoformy, niemniej podwyższone wartości utrzymywały się do 120 godz. Poziom izoformy CYP 2B1/2 również był podwyższony przez cały czas obserwacji, jednak wykazywał tendencję do naprzemiennych wzrostów i spadków; stale utrzymując się powyżej wartości kontrolnych. Po pięciu dniach poziom tego białka był niemal identyczny, jak po 24 godzinach (około 190 %). W ostatniej serii badań, w której NAC była podawana 2 godziny po APAP i TRI, również obserwowano stymulację izoformy CYP 2E1. Po początkowym wzroście poziomu tej izoformy, po czterech godzinach od zakończenia eksperymentu, stwierdzono jego spadek do wartości kontrolnych, a następnie ponowny gwałtowny wzrost - do 202 % w 48 godzinie. Poziom CYP 2B1/2 narastał monotonicznie, osiągając po 24 godzinach 258 % wartości kontrolnej, a po pięciu dniach obniżył się do 135 %. Poziom CYP 1A2, po gwałtownym przejściowym wzroście w 4 godzinie od zakończenia eksperymentu (172 %), ulegał obniżeniu do wartości grupy kontrolnej (w 12h) a następnie dalszemu zmniejszeniu do 63% tej wartości po 120 h (tabela 35).

Jednorazowe podanie APAP w dawce 500 mg/kg nie wpłynęło znacząco na poziom izoform CYP 2E1 i 1A2. Natomiast izoforma CYP 2B1/2 ulegała istotnej stymulacji w całym zakresie obserwacji osiągając w 48 godzinie poziom 237 % wartości kontrolnej. Łączne narażenie na APAP i TRI, analogicznie jak w poprzedniej grupie, nie wpłynęło istotnie na izoformy CYP 2E1 i 1A2, natomiast poziom izoformy CYP 2B1/2 był istotnie podwyższony od 238 % po 4 h do 133 % po upływie 2 dni (tabela 36), co pozostaje w dobrej zgodności z wynikami literaturowymi. (Chen i wsp., 2008; Guengerich i wsp., 2009).

Dai badał różnice w toksyczności APAP u samic i samców myszy. Po podaniu dawki 500 mg/kg m.c. i oznaczeniu aktywności enzymów AlAT, AspAT i LDH, a także przeprowadzeniu analizy histologicznej, wykazano większą odporność samic niż samców na toksyczne działanie APAP. Ponadto u samic także biotransformacja APAP była wolniejsza niż u samców – wynikiem tego był niższy poziom glukuronidyzacji i sulfuracji oraz wyższe stężenie wolnego leku w wątrobie. Potwierdzeniem tego był niższy poziom mRNA dla CYP 1A2 i CYP 3A11. Nie stwierdzono natomiast różnic w wiązaniu NAPQI z białkami po 2 h od podania APAP (Dai i wsp., 2006). Natomiast Tan wykazał różnice w mechanizmie przemian APAP do NAPQI zachodzących w mikrosomach myszy (MLM) i ludzi (HLM). Po podaniu leflunomidu (LEF; lek immunosupresyjny) łącznie z APAP, przemiana APAP do NAPQI była hamowana przez LEF tylko w MLM a nie w HLM. Badania te potwierdzają różnice gatunkowe dla enzymu CYP 1A2 (Tan i wsp., 2008).

6.6. Wyniki oznaczeń glutationu całkowitego w wątrobie

Narażenie na APAP w dawce 250 mg/kg m.c. doprowadziło do spadku glutationu całkowitego (53 % wartości kontrolnych) w pierwszych 12 godzinach doświadczenia. Od 24 godziny obserwacji ujawniła się tendencja do wzrostu stężenia tego tripeptydu do wartości kontrolnych. Łączne podanie APAP w dawce 250 mg/kg m.c. i TRI nie miało większego wpływu na poziom glutationu, niemniej przez cały okres obserwacji istniała tendencja do nieznacznego obniżenia jego poziomu. Podanie APAP jednocześnie z NAC obniżyło stężenie glutationu jedynie w pierwszych 4 godzinach trwania eksperymentu (74%). Opóźnione podanie NAC nie wpłynęło znacząco na stężenie glutationu, które było zbliżone do wartości kontrolnych. Podobnie, jednoczesne narażenie na wszystkie trzy ksenobiotyki nie wpłynęło znacząco na stężenie tripeptydu, które jednak było nieznacznie niższe niż w grupie kontrolnej. Odmienne, podanie NAC dwie godziny po narażeniu na APAP łącznie z TRI doprowadziło do widocznego spadku stężenia glutationu w całym okresie doświadczenia (67 % wartości kontrolnych w 48 godzinie obserwacji) (tabela 37).

Podanie APAP w dawce 500 mg/kg m.c., podobnie jak w grupie otrzymującej lek w niższej dawce spowodowało spadek stężenia glutationu w ciągu pierwszych 12 godzin obserwacji (61 % w 4 godzinie doświadczenia). Od 24 godziny nastąpił wzrost stężenia glutationu aż do 113 % wartości kontrolnej w 48 godzinie obserwacji.

Natomiast łączne podanie APAP z TRI doprowadziło do jeszcze większego spadku stężenia glutationu, odmiennie niż w przypadku grupy otrzymującej lek w niższej dawce. Od 12 do 48 godziny doświadczenia poziom glutationu osiągnął zaledwie 48 % wartości kontrolnej. Po pięciu dniach stężenie tego tripeptydu osiągnęło wartości wyjściowe.

Łączne podanie APAP i NAC również prowadziło do spadku stężenia glutationu, jednak mniejszego niż w poprzedniej grupie. Najniższe stężenia zanotowano w 12 godzinie doświadczenia (68 % wartości kontrolnej). Po podaniu NAC 2 godziny po narażeniu na lek, efekt był przeciwny. Stwierdzono nieznacznie podwyższony poziom glutationu, w całym zakresie doświadczenia, w porównaniu do wartości kontrolnej. Koresponduje to z wynikami badań Yanga przeprowadzonymi na samcach myszy, stwierdzających, że NAC jest najbardziej skuteczny przy podaniu w pierwszych godzinach po przedawkowaniu APAP. Podawany później, może powodować wzrost poziomu endogennego glutationu, a długotrwałe podawanie tego antidotum utrudnia regenerację wątroby przy ostrej niewydolności tego organu po przedawkowaniu APAP (Yang i wsp., 2009; Yim i wsp., 2006).

Narażenie na równoczesne łączne podanie wszystkich trzech ksenobiotyków prowadziło do silnego spadku stężenia glutationu w całym zakresie obserwacji (65 %). Podobnie, podanie NAC z 2 godzinnym opóźnieniem pogłębiło ten deficyt, niemniej w większym stopniu niż to obserwowano po równoczesnym podaniu NAC; największy spadek (55 % wartości kontrolnej) w 24 godzinie doświadczenia – (tabela 38). Z przeglądu literatury wynika, że NAC rutynowo stosowany przy przedawkowaniu APAP (Heard, 2008; Fontana, 2008), może być również antidotum i czynnikiem biomonitorującym przy zatruciu metylkiem rtęci (występuje w owocach morza), co wykazały badania na szczurach, przeprowadzone przez Aremu (Aremu i wsp., 2008). Ponieważ podanie NAC może wywoływać pewne skutki uboczne (Schmidt i Dalhoff, 2001; Beckett i wsp., 1985), trwają badania skuteczności innych substancji o podobnym działaniu jak NAC (Terneus i wsp., 2008; Wallace, 2004).

Podsumowanie

Paracetamol przyjmowany w dawkach terapeutycznych uważany jest za lek bezpieczny. W wyższych dawkach powoduje jednak martwicę w części środkowej zrazików wątrobowych, która może być przyczyną zgonu. Hepatotoksyczne działanie paracetamolu związane jest z serią występujących po sobie kolejno zdarzeń, w tym:

1. Biotransformacją paracetamolu zachodzącą przy udziale CYP 450 prowadzącą do powstania reaktywnego metabolitu wyczerpującego rezerwy endogennego glutationu i wiążącego się kowalencyjnie z białkami;
2. Wyczerpaniem rezerw endogennego glutationu nasilającym stres oksydacyjny wskutek obniżenia detoksykacji tworzonych reaktywnych form tlenu i azotu w hepatocytach i w efekcie inicjujących powstawanie zmian martwiczych/nekrotycznych;
3. Wzrostem stresu oksydacyjnego, prawdopodobnie związanym z zaburzeniami homeostazy wapnia, przekaźnictwa sygnałów (signal transduction permeability) oraz wzrostem przepuszczalności mitochondrialnej (mitochondria permeability transition);
4. Zwiększoną przepuszczalnością mitochondrialną, której towarzyszy nasilenie stresu oksydacyjnego, utrata potencjału błony mitochondrialnej i utrata zdolności do syntezy ATP;
5. Brakiem ATP skutkującym powstawaniem zmian martwiczych (Hinson i wsp.2010).

Zdarzeniom tym towarzyszy obecność szeregu modulatorów odpowiedzi zapalnej, które mogą modyfikować ciężkość uszkodzeń wątroby. Do chwili obecnej nie udało się jednak wyjaśnić, jaki jest udział mediatorów zapalenia w toksyczności paracetamolu i ich wpływie na stres oksydacyjny i przekaźnictwo sygnałów.

Prescott, analizując kliniczne i biochemiczne zmiany u pacjentów po przedawkowaniu paracetamolu zwraca szczególną uwagę na dramatyczny wzrost aktywności aminotransferaz: asparaginianowej i alaninowej, umiarkowaną hiperbilirubinemię oraz wzrost czasu protrombinowego. Zmianom tym towarzyszyło wydłużenie czasu $T_{1/2}$ eliminacji (Prescott, 2000).

Analizując wyniki badań własnych dotyczących wpływu trichloroetyleny i N-acetylocysteiny na parametry farmakokinetyczne paracetamolu wykazano, zależne od dawki paracetamolu, wydłużenie czasu biologicznego półtrwania leku ($t_{0,5} = 3,696$ h dla 250 mg/kg m.c. i $t_{0,5} = 4,858$ h dla 500 mg/kg m.c.) Odmienne, maksymalne stężenie leku było osiągnięte szybciej po podaniu wyższej dawki paracetamolu ($t_{max} = 0,158$ dla 500 mg/kg m.c. i $t_{max} = 2,862$ h dla 250 mg/kg m.c.). Również dostępność leku, mierzona na podstawie AUC, wzrastała nieproporcjonalnie do dawki i wynosiła 269,0 i 1023,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3\text{h}$. Ujemną korelację stwierdzono również pomiędzy badaną dawką APAP a wyznaczaną wartością klirensu leku. Ilość wydalonego leku w postaci niezmienionej i w postaci glukuronidu zwiększała się wraz ze wzrostem podanej dawki paracetamolu i wynosiła odpowiednio dla dawki 250 mg/kg m.c. 7,57% i 18,32% oraz 9,83% i 20,85% po podaniu 500 mg/kg m.c.

Specyfiką obecnie występujących zatruc ostrych często jest narażenie skojarzone (łączne), w tym z rozpuszczalnikami organicznymi. W badaniach własnych wykorzystano, jako substancję modelową, trichloroetylen - ksenobiotyk, w którego biotransformację zaangażowane są, zbieżne z biotransformacją paracetamolu, izoenzymy cytochromu P450. Wspólna droga biotransformacji tych związków stwarza możliwość wzajemnej modyfikacji metabolizmu a tym samym ich toksycznego działania, zwłaszcza, że obydwa związki w sprzyjających okolicznościach działają hepatotoksycznie.

W badaniach własnych wykazano, że trichloroetylen istotnie wpływa na parametry farmakokinetyczne paracetamolu, zmniejszając nie tylko maksymalne stężenie leku, ale również wydłużając czas, po którym jest ono osiągnięte. Obserwowane działanie było zależne od podanej dawki paracetamolu i było silniej zaznaczone po podaniu niższej z badanych, dla której maksymalne stężenie było ok. 2-krotnie niższe i osiągnięte po czasie ok. 2,5-krotnie dłuższym. Zmniejszeniu ulegała również dostępność biologiczna leku, mierzona na podstawie wartości AUC tj. o ok. 20% dla dawki 250 mg/kg m.c. i 30% dla dawki 500 mg/kg m.c. Uzyskane wyniki wskazują, że równoczesne narażenie na paracetamol i trichloroetylen może w konsekwencji ograniczać skuteczność terapeutyczną/toksyczną leku. N-acetylocysteina, standardowo stosowana w zatruciach paracetamolem, podana szczerom w zatruciu eksperymentalnym, zmniejsza biodostępność leku oraz osiągnięte maksymalne stężenie, przy równoczesnym wydłużeniu czasu, po którym jest ono osiągnięte. Efekty działania NAC, były niezależnie od czasu jej podania (równocześnie i po 2h) u zwierząt otrzymujących APAP w dawce 250 mg/kg m.c. Po podaniu

APAP w wyższej dawce lepsze efekty uzyskano po równoczesnym łącznym podaniu APAP i NAC (0h). N-acetylocysteina podana w łącznym zatruciu APAP i TRI nie wpływała istotnie na osiągnięte przez lek maksymalne stężenie, w porównaniu do grupy nie poddanej działaniu tej odtrutki (APAP i TRI). Zależnie od czasu podania NAC, w porównaniu do grupy APAP i TRI, w czasie 0h stwierdzono o ok. 6-krotne skrócenie czasu t_{max} oraz o ok. 70% wzrost C_{max} . Ponadto stwierdzono wzrost $t_{0,5}$.

Zweryfikowano pierwszą ze szczegółowych hipotez badawczych i potwierdzono, że pomiędzy badanymi ksenobiotykami zachodzą interakcje kinetyczne prowadzące do zmian w wielkościach parametrów farmakokinetycznych paracetamolu. NAC nie wpływa istotnie na poprawę parametrów farmakokinetycznych leku po narażeniu łącznym z TRI.

Po podaniu paracetamolu, lek ten wydalany jest z moczem między innymi w postaci wolnego paracetamolu i glukuronidu paracetamolu. W badaniach własnych wykazano, że w przebadanym zakresie dawek (250 i 500 mg/kg m.c.) lek ten wydalany jest w ilości poniżej 10% w postaci niezmienionej, odpowiednio 7,57% dla dawki 250 mg/kg m.c. i 9,83% dla dawki 500 mg/kg oraz w postaci glukuronidu paracetamolu w ok. 20%, odpowiednio 18,32% i 20,85%. Równoczesne narażenie na APAP i TRI nie wpływało istotnie na ilość wydalonego leku w postaci niezmienionej, natomiast zmniejszyło, do ok. 15% podanej dawki, wydalanie glukuronidu paracetamolu po dawce 250 mg/kg m.c. oraz zwiększyło to wydalanie do 25,5% po dawce 500 mg/kg m.c. N-acetylocysteina, podana równocześnie z paracetamolem zmniejszyła ilość wydalanego paracetamolu w postaci niezmienionej do ok. 6% podanej dawki, nie stwierdzono różnic pomiędzy dawką 250 i 500 mg/kg, natomiast ilość wydalonego leku w postaci glukuronidu była obniżona o ok. 50% po dawce 500 mg/kg m.c. w porównaniu do grupy, w której podano sam APAP. Po podaniu APAP w dawce 250 mg/kg a następnie NAC po 2h, nie stwierdzono wpływu czasu podania odtrutki na procentową ilość wydalonej dawki leku w postaci glukuronidu po dawce. Wydalanie glukuronidu w tej grupie (NAC po 2h) po podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. było podobne jak w grupie otrzymującej sam lek. Odmiennie, po podaniu NAC po 2h w grupie zwierząt narażonych na APAP łącznie z TRI stwierdzono istotne zmniejszenie o ok. 2-krotne wydalania leku w postaci niezmienionej i o ok. 3 – krotne w postaci glukuronidu. Zarówno paracetamol jak i trichloroetylen wydalone są z ustroju w postaci glukuronidów, których dostępność w ustroju jest ograniczona. Działanie ochronne i odtruwające NAC w zatruciach ksenobiotykami polega między innymi na redukcji metabolitów do związku wyjściowego oraz na dostarczaniu wiązań sulfhydrylowych i obniżaniu w ten sposób poziomu szkodliwych metabolitów w osoczu. Sugeruje się również, że związki zawierające w swojej budowie grupy sulfhydrylowe mogą bezpośrednio inaktywować reaktywne metabolity (Mazer i Perrone, 2008). Prawdopodobnie, w przypadku podania N-acetylocysteiny w zatruciu łącznym

APAP i TRI, związek ten przesunął przemiany paracetamolu w kierunku sprzęgania z siarczanami, co skutkowało obniżeniem wydalania paracetamolu w postaci glukuronidu. Potwierdzono drugą z założonych hipotez szczegółowych, że trichloroetylen i NAC zmieniają profil metaboliczny paracetamolu. NAC podana w zatruciu łącznym na APAP i TRI nie wpływa istotnie na procent dawki leku wydalany w postaci niezmienionej natomiast zmniejsza istotnie wydalanie glukuronidu paracetamolu, zależnie od czasu podania odtrutki, zwłaszcza po 2h.

Głównym metabolitem paracetamolu odpowiedzialnym za jego hepatotoksyczne działanie jest NAPQI. Działanie hepatotoksyczne paracetamolu było opisywane nie tylko u ludzi, ale również u gryzoni. Wykazano, że szczury są mniej wrażliwe niż myszy na działanie hepatotoksyczne paracetamolu (Betten i wsp., 2007; Cattermole, 2007). W związku z powyższym w badaniach własnych, celem indukcji zmian hepatotoksycznych u szczurów, zastosowano wysokie dawki leku (250 i 500 mg/kg m.c.). W prowadzonych uprzednio w Katedrze Toksykologii Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytetu Medycznego) w Poznaniu badaniach dotyczących wpływu N-acetylocysteiny na strukturę histologiczną wątroby szczurów po pojedynczym i łącznym narażeniu per os na paracetamol (250 i 500 mg/kg m.c.) i trichloroetylen (250 mg/kg m.c.) po pojedynczym jednorazowym podaniu paracetamolu i trichloroetylenu wykazano subtelne zmiany w strukturze wątroby, które ulegały znacznemu nasileniu po łącznym podaniu obu ksenobiotyków. W wątrobach, zwłaszcza po 24 godzinach, stwierdzono poszerzenie naczyń włosowatych, głównie przebiegających przez III strefę zrazików. Jądra hepatocytów zlokalizowanych w strefie I i III wykazywały wzmożoną piknozę. Natomiast w cytoplazmie komórek miąższowych wykazano narastającą wakuolizację cytoplazmy oraz zanik ziarnistości zasadochłonnych. W strefach III zrazików stwierdzono obecność silnie kwasochłonnych i gęstych optycznie komórek odseparowanych od mniej zmienionych hepatocytów. Podanie NAC ograniczało wakuolizację cytoplazmy hepatocytów poddanych pojedynczemu działaniu APAP lub TRI. Ponadto, zmniejszało w III strefach, liczbę komórek zmienionych apoptycznie. Po podaniu NAC, opisane powyżej zmiany, występujące po łącznym narażeniu na APAP i TRI, były jednak bardziej zaawansowane (dane niepublikowane). TRI nasila hepatotoksyczne działanie APAP a NAC podana zwierzętom narażonym na łączne działanie obu ksenobiotyków nie działa hepatoprotekcyjnie.

Obserwowane zmiany morfologiczne w wątrobie korelowały z podwyższonymi aktywnościami osoczowych enzymów wskaźnikowych, w tym AlAT, AspAT, SDH, ICDH, LDH. Znamiennym jest fakt podwyższonej aktywności markerów uszkodzenia wątroby po podaniu N-acetylocysteiny, pojedynczo lub łącznie z trichloroetylenem (dane niepublikowane). Obserwowane wzrosty aktywności enzymów indyktorowych miały jednak charakter zmian przejściowych i powracały, z małymi wyjątkami, do normy po 48 godzinach od intoksykacji, co

może wskazywać na szybką regenerację komórek wątrobowych i ponowne podjęcie przez nie funkcji fizjologicznych.

Również w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy, jedynie po podaniu paracetamolu w wyższej dawce (500 mg/kg m.c.) stwierdzono przejściowy wzrost aktywności oznaczanych markerów uszkodzenia wątroby, w tym aminotransferazy asparaginianowej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej i dehydrogenazy izocytrynianowej. Nie stwierdzono natomiast zmian w aktywnościach dehydrogenazy alaninowej. Obserwowane zmiany miały charakter przejściowy a podwyższone aktywności ocenianych markerów utrzymywały się zazwyczaj do 48 godzin. Po 120 godzinach aktywności wszystkich ocenianych enzymów powracały do poziomów wartości kontrolnych. Po podaniu niższej dawki paracetamolu (250 mg/kg m.c.) nie stwierdzono istotnych różnic, w porównaniu do kontroli, w aktywnościach AspAT i AlAT. W grupie tej stwierdzono przejściowo podwyższoną aktywność LDH. W przeprowadzonych poprzednio badaniach własnych (dane niepublikowane) po jednorazowym podaniu TRI nie stwierdzono, w porównaniu do kontroli, istotnych zmian w aktywnościach AspAT i AlAT, natomiast podobnie jak po podaniu paracetamolu, stwierdzono podwyższoną przejściowo aktywność LDH, z maksimum po 12 h. Aktywność LDH była jednak o ok. 30% niższa niż w grupach poddanych działaniu leku. Po łącznym podaniu APAP łącznie z TRI, zależnie od dawki leku stwierdzono wzrost aktywności badanych enzymów. Po podaniu z niższą dawką leku, zmiany pojawiały się po 4 godzinach i utrzymywały do 24 godzin. Zmiany te były bardziej nasilone po podaniu APAP, w wyższej z ocenianych dawek. Aktywność aminotransferaz wzrastała sukcesywnie od początku narażenia, by osiągnąć po 12 godzinach wartości maksymalne od ok. 1,5 – 2 krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Po 48 godzinach wartości te powracały do poziomów kontrolnych. Również po łącznym podaniu NAC, stwierdzono wzrost aktywności AlAT, AspAT oraz ICD. Aktywności tych enzymów były istotnie wyższe niż po podaniu z APAP 250 mg/kg m.c. Po podaniu NAC z APAP 500 mg/kg m.c. podwyższone aktywności, zależnie od ocenianego markera, utrzymywały się zazwyczaj do 24 godzin od intoksykacji. Podobny charakter zmian stwierdzono po podaniu NAC łącznie z APAP i TRI. Nie potwierdzono hepatoprotekcyjnego działania NAC w przypadku zatrucia łącnego, a aktywności ocenianych markerów częstokroć były znacznie wyższe niż po łącznym podaniu APAP i TRI (AspAT, LDH). Niemniej, we wszystkich grupach, wzrost aktywności był przejściowy i po 48 godzinach aktywności enzymów powracały do poziomów kontrolnych.

Jak wspomniano wyżej, za hepatotoksyczne działanie paracetamolu odpowiedzialny jest aktywny metabolit NAPQI, powstający przy udziale cytochromu P450, głównie izoenzymów CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 i w mniejszych ilościach CYP2D6. W badaniach własnych poddano ocenie składniki mikrosomalnego układu wątrobowego cytochromu P-450, w tym

stężenie cytochromu P450, cytochromu b₅ oraz aktywność reduktaz współpracujących z tymi cytochromami.

Nie stwierdzono istotnego wpływu niższej dawki APAP na stężenie cyt.P450 we wszystkich ocenianych grupach badawczych. APAP w dawce 500 mg/kg indukował cyt. P450, przy czym działanie indukcyjne utrzymywało się do 12 h od zatrucia. APAP, w obu dawkach, był natomiast inhibitorem cyt. b₅. Po 120 godzinach stężenie cyt. b₅ powracało do poziomu wartości kontrolnych. Aktywność reduktazy NADPH-cyt. P450 nie ulegała istotnym zmianom we wszystkich grupach doświadczalnych narażonych na wyższą dawkę APAP. Nieznaczne obniżenie aktywności tej reduktazy stwierdzono jedynie po łącznym podaniu APAP 250 mg/kg m.c. z NAC (0, 2h) oraz z TRI i NAC (2h). Zmiany te w pierwszych dwóch grupach utrzymywały się od 4 do 24 godziny od intoksykacji, natomiast w grupie trzeciej pojawiły się po 48 h. Odmienne, nieznaczne wzrosty aktywności odnotowano u zwierząt narażonych pojedynczo na APAP oraz APAP i TRI oraz NAC. Zmiany te utrzymywały się do 12 h eksperymentu, z wyjątkiem grupy poddanej działaniu samego APAP, gdzie wyższe aktywności tej reduktazy utrzymywały się do 120 godz. Aktywność reduktazy NAPH-cyt.b₅, ulegała obniżeniu po podaniu APAP w obu dawkach. Obniżone aktywności utrzymywały się do 48 h eksperymentu. Podobnie obniżone aktywności, utrzymujące się od 12 do 120 godziny badań, stwierdzono w grupach zwierząt narażonych na łączne działanie APAP i TRI. Odmienne, w grupach narażonych na TRI i NAC oraz na trzy oceniane ksenobiotyki, aktywność tej reduktazy była obniżona jedynie w grupach poddanych działaniu niższej dawki APAP. W grupach poddanych działaniu APAP łącznie z TRI i NAC obniżone aktywności tej reduktazy utrzymywały się do zakończenia eksperymentu tj. 120 h.

N-acetylocysteina podana zwierzętom narażonym na łączne działanie APAP 500 i TRI zmniejszała inhibitorowe działanie tych ksenobiotyków w stosunku do cyt. P450 i cyt.b₅. Nie stwierdzono istotnego wpływu na aktywność reduktazy NADPH-cyt.P450, natomiast od 12 h doświadczenia o ok. 2-krotnie podwyższała aktywność reduktazy współpracującej z cyt.b₅.

Poza składnikami układu cytochromu P450 w badaniach własnych oceniono stężenia izoenzymów biorących udział w biotransformacji APAP i TRI, w tym CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4. Po podaniu APAP 250, po 24 godzinach od intoksykacji, stwierdzono prawie 2,4-krotny wzrost izoformy CYP2E1 oraz 1,7-krotny wzrost CYP2B1/2, przy równoczesnym obniżeniu izoformy 1A2. Odmienne, po APAP łącznie z TRI, stwierdzono ok. 1,7-krotny wzrost CYP2E1 i 2,4-krotny w wartości CYP 2B1/2. Podobnie wzrost stwierdzono po podaniu APAP łącznie z NAC (0h). Po podaniu NAC po 2 h wzrost obu izoform był mniejszy (ok. 1,7 i 1,5 – krotny). Wykazano, że zarówno APAP jak i TRI są induktorami izoform CYP2E1 i CYP 2B1/2. Ponadto działają jako inhibitory w stosunku do izoformy CYP1A2.

N-acetylocysteina, podana po 2h grupie zwierząt narażonym na łączne działanie APAP i TRI, po 24 godz. nie spowodowała istotnych różnic w stężeniach CYP2E1 i CYP2B1/2. Natomiast stwierdzono zmniejszenie o ok. 50% stężenia izoformy CYP 1A2 w grupie APAP 250 + TRI + NAC (2h). Po 48 h, w porównaniu do grupy narażonej na APAP łącznie z TRI, stwierdzono wzrost izoformy CYP2E1 i spadek CYP2B1/2 oraz CYP1A2.

W prawidłowych warunkach, NAPQI ulega detoksykacji w reakcji sprzęgania z grupami sulfhydrylowymi glutationu. W przypadkach zatruc paracetamolem, główne szlaki metaboliczne leku, a więc sprzęganie z siarczanami i glukuronianami, ulega wysyceniu i większe ilości leku podlegają przemianom zachodzącym przy udziale układu cytochromu P450 do toksycznego NAPQI. Brak dostatecznej ilości glutationu powoduje, że NAPQI nie ulega reakcjom detoksykacji i jako wolny aktywny metabolit może reagować z molekułami błon komórkowych powodując martwicę wątroby, szczególnie w centralnej części zrazików (3 strefy). W badaniach na zwierzętach wykazano, że niezbędnym warunkiem wystąpienia działania hepatotoksycznego jest obniżenie poziomów wątrobowego glutationu do wartości, co najmniej o 70% niższych niż wartości fizjologiczne (Hinson i wsp., 2010).

W badaniach własnych oznaczono w wątrobie stężenie glutationu całkowitego (tj. zredukowanego i utlenionego). Wykazano, że paracetamol, w obu dawkach krótkotrwale obniżał stężenie endogennego glutationu (do 12 h), które jednak ulegało normalizacji po 24 godzinach od intoksykacji. Największe zmiany (obniżenie stężenia) stwierdzono w grupie narażonej na APAP (500 mg/kg) łącznie z TRI. Wykazano, że podanie NAC w tym przypadku zabezpiecza wątrobę przed dalszym spadkiem stężenia glutationu u zwierząt narażonych na APAP i TRI jedynie w przypadku równoczesnego wdrożenia odtrutki (0h). Efektu takiego nie obserwowano po podaniu NAC po 2h.

Uzyskane wyniki przemawiają za brakiem skuteczności terapeutycznej jednorazowego podania NAC w mieszanym zatruciu APAP i TRI. Wskazują również na fakt pogłębiania przez NAC działania hepatotoksycznego.

Reasumując, częściowo potwierdzono główną hipotezę badawczą wykazując, że trichloroetylen istotnie wpływa na farmakokinetykę oraz nasila hepatotoksyczne działanie paracetamolu natomiast nie potwierdzono, że N-acetylocysteina, standardowo stosowana w leczeniu ostrych zatruc paracetamolem, wykazuje podobną skuteczność terapeutyczną również w przypadku zatruc mieszanych paracetamolem i trichloroetylenem.

7. Wnioski

- Trichloroetylen i N-acetylocysteina podane pojedynczo modyfikują parametry farmakokinetyczne i biotransformację paracetamolu. Pomiedzy badanymi ksenobiotykami zachodzą interakcje kinetyczne prowadzące do zmian w wartościach parametrów farmakokinetycznych paracetamolu.
- Trichloroetylen i N-acetylocysteina podane równocześnie w zatruciu, istotnie zmniejszają biodostępność APAP, szczególnie w wyższej dawce, oraz osiągane przez lek maksymalne stężenie we krwi, wydłużając czas, po którym jest ono osiągane.
- N-acetylocysteina podana w łącznym zatruciu APAP i TRI, silniej niż po podaniu w zatruciu pojedynczym APAP, zmniejsza dostępność biologiczną leku, a ponadto obniża maksymalne jego stężenie oraz wydłuża czas, po którym jest ono osiągane.
- N-acetylocysteina w zatruciu łącznym, podana po 2h istotnie zmniejsza wydalanie paracetamolu w postaci niezmienionej, ograniczając, zależnie od dawki leku, wydalanie glukuronidu paracetamolu.
- Paracetamol, w wyższej dawce (500 mg/kg m.c.) przejściowo podwyższa aktywność markerów uszkodzenia wątroby, w tym aminotransferazy asparaginianowej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej i dehydrogenazy izocytrynianowej.
- NAC podana w zatruciu APAP, silniej niż lek podwyższa aktywności markerów uszkodzenia wątroby. Podobny charakter zmian stwierdzono po podaniu NAC w zatruciu mieszanym APAP łącznie z TRI.
- APAP w dawce 250 mg/kg m.c. wykazuje słabe działanie inhibicyjne w stosunku do wątrobowego cytochromu P450 i cytochromu b₅ utrzymujące się do 48 godziny od intoksykacji, nieznacznie zwiększając aktywność reduktaz współpracujących z tymi cytochromami. Odmiennie, w wyższej dawce APAP indukuje stężenie cytochromu P450 i aktywność reduktazy współpracującej z tym cytochromem, natomiast obniża stężenie cyt. b₅ hamując równocześnie aktywność zależnej reduktazy.
- N-acetylocysteina, podana równocześnie z APAP 250, nieznacznie wpływa na stężenie cytochromu P450 i cyt.b₅ oraz aktywności współpracujących reduktaz, zarówno po narażeniu pojedynczym jak i łącznym z TRI.
- N-acetylocysteina podana równocześnie z APAP 500 istotnie obniża stężenie cyt. P450 po 48 godz. od intoksykacji.
- N-acetylocysteina podana równocześnie z APAP 500 i TRI zmniejsza inhibitorowe działanie obu ksenobiotyków w stosunku do cyt. P450 i cyt.b₅. Nie stwierdzono istotnego wpływu na aktywność reduktazy NADPH-cyt.P450, natomiast, począwszy od 12 h

doświadczenia, aktywność reduktazy współpracującej z cyt.b₅ była podwyższona o ok. 2-krotnie.

- N-acetylocysteina, podana po 2h zwierzętom narażonym na łączne działanie APAP i TRI, po 24 godz. nie spowodowała istotnych różnic w stężeniach CYP2E1 i CYP2B1/2, natomiast zmniejszała o ok. 50% stężenie izofory CYP 1A2.
- Paracetamol, w obu dawkach krótkotrwale obniża stężenie endogennego glutationu (do 12 h) w wątrobie.
- NAC, podana równocześnie z APAP 250, nie wpływa istotnie na stężenie glutationu całkowitego w wątrobie, natomiast podana z wyższą dawką APAP, obniża stężenie glutationu, które utrzymuje się przez cały okres obserwacji. Odmiennie, po podaniu NAC po 2h, stężenie glutationu pozostawało na podobnym poziomie jak w grupie kontrolnej. NAC, podana w zatruciu łącznym, odmiennie niż w zatruciu pojedynczym APAP, spowodowała przejściowe obniżenie stężenia glutationu całkowitego w wątrobie.

Podsumowując, trichloroetylen istotnie wpływa na parametry farmakokinetyczne i hepatotoksyczne działanie paracetamolu, natomiast N-acetylocysteina, standardowo stosowana w leczeniu ostrych zatruc paracetamolem, nie wykazuje podobnej skuteczności terapeutycznej po jednorazowym podaniu w przypadku zatruc mieszanych paracetamolem i trichloroetylenem.

8. Streszczenie

Farmakokinetyka, metabolizm i hepatotoksyczność paracetamolu po narażeniu pojedynczym i łącznym z trichloroetylenem i N-acetylocysteiną

Przebadano wpływ jednorazowego podania trichloroetyleny i N-acetylocysteiny na farmakokinetykę i hepatotoksyczne działanie paracetamolu (APAP 250 i 500 mg/kg m.c.) w zatruciu ostrym u szczurów. Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar o masie ciała 290 ± 10 g. Zwierzętom podawano jednorazowo, pojedynczo lub łącznie, sondą dożołądkowo paracetamol w dawce 250 lub 500 mg/kg m.c., trichloroetylen (250 mg/kg m.c.) oraz N-acetylocysteinę (150 mg/kg m.c., równocześnie lub po 2 h od wprowadzeniu ksenobiotyków).

W moczu zebranych po 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 i 72 h oznaczano stężenie wolnego paracetamolu i jego metabolitu - glukuronidu metodą HPLC. W krwi pobranej po upływie: 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 90 minut oraz 4, 12, 24, 48 i 120 h od podania ksenobiotyków oznaczano: stężenie APAP metodą TDx oraz aktywność aminotransferazy alaninowej (AlAT), aminotransferazy asparaginianowej (AspAT), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy izocytrynianowej (ICD) i dehydrogenazy sorbitolowej (SDH).

W wątrobach pobranych po 4, 12, 24, 48 i 120 h od intoksykacji oznaczono stężenia: białka, glutationu całkowitego, wątrobowego cytochromu P-450, cytochromu b₅ oraz aktywność reduktaz współpracujących z tymi cytochromami. Ponadto w wybranych grupach oznaczono izoenzymy cytochromu P-450: CYP 2E1, CYP 2B1/2 oraz CYP1A2. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

Stwierdzono, że N-acetylocysteina i trichloroetylen, podane pojedynczo modyfikują parametry farmakokinetyczne i biotransformację paracetamolu. Pomędzy badanymi ksenobiotykami zachodzą interakcje kinetyczne prowadzące do zmian w wielkościach parametrów farmakokinetycznych paracetamolu.

Trichloroetylen i N-acetylocysteina, podana równocześnie w zatruciu, istotnie zmniejszają biodostępność APAP, szczególnie w wyższej dawce, oraz osiągnięte przez lek maksymalne stężenie we krwi wydłużając czas, po którym jest ono osiągnięte.

N-acetylocysteina podana w łącznym zatruciu APAP i TRI, silniej niż po podaniu w zatruciu pojedynczym APAP, zmniejsza dostępność biologiczną leku, obniża maksymalne stężenie oraz wydłuża czas po którym jest ono osiągnięte. N-acetylocysteina w zatruciu łącznym, podana po 2h istotnie zmniejsza wydalanie paracetamolu w postaci niezmienionej, ograniczając, zależnie od dawki leku, wydalanie glukuronidu paracetamolu.

Paracetamol, w wyższej dawce (500 mg/kg m.c.) przejściowo podwyższa aktywność markerów uszkodzenia wątroby, w tym aminotransferazy asparaginianowej, dehydrogenazy mleczanowej, dehydrogenazy sorbitolowej i dehydrogenazy izocytrynianowej. NAC podana w zatruciu APAP, silniej niż lek, podwyższa aktywności markerów uszkodzenia wątroby. Podobny charakter zmian stwierdzono po podaniu NAC w zatruciu mieszanym APAP łącznie z TRI.

APAP w dawce 250 mg/kg m.c. wykazuje słabe działanie inhibicyjne w stosunku do wątrobowego cytochromu P450 i cytochromu b₅ utrzymujące się do 48 godziny od intoksykacji, nieznacznie zwiększając aktywność reduktaz współpracujących z tymi cytochromami. Odmienne, w wyższej dawce APAP indukuje stężenie cytochromu P450 i aktywność reduktazy współpracującej z tym cytochromem, natomiast obniża stężenie cyt. b₅, hamując równocześnie aktywność zależnej reduktazy. N-acetylocysteina, podana równocześnie z APAP 250, subtelnie wpływa na stężenie cytochromu P450 i cyt.b₅ oraz aktywności współpracujących reduktaz, zarówno po narażeniu pojedynczym jak i łącznym z TRI. N-acetylocysteina podana równocześnie z APAP 500 istotnie obniża stężenie cyt. P450 od 48 godz. od intoksykacji. N-acetylocysteina podana równocześnie z APAP 500 i TRI zmniejsza inhibitorowe działanie obu ksenobiotyków w stosunku do cyt. P450 i cyt.b₅. Nie stwierdzono istotnego wpływu na aktywność reduktazy NADPH-cyt.P450, natomiast od 12 h doświadczenia aktywność reduktazy współpracującej z cyt.b₅ była podwyższona o ok. 2-krotnie.

N-acetylocysteina, podana po 2h grupie zwierząt narażonym na łączne działanie APAP i TRI, po 24 godz. nie spowodowała istotnych różnic w stężeniach CYP2E1 i CYP2B1/2, natomiast zmniejszała o ok. 50% stężenie izoformy CYP 1A2.

Paracetamol, w obu dawkach krótkotrwale obniża stężenie endogennego glutationu (do 12 h) w wątrobie. NAC, podana równocześnie z APAP 250, nie wpływa istotnie na stężenie glutationu całkowitego w wątrobie, natomiast podana z wyższą dawką APAP, obniża stężenie glutationu, które utrzymuje się przez cały okres obserwacji. Odmienne, po podaniu NAC po 2h, stężenie glutationu pozostawało na podobnym poziomie jak w grupie kontrolnej. NAC, podana w zatruciu łącznym, odmiennie niż w zatruciu pojedynczym APAP, spowodowała przejściowe obniżenie stężenia glutationu całkowitego w wątrobie.

Podsumowując, trichloroetylen i N-acetylocysteina, podane pojedynczo modyfikują parametry farmakokinetyczne i biotransformację paracetamolu. N-acetylocysteina, standardowo stosowana w leczeniu ostrych zatruc paracetamolem, nie wykazuje podobnej skuteczności terapeutycznej po jednorazowym podaniu w przypadku zatruc mieszanych paracetamolem i trichloroetylenem.

Słowa kluczowe: paracetamol, trichloroetylen, N-acetylocysteina, monooksygenazy cyt.P-450, izoformy: CYP 2E1, CYP 2B1/2, CYP 1A2, farmakokinetyka paracetamolu, hepatotoksyczność, glutation.

Abstract

Pharmacokinetics, metabolism and hepatotoxicity of paracetamol after single or combined intoxication with trichloroethylene and N- acetylcysteine

The effect of a single dose administration of trichloroethylene and N-acetylcysteine, separately or in combination on the pharmacokinetics and hepatotoxic activity of paracetamol (APAP 250 and 500 mg/kg b.w.) in acute poisoning in rats has been studied. The study was performed on male Wistar rats of b.w. 290 ± 10 g. *via* a gastric tube the animals were given paracetamol in a dose of 250 or 500 mg/kg b.w., trichloroethylene (250 mg/kg b.w.) and N-acetylcysteine (150 mg/kg b.w), simultaneously or in two hours after the introduction of xenobiotics.

In the urine collected after 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 and 72 h the concentrations of free paracetamol and its metabolite glucuronide were determined by the HPLC method. In the blood collected after 5, 10, 15, 20, 30, 60 and 90 minutes as well as after 4, 12, 24, 48 and 120 h from xenobiotics administration the concentration of APAP was measured by TDx method and the activity of alanine aminotransferase (AlAT), aspartate aminotransferase (AspAT), lactate dehydrogenase (LDH), isocitrate dehydrogenase (ICD) and sorbitol dehydrogenase (SDH) were determined. In the livers collected after 4, 12, 24, 48 and 120 h from intoxication the concentrations of proteins, total glutathione and the liver cytochrome P-450, cytochrome b₅ as well as the activity of co-working reductases were determined. In selected samples the isoenzymes of cytochrome P-450: CYP 2E1, CYP 2B1/2 and CYP1A2 were measured. The results were subjected to statistical analysis.

N-acetylocysteina and trichloroethylene in single administration modify the pharmacokinetic parameters and biotransformation of paracetamol. The xenobiotics studied are engaged in kinetic interactions leading to changes in the pharmacokinetic parameters of paracetamol. Trichloroethylene and N-acetylocysteine administered together for the treatment of paracetamol poisoning significantly decreased the bioavailability of APAP, in particular in higher doses, reduced the maximum concentration of paracetamol in blood and extended the time of reaching this maximum concentration. N-acetylcysteine administered to treat a combined poisoning with APAP and TRI has similar effect but stronger than when treating poisoning only with APAP. N-acetylocysteine applied for the treatment of combined poisoning with APAP and TRI in 2 hours poisoning significantly decreases excretion of paracetamol in the unchanged form and restricts excretion of glucuroinide.

Paracetamol in a higher dose (500 mg/kg body weight) temporarily increases the activity of liver damage markers, including AspAT, LDH, SDH and ICD. NAC administered against APAP poisoning, increases the activity of the liver damage markers. A similar effect was observed after administration of NAC for the treatment of combined poisoning with APAP and TRI.

APAP in a dose of 250 mg/kg body weight shows a weak inhibitory effect on the liver cytochrome P450 and cytochrome b₅ observed up to 48 hours after intoxication and slightly increases the activity of reductases co-working with these cytochromes. In higher doses APAP causes an increase in the concentration of cytochrome P450 and in the activity of the reductase working with this cytochrome, but it causes a decrease in the concentration of cytochrome b₅ and in the activity of the relevant reductase. N-acetylcysteine, administered together with APAP 250, had a slight influence on the concentration of cytochromes P450 and b₅ and activities of relevant reductases, similar effect was observed in the treatment of combined poisoning with TRI. N-acetylcysteine administered together with APAP 500 significantly decreased the concentration of cytochrome P450 starting from 48 hours after intoxication. N-acetylcysteine administered together with APAP 500 and TRI reduced the inhibitory effect of both xenobiotics towards cytochromes P450 and b₅. No significant effect of N-acetylcysteine on the activity of NADPH reductase co-working with P450, but starting from 12 h after intoxication, the activity of the reductase co-working with cytochrome b₅ was about twice increased. N-acetylcysteine administered in two hours after combined intoxication with APAP and TRI, whose effect was observed in 24 hours after intoxication did not cause significant changes in the concentrations of CYP2E1 and CYP2B1/2, but decreased by about 50% the concentration of CYP 1A2.

Paracetamol, taken in both doses caused a short time decrease in the concentration of endogenous glutathione (up to 12 h) in the liver. NAC given together with APAP 250 had no significant effect on the concentration of total glutathione in the liver, but given with APAP 500 caused a decrease in glutathione concentration that was maintained throughout the period of observation. Administration of NAC in 2h after intoxication did not change the concentration of glutathione which remained at the same level as in the control group. NAC, administered for the treatment of combined intoxication caused temporary decrease in the concentration of total glutathione in the liver.

In conclusion, trichloroethylene and N-acetylcysteine modify the pharmacokinetic parameters, biotransformation and hepatotoxicity of paracetamol and N-acetylcysteine administered in the standard treatment of paracetamol's acute intoxication, does not show a similar therapeutic effectiveness in the treatment of combined intoxication with paracetamol and trichloroethylene.

Słowa kluczowe: paracetamol, trichloroetylene, N-acetylcysteine, monooxygenase cyt.P-450 system, isoforms: CYP 2E1, CYP 2B1/2, CYP 1A2, pharmacokinetics of paracetamol, hepatotoxicity, glutathione.

9. Piśmiennictwo

Acharya M., Lau-Cam C.: Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *JBS* 17(Suppl),535, 2010

Adamson G.M., Harman A.W.: Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. *Biochem. Pharmacol.*, 45(11), 2289 – 2294, 1993

Aguilar M.I., Hart S.J., Calder I.C.: Complete separation of urinary metabolites of paracetamol and substituted paracetamols by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, 426, 315-333, 1988

Aleksunes L. M., Campion S. N., Goedken M. J., Manautou J. E.: Acquired Resistance to Acetaminophen Hepatotoxicity is Associated with Induction of Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (Mrp4) in Proliferating Hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 104 (2), 261-273, 2008

Alloui A., Chassaing C., Schmidt J., Ardid D., Dubray C., Cloarec A., Eschalier A.: Paracetamol exerts a spinal, Tropisteron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Europ. J. Pharmacol.* 443, 71-77, 2002

Ałapin B.: Alkoholizm i toksykomanie. PZWL, W-wa, 1968

Anderson B.J., Woollard G.A., Holford N.H.G.: A model for size and age changes in the pharmacokinetics of paracetamol in neonates, infants and children. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 50, 125-134, 2000

Andrews N.P., Prasad A., Quyyumi A.A.: N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37, 117-123, 2001

Angielski S., Rogulski J.: *Biochemia kliniczna*. Perseusz, Sopot, 2000

Angielski S., Rogulski J.: *Zarys biochemii klinicznej i analityki*. PZWL, W-wa, 1982

Anundi I., Lahteenmaki T., Rundgren M., Moldeus P., Lindros K.: Zonation of acetaminophen metabolism and cytochrome P450 2E1-mediated toxicity studied in isolated periportal and perivenous hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 45(6), 1251 – 1259, 1993

Arana A., Morton N. S., Hansen T. G.: Treatment with paracetamol in infants. *Acta Anaesthesiol Scand*, 45, 20-29, 2001

Aremu D. A., Madejczyk M. S., Ballatori N.: N-Acetylcysteine as a Potential Antidote and Biomonitoring Agent of Methylmercury Exposure. *Environ. Health Perspect.*, 116, 26-30, 2008

Arstall M.A., Yang J., Stafford I.: N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effect. *Circulation*, 92, 2855-2862, 1995

Back D.J., Orme M.L.: Pharmacokinetic drug interactions with oral contraceptives. *Clin. Pharm.*, 18(6), 472 – 484, 1990

- Bai J., Cederbaum A.: Adenovirus mediated overexpression of CYP2E1 increases sensitivity of HepG2 cells to acetaminophen induced cytotoxicity. *Mol. Cell. Biochem.* 262(1-2), 165-76, 2004
- Beckett G.J., Chapman B.J., Dyson E.H., Hayes J.D.: Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut*, 26, 26-31, 1985
- Bessemers J.G.M., Te Koppele J.M., Van Dijk P.A. Van Stee L.L.P., Commander J.N.M., Vermeulen N.P.E.: Rat liver microsomal cytochrome P450-dependent oxidation of 3,5-disubstituted analogues of paracetamol. *Xenobiotica*, 26(6), 647 – 666, 1996
- Betten D., Cantrell F., Thomas S., Williams S., Clark R.: A prospective evaluation of shortened course oral N-acetylcysteine for the treatment of acute acetaminophen poisoning. *Ann. Emerg. Med.* 50(3), 272-9, 2007
- Bhatia V., Bhardwaj P., Elikkottil J., Batra J., Saraya A.: A 7-day profile of oxidative stress and antioxidant status in patients with acute liver failure. *Hepatology Int.*, 2, 465-470, 2008
- Björkman R., Hallman KM, Hedner J, Hedner T, Henning M.: Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain*, 57-259, 1994
- Błaszczak J.: Farmakokinetyka paracetamolu po podaniu pojedynczym i łącznym z trichloroetylenem. *Praca Magisterska, AM Poznań*, 1999
- Bogdanik T.: Toksykologia kliniczna. PZWL, W-wa, 1998
- Bogdanik T.: Kontrowersje dotyczące toksyczności paracetamolu. *Postępy nauk medycznych*, T XI, nr 2-3, 1998
- Bogdanik T.: Ostre zatrucia trichloroetylenem, toluenem i ksylenem – modele matematyczne toksykokinetyki i doświadczenia kliniczne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 6(4), 431-458, 1992
- Bogdanik T.: Paracetamol – Toksyczność i leczenie ostrego zatrucia. *Ostre Zatrucia – Informacja Ekspresowa*, 4(49), 1998
- Bogen K.T., Swirsky Gold L.: Trichloroethylene cancer risk: simplified calculation of PBPK-based MCLs for cytotoxic end points. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 25, 26-42, 1997
- Borowski T., Madecka – Borkowska I., Modrzewska R.: Próby czynnościowe w diagnostyce laboratoryjnej. PZWL, W-wa, 1986
- Bourdeaux C., Bewley J.: Death from paracetamol overdose despite appropriate treatment with N-acetylcysteine. *Emerg. Med. J.* 24(5), e31, 2007
- Bray G. P., Harrison P. M., O'Grady J. G., Tredger J. M., Williams R.: Long-term anticonvulsant therapy worsens the outcome in paracetamol – induced fulminant hepatic failure. *Hu. Exp. Toxicol.*, 11, 265-270, 1992
- Buckley N., Eddleston M.: Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Clin Evid (Online)*; 12, 2101, 2007.

- Buckley N., Whyte J.M., O'Connell D.L., Dawson A.H.: Oral or intravenous N-acetylcysteine: Which is the treatment of choice for acetaminophen (paracetamol) poisoning? *Clin. Toxicol.* 37(6), 759-767, 1999
- Burdan F.: Toksyczność prenatalna paracetamolu. *Polski Merkuriusz Lekarski*; T VII, nr 42, 1992
- Cai H., Guengerich F.P.: Reaction of trichloroethylene and trichloroethylene oxide with cytochrome P450 enzymes: Inactivation and sites modification. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 451-458, 2001
- Campbell N. R.C., Baylis B.: Renal impairment associated with an acute paracetamol overdose in the absence of hepatotoxicity. *Postgrad Med. J.* 68, 116-118, 1992
- Cattermole G.: Oral N-acetylcysteine for acute paracetamol poisoning. *Emerg. Med. J.* 24(12), 866, 2007
- Chandrasekharan N.V., Dai Hu, Lamar Turepu Roos K., Evansin Nathan K., Tomsik Joshua, Elton Terry S., Simmons Daniel L.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS Sci USA*, 99(21), 13926-13931, 2002
- Chen Ch., Krausz K. W., Idle J. R., Gonzalez F. J.: Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and CYP2E1-null mice. *J. Biol. Chem.* February 22, 283 (8), 4543-4559, 2008
- Chen N., Aleksa K., Woodland C., Rieder M., Koren G.: N-Acetylcysteine prevents ifosfamide-induced nephrotoxicity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 153, 1364-1372, 2008
- Chien J., Peter R., Nolan Ch., Wartell C., Slattern J., Nelson S., Carithers R., Thummel K.: Influence of polymorphic N-acetyltransferase phenotype on the inhibition and induction of acetaminophen bioactivation with long-term isoniazid. *Clin. Pharm. Therap.*, 61(1), 24 – 34, 1997
- Chodera A., Herman Z.S.: *Farmakologia kliniczna*. PZWL, W-wa, 1993
- Chomiczka M.: Centrum informacji o paracetamolu – pytania najczęściej zadawane przez pacjentów. *Lek w Polsce*, 6, 25 – 33, 1998
- Chruściel T., Gliński K.: *Leksykon leków*. PZWL, W-wa, 1992
- Conrad C. K., Bottiglieri T., Herzenberg L. A., Moss R. B., Herzenberg L. A.: High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis, Rabindra Tirouvanziam. *PNAS*, March 21, 103, 4628-4633, 2006
- Court M., Duan S., von Moltke L., Greenblatt D., Patten C., Miners J., Mackenzie P.I.: Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.*, 299(3), 998-1006, 2001
- Crawley B., Saito O., Malkmus S., Fitzimmons B., Hua X., Yaksh T. L.: Acetaminophen prevents hyperalgesia in central pain cascade. *Neurosci. Lett.*, 442 (1), 50-53, 2008

- Crichley JAJH, Nimmo G.R., Prescott L.F.& Woolhouse N.M.: Ethnic differences in paracetamol metabolism: a comparative study in Scotland and Ghana, *Brit. J. Pharm.* 80, 488p, 1983
- Dahlin D. C., Miwa G. T., Lu A. Y.H, Nelson S. D.: N-acetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1327-1331, 1984
- Dai G., He L., Chou N., Wan Y.: Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. *Toxicol Sci.* 62 (1), 33-41, 2006
- Dai Y., Cederbaum A.I.: Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450 2E1 – transfected Hep G2 cells. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 273, 1497 – 1505, 1995
- Dai Y., Cederbaum A.I.: Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450 2E1 – transfected Hep G2 cells. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 2(5), 665-688, 1960
- Dallner G.: Isolation of rough and smooth microsomes – general. *Methods Enzymol.*, 32, 191-215, 1974
- Danek A.: *Chemia fizyczna*. PZWL, W-wa, 1982
- Danek A.: *Farmakokinetyczne metody badania leków*. Wydawnictwa Akcydensowe, W-wa, 1979
- Dangel T.: Leczenie bólu u dzieci. Mity i rzeczywistość. *Terapia i Leki*, 3-4, 1998
- Davis M.: *Semin. Liver Dis.*, 1986
- Desta Z., Soukhova N. V., Flokhardt D. A.: Inhibition of Cytochrome P450 (CYP450) Isoforms by Isoniazid: Potent Inhibition of CYP2C19 and CYP3A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 382-392, 2001
- Dawson J.R., Norbeck K., Anundi I., Moldeus P.: The effectiveness of N-acetylcysteine in isolated hepatocytes against the toxicity of paracetamol, acrolein and paraquat. *Arch. Toxicol.*, 55, 1, 11-15, 28, 1984
- Defalogue R.J.: Pharmacology and toxicology of trichloroethylene. *Clin. Pharm. Therap.*, 2(5), 665 – 688, 1960
- Dekant W., Henschler D.: New pathways of trichloroethylene metabolism. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.*, 11, 399-401, 1983
- Dekant W., Metzler M., Henschler D.: Novel metabolites of trichloroethylene through dechlorination reactions in rats, mice and humans. *Biochem. Pharmacol.*, 33(13), 2021 – 2027, 1984
- Dekant W., Schulz A., Metzler M., Henschler D.: Absorption, elimination and metabolism of trichloroethylene: a quantitative comparison between rats and mice. *Xenobiotica*, 16(2), 143 – 152, 1986.

- Diaz D., Fabre I., Daujat M.: Omeprazole is an aryl hydrocarbon – like inducer of human hepatic cytochrome P-450. *Gastroenterol.*, 99, 737-747, 1990
- Dimova S., Stoytcher T.: Influence of rifampicin on the toxicity and analgesic effects of acetaminophen. *Eur. J. Drug Metab. Pharm.*, 19(4), 311 – 317, 1994
- Dmochowska – Mroczek H.: Ciężkie zaburzenia rytmu serca w przebiegu ostrego zatrucia trichloroetylenem. *Kardiol. Pol.*, 15, 343 – 346, 1972
- Dollery C., Boobins A., Rawlins M., Thomas S., Wilkins M.: *Therapeutic drugs. Vol. I*, Churchill Livingstone, 1999
- Dutkiewicz T.: *Chemia toksykologiczna*. PZWL, W-wa, 1968
- Dyderski S.: Zatrucie paracetamolem i jego leczenie. *Farm. Pol.*, 53(23), 1078 – 1082, 1997
- Elfarra A., Krause R., Last A., Lash L., Parker J.: Species and sex-related differences in metabolism of trichloroethylene to yield chloral and trichloroethanol in mouse, rat and human liver microsomes. *Pharm. Exp. Ther.*, 26(8), 779-785, 1998.
- Emeigh Hart S.G., Beierschmitt W.P., Wyand D.S., Khairallah E.A., Cohen S.D.: Acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 126, 267 – 275, 1994
- Emoto C., Yamazaki H., Yamasaki S.: Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidations in mouse intestinal microsomes. *Xenobiotica*, 30(10), 943-953, 2000
- Eriksson L. S., Broome U., Kalin M., Lindholm M.: Hepatotoxicity due to repeated intake of low dose paracetamol. *J. Int. Med.*, 231, 567-7, 199
- Estabrook R.W., Werrongloer J.: The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Meth. Enzymol.*, 52, 212-220, 1978
- Feldman S.: Bioavailability of acetaminophen suppositories. *Am. J. Hospit. Pharm.*, 32: 1173-1175, 1975
- Fernandez J.G., Droz P.O., Caperos J.R.: Trichloroethylene exposure. Simulation of uptake excretion and metabolism using a mathematical model. *Brit. J. Ind. Med.* 2, 311-314, 1977
- Filipek B.: Niesteroidowe leki przeciwzapalne. *Gazeta Farmaceutyczna*, 8(64), 1997
- Fisher J.W., Gargas M.L., Allen B.C., Andersen M.E.: Physiologically based pharmacokinetic modeling with trichloroethylene and its metabolite, trichloroacetic acid, in the rat and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 109, 183 – 195, 1991.
- Flower R., Vane J.: Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol), *Nature* 240, 410-411, 1972.
- Fontana R. J.: Acute Liver Failure including Acetaminophen Overdose. *Med Clin North Am.* July, 92 (4), 761-794, 2008.
- Forrest J.A.H., Clements J.A., Prescott L.F.: Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin. Pharmacokinet.* 7: 93-107, 1993.

Fujimura H., Kawasaki N., Tanimoto T., Sasaki H., Suzuki T.: Effects of acetaminophen on the ultrastructure of isolated rat hepatocytes. *Exp. Toxic. Pathol.*, 47, 345 - 351, 1995

Gao Q., Doneanu C., Shaffer S., Adman E., Goodlett D., Nelson S.: Identification of the interactions between cytochrome P450 2E1 and cytochrome b₅ by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 21; 281(29), 20404-20417, 2006.

Gattner I., Glinecka M.: Ostre zatrucia trichloroetylenem w materiale Ośrodka Toksykologii w Poznaniu w latach 1970 – 1979. *Studia i Materiały Monograficzne. Ostre zatrucia rozpuszczalnikami organicznymi. IMP, Łódź*, 2(10), 68 – 73, 1982

Gawrońska-Szklarz B., Adamiak-Giera U., Kłodowska-Duda G., Kałdońska M., Opala G.: Polekowe zaburzenia ruchowe a stężenie lewodopy i jej metabolitu 3-tlenometylodopy (3-OMD) u pacjentów z chorobą Parkinsona – próba optymalizacji leczenia (opis przypadku), *prob.. Ter. Monit.* 19, 23-29, 2008

Gibaldi M., Boyes R. N., Feldman S.: Influence of first-pass effect on availability of drugs on oral administration. *J. Pharm. Sci.*, 60, 1338-1340, 1971

Gilani A.H., Janbaz K.H., Shah B.H.: Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCl₄. *Pharmacolog. Res.*, 37, No 1., 31-35, 1998.

Gilbertson R.J., Harris E., Pandey S.K., Kelly P., Myers W.: Paracetamol use, availability, and knowledge of toxicity among British and American adolescents. *Arch. Dis. Childhood*, 75, 194 – 198, 1996

Glińska – Serwin M., Puka J., Szajewski J.M.: Ostre zatrucia trójchloroetylenem w materiale Warszawskiego Ośrodka Ostrych Zatruc w latach 1969 – 1977. *Pol. Tyg. Lek.*, 33, 1877 – 1880, 1978

Goldin R.D., Ratnayaka I.D., Breach C.S., Brown I.N., Wickramasinghe S.N.: Role of macrophages in acetaminophen (paracetamol) – induced hepatotoxicity. *J. Pathol.*, 179, 432 – 435, 1996

Gosselin R.E., Smith H.C., Hodge H.C.: *Clinical Toxicology of Commercial Products*. Williams and Wilkins, II-380, 1984

Green T., Dow J., Foster J., Hext P.: Formic acid excretion in rats exposed to trichloroethylene: a possible explanation for renal toxicity in long-term studies. *Toxicology*, 127, 39 – 47, 1998

Griffin J.M., Lipscomb J.C., Pumford N.M.: Covalent binding of trichloroethylene to proteins in human and rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.*, 95, 173 – 181, 1998

Groniowski J., Kruś S.: *Podstawy patomorfologii*. PZWL, W-wa, 1991

Gu J., Chen Ch., Wei Y., Fang CH., Xie F., Kannan K., Yang W., Waxman D. J., Ding X.: A Mouse Model with Liver-specific Deletion and Global Suppression of the NADPH-cytochrome P450 Reductase Gene: Characterization and Utility for in vivo Studies of Cyclophosphamide Disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (1), 9-17, 2007

Guengerich F. P., Shimada T., Yun Ch., Yamazaki H., Raney K. D., Their R., Coles B., Harris T. M.: Interactions of Ingested Food, Beverage, and Tobacco Components Involving. *Envir. Health. Persp.*, 102, 49-53, 1994.

Guzman F., Lim R.: Central and peripheral mechanism of analgesia and pain. *Arch. Biol. Medic. Exp.*, 4, 180, 1067

Gyamlani G.G., Parikh Ch. R.: Acetaminophen toxicity: suicidal vs accidental. *Crit. Care* 6, 155-159, 2002.

Hanczko R., Fernandez D. R., Doherty E., Qian Y., Vas G., Niland B., Telarico T., Garba A., Banerjee S., Middleton F. A., Barrett D., Barcza M., Banki K., Landas S. K., Perl A.: Prevention of hepatocarcinogenesis and increased susceptibility to acetaminophen-induced liver failure in transaldolase-deficient mice by N-acetylcysteine. *J. Clin. Investig.*, 119, 1546-1556, 2009

Hanna A.N., McDonald J.s., Miller C.H. Jr., Couri D.: Pretreatment with paracetamol inhibits metabolism of enflurane in rats. *Br. J. Anaesth.*, 62, 429 – 433, 1989

Hauer K., Hildebrandt W., Sehl Y., Edler L., Oster P., Droge W.: Improvement in muscular performance and decrease in tumor necrosis factor level in old age after antioxidant treatment. *J. Mol. Med.*, 81, 118-125, 2003

Hazai E., Vereczkey L., Monostory K.: Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1089-1094, 2002

Heard K. J.: Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning. *N Engl J Med.*, 359 (3), 285-292, 2008

Held K.D., Biaglow J.E.: Mechanism for the oxygen radical-mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells. *Radiat-Res.*, 139(1), 15-23, 1994

Herman T., Skibińska Ł.: Wykłady i ćwiczenia z farmakokinyki. AM Poznań, 1992

Hermann T.W.: Farmakokinyka. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002

Heyman S.N., Goldfarb M., Shina A., Karmeli F., Rosen S.: N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: studies in rats. *Kidney International*, 63, 634-641, 2003

Hidvegi S., Ecobichon D.J.: Acetaminophen in the guinea pig: metabolite identification in blood, urine and bile. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64, 72-76, 1986

Hinson J.A., Roberts D.W., James L.P.: Mechanism of Acetaminophen-Induced Liver Necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol* 196, 369-405, 2010

Hładoń B.: Farmakodynamika – Przewodnik do ćwiczeń dla studentów farmacji. AM Poznań 1997.

Hoffer E., Baum R., Tabak A., Taitelman U.: N-acetylcysteine increased the glutathione content and protects rat alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* (Shannon), 84(1), 7-12, 1996

Imaeda A. B., Watanabe A., Sohail M. A., S. Mahmood, Mohamadnejad M., Sutterwala F. S., Flavell R. A., Mehal W. Z.: Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on TIR9 and the Nalp3 inflammasome. *J. of Clin. Investig.*, 119, 305-313, 2009

Ishida K., Sakazume M., Watanabe M., Hirai N., Ikegami H., Sakai T., Doi K.: Effects of fructose-induced hypertriglyceridemia on hepatorenal toxicity of acetaminophen in rats: Role of pharmacokinetics and metabolism of acetaminophen. *Exp. Toxic. Pathol.*, 49, 207 – 215, 1997

Issa M., Nejem R., El-Abadla N., El-Naby M., Roshdy A., Kheiralla Z.: Effects of paracetamol on the pharmacokinetics of ciprofloxacin in plasma using a microbiological assay. *Clin. Drug. Investig.* 27(7), 463-7, 2007

Izumi S., Langley P.G., Wendon J., Ellis A.J., Pernambuco J.R.B., Hughes R.D., Williams R.: Coagulation factor V levels as a prognostic indicator in fulminant hepatic failure. *Hepatology*, 23(6), 1507 – 1511, 1996

Izzotti A., Bagnasco M., Camoirano A., Orlando M., De Flora S.: DNA fragmentation, DNA-protein crosslinks, postlabeled nucleotidic modifications and 8-hydroksy-2`-deoxyguanosine in the lung but not in the liver of rats receiving intratracheal instillations of chromium (IV). Chemoprevention by oral N-acetylcysteine. *Carcinogenesis*, 20, 8, 1485-1490, 1999

Jackson C. H., McDonald M. C., Cornett J. W. D.: Acetaminophen: a practical pharmacologic overview, *Can. Med. Ass. J.*, 131, 25-32, 1984.

James L.P., Mayeux P.R., Hinson J.A.: Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Disp.* 31, 1499-1506, 2003

James L., Letzig L., Simpson P., Capparelli E., Roberts D., Hinson J., Davern T., Lee W.: Pharmacokinetics of Acetaminophen Protein Adducts in Adults with Acetaminophen Overdose and Acute Liver Failure. *Univ. Of AR for Med Sciences*, 2009

Janes J. M., Roudedge P. A.: Recent developments in the management of paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Drug Safety*, 7, 170-177, 1992

Janiec W., Krupińska J.: *Farmakodynamika. PZWL, W-wa*, 1995

Jarecki M.: *Leki: Paracetamol. Magazyn Medyczny* 4, 1996

Jodynys-Liebert J., Młynarczyk W., Orłowski J., Zielińska-Psuja B., Seńczuk W.: *Ćwiczenia z toksykologii. AM Poznań*, 1995

Jollow D. J., Mitchell J. R., Potter W. Z., et al.: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II Role of covalent binding in vivo. *J. Pharmacol. Ther.*, 187, 203-210, 1973

Jolly S.R., Kane W.J., Hook B.G.: Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am. Hert. J.*, 112, 682-690, 1986

Junod A.F., Jornot L., Grichting G.: Comparative study on the selenium and N-acetylcysteine – related effects on the toxic action of hyperoxia, paraquat and the enzyme reaction hypoxanthine-xanthine oxidase in cultured endothelial cells. *Agents and Actions*, 22, 176-183, 1987

Kanter M.: Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen

poisoning. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 63(19), 1821-7, 2006

Kellmeyer T., Kesty N., Wang Y., Frias J., Fineman M.: Pharmacokinetics of an oral drug (acetaminophen) administered at various times relative to subcutaneous injection of pramlintide in subjects with type 2 diabetes. *J. Clin. Pharmacol.* 47(7), 798-805, 2007

Keshava N., Caldwell J. C.: Key Issues in the Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonism and Cell Signaling in Trichloroethylene Toxicity. *Environ. Health Perspect.*, 114, 1464-1469, 2006

Khandkar M.A., Parmar D., Katyare S.: Is activation of lysosomal enzymes responsible for paracetamol-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity? *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 437 – 440, 1996

Klotz U.: Interactions of analgesic with other drugs. *Am. J. Med.*, 75(5a), 133 – 138, 1983

Knight R., Fariss W., Farhood A., Jaeschke H.: Role of Lipid Peroxidation as a Mechanism of liver injury after Acetaminophen Overdose in Mice. *Toxicol. Sci.* 76, 22-236, 2003

Koch T., Heller S., Heissler S., Breil I., Schiefer H.G., Van Ackern K., Neuhof H.: Effects of N-acetylcysteine on bacterial clearance. *Eur. J. Clin. Invest.* 26(10): 884-892, 1996

Kokot F.: *Choroby wewnętrzne*. PZWL, 1996.

Konturek S.: *Fizjologia układu trawiennego*. PZWL, W-wa, 1985.

Koop D. R., Crump B. L., Nordblom G. D., Coon M. J.: Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: Ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole and isoniazid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4065-4069, 1985

Kostowski W., Kubikowski P.: *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej*, PZWL, 1991

Kryteria zdrowotne środowiska. Trichloroetylen. IMP, Łódź, 1993

Kurtovic J., Riordan S.M.: Paracetamol-induced hepatotoxicity at recommended dosage. *J. Intern. Med.* 253, 240-243, 2003

Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970

Landon E., Naukam R., Sastry B.: Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 697-705, 1986

Lauterburg B. H., Corcoran G. B., Mitchell J. R.: Mechanism of Action of N-Acetylcysteine in the Protection Against the Hepatotoxicity of Acetaminophen in Rats In Vivo. *J. Clin. Invest.*, 71, 980-991, 1983

Lauterburg B.H., Velez M. E.: Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut*, 29, 1153-1157, 1988

- Lee C.A., LillibrIDGE J.H., Nelson S.D., Slattery J.T.: Effects of caffeine and theophylline on acetaminophen pharmacokinetics: P-450 inhibition and activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 287 – 291, 1996
- Lee C.A., Thummel K.S., Kalhorn T.F., Nelson S.D., Slattery J.T.: Activation of acetaminophen reactive metabolite formation by methylxanthines and known cytochrome P-450 activators. *Drug Metab. Disp.*, 19(5), 966 – 971, 1991
- Levy G., Regardh C.: Drug biotransformation interactions in man. V. Acetaminophen and salicylic acid. *J. Pharm.Sci.*, 60, 608-611, 1971
- Lim R. i wsp.: Site of action of narcotic and non-narcotic analgesic determined by blocking bradykinin- evoked visceral pain. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.*, 24, 1552, 1964
- Liu J., Liu Y., Madhu C., Klaasen C.: Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen – induced hepatotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266(3), 1607-1613, 1993.
- Liu. J., Sato Ch., Marumo F., Shigesawa T., Kamiyama T., Tajiri K., Miyakawa H.: Effects of caffeine on paracetamol activation in rat and mouse liver microsomes. *Xenobiotica*, 22(4), 433 – 437, 1992
- Liu. J., Sato Ch., Marumo F.: Characterization of acetaminophen – glutathione conjugation reaction by liver microsomes: species difference in the effects of acetone. *Toxicol. Lett.*, 56, 269 – 274, 1991
- Lodge J., Dasgupta D., Prasad K., Attia M., Toogood G., Davies M., Millson C., Breslin N., Wyatt J., Robinson P., Bellamy M., Snook N., Pollard S.: Emergency subtotal hepatectomy: a new concept for acetaminophen-induced acute liver failure: temporary hepatic support by auxiliary orthotopic liver transplantation enables long-term success. *Ann Surg.* 247(2), 238-49, 2008
- Lof A., Wallen M., Hjelm E.W.: Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. *Pharmacol. Toxicol.*, 66, 138 – 141, 1990.
- Lorber A., Baumgartner W.A., Bovy R.A., Chang C.C., Hollcraft R.: Clinical application for heavy metal complexing potential of N-acetylcysteine. *J. Clin. Pharmacol.* Vol. 13, 332-336, 1973
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951
- Luft S., Herman Z. S.: *Farmakoterapia chorób reumatycznych*, PZWL, 1992
- Łuczak Z., Joachimowicz I., Braucewicz D.: Ocena narażenia zawodowego pracowników pralni chemicznych. *Ochr. Prac.*, 30, 9 – 15, 1976
- Lynch R.M., Robertson R.: Anaphylactoid reactions to intravenous N-acetylcysteine: a prospective case controlled study. *Accid. Emerg. Nurs.* 12(1), 10-15, 2004
- MacDaniel J., Bebartá V., Schwertner H., Martin J.: Comparison of urine and serum testing for early detection of acetaminophen ingestion. *Mil Med.* 172(4), 399-401, 2007

- Mahadevan S.B.K., McKiernan P.J., Davies P., Kelly D.A.: Paracetamol, induced hepatotoxicity. *Arch Dis Child*, 91, 598-603, 2006
- Mahe N., Bertrand N., Drouet L., Simoneau G., Mazoyer E., Sollier C., Caulin C., Bergmann F.: Paracetamol: a haemorrhagic risk in patients on warfarin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59, 371-374, 2004
- Makin A., Williams R.: The current management of paracetamol overdose. *Bieżące metody postępowania w przypadkach przedawkowania paracetamolu. Ostre zatrucia – Informacja Ekspresowa*, 1(42), 144 – 148, 1997
- Manautou J.E., Emeigh Hart S.G., Khairallah E.A., Cohen S.D.: Protection against acetaminophen hepatotoxicity by a single dose of clofibrate: Effects on selective protein arylation and glutathione depletion. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 29, 229 – 237, 1996
- Mankowski D.C., Lawton M.P., Ekins S.: Characterization of transgenic mouse strains using six human hepatic cytochrome P450 probe substrates. *Xenobiotica*, 30(8), 745-754, 2000
- Manov I. Hirsh M., Iancu T.C.: Acetaminophen hepatotoxicity and mechanism of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. *Exp. Toxic. Pathol.* 53, 489-500, 2002
- Martensson J., Jain A., Meister A.: Glutathione is required for intestinal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1715-1719, 1990
- Martin F.L., McLean A.E.M.: Comparison of protection by fructose against paracetamol injury with protection by glucose and fructose 1,6-diphosphate. *Toxicology*, 108, 175 – 184, 1996
- Mazer M., Perrone J.: Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *J Med Toxicol.* 4(1), 2-6, 2008
- Mc Murtry R., Snodgrass W., Mithell J.: Renal necrosis, glutathione depletion, and covalent binding after acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46, 87-100, 1978
- Meredith T.J., Goulding M.D.: *Postgraduate Med. J.*; 56, 459-473, 1980
- Mielczarska J., Banaszewska G., Wiese M.: Acetaminophen – laboratory diagnostics of acute poisonings. *Acta Poloniae Toxicol.*, 5(2), 107-113, 1997.
- Milind A. Khandkar, Dipak V. Parmar., Mita Das And Surendra S. Katyare.: Is Activation of Lysosomal Enzymes Responsible for Paracetamol – induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity? *Pharm. Pharmacol.*, 48, 437-440, 1996
- Mitchell J. R., Jollow D. J., Potter W. Z., et al.: Acetaminophen induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 211-217, 1973
- Moeschlin S.: *Zatrucia. Klinika i leczenie. PZWL. W-wa*, 1960
- Mofenson H. C., Caraccio T. R.: Acetaminophen, *Emergency Toxicology*, edited by Peter Viccellio, 559-579, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998

- Mohandas J., Duggin G., Horvath J. Tiller D.: Regional differences in peroxidative activation of paracetamol (acetaminophen) mediated by cytochrome P-450 and prostaglandin endoperoxide synthetase in rabbit kidney. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 34, 69-80, 1981
- Monster A.C., Boersma G., Duba W.C.: Pharmacokinetics of trichloroethylene in volunteers: influence of workload and exposure concentration. *Int. Arch. Occp. Environ. Health.*, 38, 87 – 102, 1976
- Moore M., Thor H., Moore S., Orrenius S.: The Toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 260, 13035-13040, 1985.
- Morgan O.W., Griffiths C., Majeed A.: Interrupted time-series analysis of regulations to reduce paracetamol (acetaminophen) poisoning. *PLoS Med.* Apr; 4(4):e105, 2007.
- Mrozkiewicz A.: *Interakcje leków*. PZWL, W-wa, 1984.
- Mutlib A., Goosen T., Bauman J., Williams J., Kulkarni S., Kostrubsky S.: Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Chem. Res, Toxicol.*, 19 (5), 701-9, 2006.
- Nadolski S.: Acetaminophen. *Pharm. Ind.*, 57(4), 312, 1995
- Necki M.: Paracetamol. *Magazyn Medyczny*, 4/96, 40, 1996
- Newton J., Kuo C., Gemborys M., Mudge G., Hook J.: Nephrotoxicity of p-aminophenol, a metabolite of acetaminophen, in the Fisher 344 rat. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 65, 336-344, 1982
- Okino T., Nakajima T., Nakano M.: Morphological and biochemical analyses of trichloroethylene hepatotoxicity: Differences in ethanol and phenobarbital pretreated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108, 379 – 389, 1991
- Omura T., Sato R., The carbon monoxide – binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378, 1964
- Ornaghi F., Ferrini S., Prati M., Giavini E.: The protective effects of N-acetyl-L-cysteine against methyl mercury embryotoxicity in mice. *Fund. App. Toxicol.* 20: 437-445, 1993
- Ośrodek Informacji Naukowej „Polfa”: W sprawie paracetamolu. *Lek w Polsce*, 4/95. 40 – 50, 1995
- Ott I., Neuman F.J., Gawaz M.: Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*, 93: 2152-2160, 1996
- Pach J., Wiernikowska A.: *Klinika ostrych zatruc*. AM Kraków, 244-263, 1989
- Pastino G. M., Yap W. Y., Carroquino M.: Human Variability and Susceptibility to Trichloroethylene. *Environ. Health Perspect.*, 108, 2 (suppl.) 201-214, 2000.
- Pawelski S.: *Diagnostyka laboratoryjna w hematologii*. PZWL, W-wa, 1990

- Pawełczyk E.: Chemia leków. PZWL, W-wa, 1986
- Pawełczyk E., Zając M.: Chemiczne mechanizmy działania leków. AM Poznań, 1995
- Pearson H.: Comparative effects of aspirin and acetaminophen on hemostasis. *Pediatrics*, 62, 926, 1978
- Pendyala L., Creaven P.J.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of N-acetylcysteine, a potential chemoprotective agent during a phase I trial. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 4(3), 245-251, 1995
- Petersen K.: Omeprazol und das cytochrom P-450 der Leber. *Leber Magen Darm*, 23, 186-192, 1993.
- Plewka A., Zielińska-Psujka B., Kowalówka-Zawieja J., Nowaczyk-Dura G., Plewka D., Wiaderkiewicz A., Kamiński M., Orłowski J.: Influence of acetaminophen and trichloroethylene on liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system. *Acta Biochimica Polonica* 47, 4, 1129-1136, 2000
- Podlewski J., Podlewska – Chwalibogowska A.: *Leki współczesnej terapii 2010*. Medical tribune, Polska, Warszawa 2010
- Poulsen H.E., Ranek L., Jorgensen L.: The influence of disulfiram on acetaminophen metabolism in man. *Xenobiotica*, 2, 243 – 249, 1991
- Prescott L.F., Critchley J.A.: Drug interactions affecting analgesic toxicity. *Am. J. Med.* 75(5a), 113 – 16, 1983
- Prescott L.F., Illingworth R.N., Critchley J.A.J.H., et.al.: Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *BMJ* 2, 1097-1100, 1979.
- Prescott L. F.: Paracetamol, alcohol and the liver, *J. Clin. Pharmacol.*, 49, 291-301, 2000.
- Prescott L.F.: Paracetamol past, present, future. *Am. J. Ther.* 7, 143-147, 2000
- Przegląd lekarski: Niesteroidowe Leki przeciwzapalne i paracetamol. 54, 4, 2002
- Radzikowski A., Mrozińska M.: Paracetamol w zakażeniach dróg oddechowych. Wydawnictwo Czelej, Lublin, 1998.
- Raińska – Giezek T.: Wpływ kofeiny na toksyczność i farmakokinetykę paracetamolu. *Roczniki Pomorskiej AM w Szczecinie*, 41, 69 – 85, 1995
- Rannung U., Holme J.A., Hongslo J.K., Sram R.: An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. *Mut. Res.*, 327, 179 – 200, 1995
- Ray S.D., Mumaw V.R., Raje R.R., Fariss M.W.: Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279(3), 1470 – 1483, 1996
- Reid D., Hazell W.: Paracetamol poisoning: Which nomogram should we use? *Emerg. Med.* 15, 486-496, 2003

- Riordan S.M., Williams R.: Alcohol exposure and paracetamol-induced hepatotoxicity. *Addict. Biol.* 7(2), 191-206, 2002.
- Robinson D., Smith A. M.J., Johnston G. D.: Severity of overdose after restriction of paracetamol availability: retrospective study. *BMJ*, 321, 926-927, 2000.
- Rogers S., Back D., Stevenson P., Grimmer S., Orme M.: Paracetamol interaction with oral contraceptive steroids: increased plasma concentrations of ethinyloestradiol. *British J. Clin. Pharmacol.*, 23, 721-725, 1978
- Rolski S.: *Chemia środków leczniczych*, PZWL, W-wa, 1968
- Rumack B.H., Peterson R.G., Koch G.C., Amara I.A.: Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. *Arch. Intern. Med.* 141, 380-385, 1981
- Rumack B. H.: Acetaminophen overdose in young children, *Am. J. Dis. Child.*, 138, 1984
- Rumack B.: *Zatrucia środkami chemicznymi i lekami*. Wyd. Nauk. PWN W-wa, str.2012, 1996
- Rusiecki W.: *Toksykologia współczesna*. PZWL, W-wa, 1977
- Saito C., Zwingmann C., Jaeschke H.: Novel mechanism of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology*, 51(1), 246-254, 2010
- Schmidt L. E., Dalhoff K.: Risk factors in the development of adverse reactions to N-acetylcysteine in patients with paracetamol poisoning. *J. Clin. Pharmacol.*, 51, 87-91, 2001
- Seńczuk W.: *Toksykologia*. PZWL, W-wa, 1994.
- Shaikh Z.A., Vu T.T., Zaman K.: Oxidative stress a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154(3), 256-263, 1999
- Shen H., Yang C., Liu J., Ong.: Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free. Radic. Biol. Mde.*, 28(7), 1115-1124, 2000
- Siembab D.: Paracetamol – informacja o leku. *Terapia i Leki*, XXI/XLIII/10 – 11, 362 – 367, 1993
- Siegers C.P., Leser W., Giesemann J., Oltmann D.: Biliary and renal excretion of paracetamol in man. *Pharmacol.*, 29, 301-303, 1984.
- Socha J.: *Choroby wątroby i dróg żółciowych u dzieci*. PZWL, W-wa, 1994.
- Stein C.M., Thornhill D.P., Neill P., Nyazema N.Z.: Lack of effect of paracetamol on the pharmacokinetics of chloramfenicol. *Br. J. Clin. Pharm.*, 27, 262 – 264, 1989
- Stewart R.D., Hake C.L., Peterson J.E.: Use of breath analysis to monitor trichloroethylene exposures. *Arch. Environ. Health.*, 29, 6 – 13, 1974

Stolarek R.: Produkcja tlenu azotu oraz wpływ N-acetylocysteiny na chemiluminescencję ludzkich granulocytów obojętnochłonnych stymulowanych N-formylo-metionilo-leucylo-fenylalaniną oraz estrami forbolu. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź 2000.

Stokes I. M.: Paracetamol overdose in the second trimester of pregnancy. Case report. Br. J. Obstet. Gynaecol., 91, 286, 1982

Szostek-Gawel V.: NAC a stres oksydacyjny w przebiegu POCHP, Magazyn Medycyny Rodzinnej i ogólnej, 7, 18, 2002

Tan S., New L., Chan E.: Prevention of acetaminophen (APAP)- induced hepatotoxicity by leflunomide via inhibition of APAP biotransformation to N-acetyl-p-benzoquinone imine. Toxicol Lett. 28; 180 (3), 174-81, 2008

Tanaka E., Terada M., Misawa S.: Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role, J. Clin. Pharm. And Therap. 25, 165-175, 2000

Tarantino G., Di Minno M., Capone D.: Drug induced liver injury: I sit somehow foreseeable?, World Gastroenterol., 15 (23), 2817-2833, 2009

Tee L.B.G., Donald S.D., Seddon C.E., Boobis A.R.: Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its cytotoxic metabolite. Biochem. Pharmacol., 36(7), 1041 – 1052, 1987

Terneus M. V., Brown J. M., Carpenter A. B., Valentovic M. A.: Comparison of S-Adenosyl-L-methionine (SAME) and N-Acetylcysteine (NAC) Protective Effects on Hepatic Damage when Administered After Acetaminophen Overdose. Toxicology 244 (1), 25-34, 2008.

Thabrew M.J., Hughes R.D., Gove C.D., Portmann B., Williams R., McFarlane J.G.: Protective effects of „Osbecka octandra” against paracetamol-induced liver injury. Xenobiotica, 9, 1009 – 1017, 1995

Thibault N., Oeytavin G., Claude J.: Calcium channel blocking agents protect against acetaminophen-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. J. Biochem. Toxicol., 6: 237-238, 1991

Tokatli A., Kalkanoğlu-Sivri H., Yüce A., Coşkun T.: Acetaminophen-induced hepatotoxicity in a glutathione synthetase-deficient patient. Turk. J. Pediatr. 49(1), 75-6, 2007

Towheed T.E., Judd M.J., Hochberg M.C., Wells G.: Acetaminophen for osteoarthritis. Med. Prakt. 6(148): 164-166, 2003

Trumper L., Monastevolo L.A., Elias M.M.: Nephrotoxicity of acetaminophen in male Wistar rats: Role of hepatically derived metabolites. J. Pharmacol. Exp. Ther., 279(2), 548 – 554, 1996

VSP DI: Drug information for the health care professional. 1, 3 – 6, 1998

Villagrasa V., Cortijo J., Mart-Cabrera M.: Inhibitory effect of N-acetylcysteine on superoxide anion generation in human polymorphonuclear leukocytes. J. Pharm. Pharmacol., 49, 525-529, 1997

- Wallace J. L.: Acetaminophen hepatotoxicity: NO to the rescue. *Brit. J. Pharmacol.*, 143, 1-2, 2004
- Webster L., Tong W., McCormack J.: Effect of trimethoprim, paracetamol and cimetidine on trimetrexate metabolism by rat perfused isolated livers. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39, 942 – 944, 1987
- Whitcomb D. C., Block G. D.: Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA*, 1994
- Wiernikowski A., Kroch S., Kolasińska – Kloch W.: Ostre zatrucia trójchloroetylenem w oparciu o obserwacje własne. *Studia i Materiały Monograficzne. Ostre zatrucia rozpuszczalnikami organicznymi. IMP, Łódź*, 2(10), 68 – 76, 1982
- Yang R., Miki K., He X. Killeen M.E., Fink M.P.: Prolonged treatment with N-acetylcystine delays liver recovery from acetaminophen hepatotoxicity. *Critical Care*, 1-7, 2009.
- Yim H., Jung Y., Kim S., Kim Y.: Contrasting changes in phase I and phase II metabolism of acetaminophen in male mice pretreated with carbon tetrachloride. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (2): 225-30, 2006.
- Ying Y., Lou Y.: Effect of preimplantation treatment with aspirin and acetaminophen on blastocyst and fetus in rats. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 14, 369, 1993
- Zakia B.: Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition&Metabolism* 5, 27, 2008, doi 10.1186/1743-7075-5-27
- Zielińska – Psuja B., Orłowski J., Przybylska L.: Wpływ trichloroetyleny na metabolizm benzenu u szczurów. Cz. I Wpływ trichloroetyleny na metabolizm różnych stężeń benzenu. *Acta Poloniae Toxicol.* 1, 138, 1993.
- Ziółkowski J., Ziółkowska H.: Ból i zastosowanie paracetamolu u dzieci. *Wyd. Czelej*, 1997

10. Spis tabel i rycin

	Strona
Tab. 1. Wybrane preparaty złożone paracetamolu.....	24
Tab. 2. Współczynnik frakcji glukuronidu do siarczanu w przemianie paracetamolu u różnych grup wiekowych (Chomicka, 1998).....	26
Tab. 3. Procentowy udział paracetamolu i jego metabolitów wydalanych z moczem i żółcią.....	29
Tab. 4. Procentowy udział TRI i jego metabolitów wydalanych przez płuca i z moczem.....	54
Tab. 5. Zależność powierzchni piku od stężenia wolnego paracetamolu.....	96
Tab. 6. Zależność powierzchni piku od stężenia glukuronidu paracetamolu.....	96
Tab. 7. Parametry statystyczne dla krzywych wzorcowych paracetamolu i glukuronidu paracetamolu.....	97
Tab. 8. Stężenie APAP w surowicy [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$] po jednorazowym podaniu leku w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (\bar{x} (SD, n=6).....	112
Tab. 9. Stężenie APAP w surowicy [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$] po jednorazowym podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (\bar{x} (SD, n=6).....	113
Tab. 10. Parametry farmakokinetyczne APAP podanego w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (\bar{x} (SD, n=6).....	114
Tab. 11. Parametry farmakokinetyczne APAP podanego w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.);(\bar{x} (SD, n=6).....	115
Tab. 12. Ilość wydalonego paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm \text{SD}$, n=6)	120
Tab. 13. Ilość wydalonego glukuronidu paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 250mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.);($\bar{x} \pm \text{SD}$, n=6).....	121
Tab. 14. Ilość wydalonego paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($\bar{x} \pm \text{SD}$, n=6).....	122
Tab. 15. Ilość wydalonego glukuronidu paracetamolu [mg] z moczem po podaniu w dawce 500mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.);($\bar{x} \pm \text{SD}$, n=6).....	123
Tab. 16. Stałe szybkości eliminacji z moczem i czas półtrwania wolnego paracetamolu po podaniu pojedynczym APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. i/lub łącznym z TRI (250mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	124
Tab. 17. Stałe szybkości eliminacji z moczem i czas półtrwania glukuronidu paracetamolu po podaniu pojedynczym APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. i/lub łącznym z TRI (250mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	125
Tab. 18. Procentowa ilość wydalonego wolnego paracetamolu i glukuronidu w moczu po podaniu pojedynczym APAP w dawce 250 i 500 mg/kg m.c. i/lub łącznym z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	126

Tab. 19.	Aktywność AIAT po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	127
Tab. 20.	Aktywność AIAT po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	128
Tab. 21.	Aktywność AspAT po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	129
Tab. 22.	Aktywność AspAT po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	130
Tab. 23.	Aktywność LDH po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	131
Tab. 24.	Aktywność LDH po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	132
Tab. 25.	Aktywność SDH po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	133
Tab. 26.	Aktywność ICD po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (M, min.-maks., n = 6).....	134
Tab. 27.	Stężenie cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	135
Tab. 28.	Stężenie cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	136
Tab. 29.	Stężenie cytochromu b ₅ w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	137
Tab. 30.	Stężenie cytochromu b ₅ w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	138
Tab. 31.	Aktywność reduktazy NADPH-cytochrom P-450 po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	139
Tab. 32.	Aktywność reduktazy NADPH-cytochrom P-450 po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	140
Tab. 33.	Aktywność reduktazy NADH-cytochrom b ₅ po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	141
Tab. 34.	Aktywność reduktazy NADH-cytochrom b ₅ po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	142
Tab. 35.	Izoformy cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); ($x \pm SD$, n=6).....	143
Tab. 36.	Izoformy cytochromu P-450 w wątrobie po jednorazowym podaniu	

	APAP (500 mg/kg m.c.) pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.); (n = 6).....	144
Tab. 37.	Stężenie glutationu po jednorazowym podaniu APAP (250 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (x±SD, n=6).....	145
Tab. 38.	Stężenie glutationu po jednorazowym podaniu APAP (500 mg/kg m.c.), pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.); (x±SD, n=6).....	146
Ryc. 1.	Biotransformacja paracetamolu (Tanaka i wsp., 200).....	28
Ryc. 2.	Możliwe toksyczne efekty wywoływane przez reaktywne metabolity paracetamolu (Mankowski i wsp., 2000; Ośrodek Informacji Naukowej „Polfa”, 1995).	37
Ryc. 3.	Związek pomiędzy stężeniem paracetamolu w osoczu, czasem od zatrucia i niebezpieczeństwem uszkodzenia wątroby.....	38
Ryc. 4.	Zasada leczenia zatrucia paracetamolem.....	42
Ryc. 5.	Schemat biotransformacji trichloroetyleny (Bogdanik, 1992).....	53
Ryc. 6.	Uproszczony schemat procesów wchłaniania, dystrybucji i eliminacji ksenobiotyku w organizmie.....	65
Ryc. 7.	Analiza kompartmentowa (Herman i Skibińska, 1992).....	66
Ryc. 8.	Półlogarytmiczny wykres zależności stężenia ksenobiotyku we krwi od czasu.....	69
Ryc. 9.	Krzywe zmian stężeń leku w organizmie (Y) w czasie (t) po podaniu pozanaczyniowym.....	71
Ryc. 10a.	Wykres wzorcowy paracetamolu w moczu (y=ax).....	98
Ryc. 10b.	Wykres wzorcowy glukuronidu paracetamolu w moczu (y=ax).....	98
Ryc. 11.	Wykres liniowy zależności stężenia paracetamolu w surowicy po jednorazowym podaniu leku w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	116
Ryc. 12.	Wykres liniowy zależności stężenia paracetamolu w surowicy po jednorazowym podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	117
Ryc. 13.	Wykres półlogarytmiczny zależności stężenie paracetamolu w surowicy po jednorazowym podaniu leku w dawce 250 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	118
Ryc. 14.	Wykres półlogarytmiczny zależności stężenie paracetamolu w surowicy po jednorazowym podaniu leku w dawce 500 mg/kg m.c. pojedynczo lub łącznie z TRI (250 mg/kg m.c.) i NAC (150 mg/kg m.c.).....	119

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia 19.12.2011 r.

.....
(podpis)